

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ**

**Херсонський державний університет**

**Лановенко О.Г.**

**ГЕНЕТИКА**

**Лабораторний практикум**

(навчально-методичний посібник для студентів біологічних спеціальностей  
університетів)

**ХЕРСОН - 2018**

УДК 575 (075.8)

**Автор: Лановенко О.Г.**, доцент кафедри біології людини та імунології факультету біології, географії і екології Херсонського державного університету

**Рецензенти:**

**Авраменко А.О.** – доктор медичних наук, професор кафедри олімпійського та професійного спорту Чорноморського національного університету імені Петра Могили

**Полещук С.В.** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри колекційної освіти факультету природознавства, здоров'я людини та туризму Херсонського державного університету

Практикум з генетики підготовлений у відповідності до програми курсу загальної генетики для біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів. У практикумі за основними розділами курсу описана методика виконання лабораторних робіт, приклади проведення генетичного аналізу спадкування, завдання для самостійної роботи; в кінці розділів наведені завдання та контрольні питання для перевірки знань.

Практикум рекомендований для лабораторних занять і самостійної роботи студентів біологічних спеціальностей.

Обговорено на засіданні кафедри біології людини та імунології  
Протокол № 4 від 07.11. 2016 р.

Розглянуто на засіданні науково-методичної ради факультету біології, географії і екології  
Протокол № 3 від 21.11.2016 р.

Схвалено науково-методичною радою ХДУ  
Протокол №3 від 15.02.2017 р.

Рекомендовано до друку Вченою радою ХДУ  
Протокол № 10 від 27.02.2017 р.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1. ЦИТОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ</b> .....	5
Лабораторна робота №1. Техніка мікроскопування в цитогенетичних дослідженнях. Методика приготування тимчасових «давлених» препаратів .....	9
Лабораторна робота №2. Аналіз каріотипів. Будова метафазної хромосоми. Каріограма хромосом людини .....	16
<b>1.1. Біологія нестатевого розмноження. Поділ соматичних клітин</b> .....	29
Лабораторна робота №3. Мітоз. Фази мітозу. Типи мітозу. Визначення мітотичної активності клітин.....	30
<b>1.2. Біологія статевого розмноження. Процес формування статевих клітин. Запліднення.</b>	41
Лабораторна робота №4. Мейоз. Гаметогенез у тварин. Мікро- та макрогаметогенез у рослин. Процес запліднення .....	43
<b>РОЗДІЛ 2. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК ПРИ ВНУТРІШНЬОВИДОВІЙ ГІБРИДИЗАЦІЇ</b> .....	56
Лабораторна робота № 5. Аналіз моногенного спадкування. Причини відхилень від менделівських закономірностей розщеплення. Множинний алелізм .....	56
Лабораторна робота № 6. Генетичний аналіз успадкування ознак при дигібридному та полігібридному схрещуваннях .....	66
Лабораторна робота № 7. Генетичний аналіз успадкування ознак при неалельній взаємодії генів .....	75
Лабораторна робота № 8. Генетичний аналіз успадкування ознак, зчеплених із статтю .....	88
<b>2.4. Зчеплення генів і кросинговер</b> .....	96
Лабораторна робота № 9. Генетичний аналіз успадкування зчеплених генів.....	96
Лабораторна робота № 10. Побудова ділянки генетичної карти хромосоми методом триангуляції. Генетичний аналіз зчепленого спадкування трьох генів.....	110
<b>РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ</b> .....	124
Лабораторна робота № 11. Особливості організації геномів вірусів, прокариотів, еукаріотів. Код ДНК та РНК, його реалізація під час трансляції .....	126
Лабораторна робота № 12. Методи молекулярно-генетичного аналізу ДНК.....	135
Лабораторна робота № 13. Рестрикційний аналіз ДНК. Побудова рестрикційної карти .....	145
Лабораторна робота № 14. Методи діагностики генної і хромосомної патології людини .....	148
<b>РОЗДІЛ 4. МІНЛИВІСТЬ ТА ЇЇ ГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ</b> .....	156
<b>4.1. Модифікаційна мінливість</b> .....	157
Лабораторна робота № 15. Біометричний аналіз модифікаційної мінливості.....	157
<b>4.2. Мутаційна мінливість</b> .....	164
Лабораторна робота № 16. Генетичний аналіз успадкування множинних алелей генів. Функціональний критерій алелізму .....	164
Лабораторна робота № 17. Генетичний аналіз успадкування ознак хромосомних мутантів ...	175
Лабораторна робота № 18. Генетичний аналіз успадкування ознак в анеуплоїдів і поліплоїдів	185
Лабораторна робота № 19. Генеалогічний метод антропогенетики. Складання та аналіз родоводів .....	191
<b>РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В ПОПУЛЯЦІЯХ</b> .....	198
Лабораторна робота № 20. Генетичний аналіз динаміки частот алелей і генотипів у популяції	198
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	204
<b>ДОДАТКИ</b>	
<b>ДОДАТОК А.</b> Характеристика форм нестатевого і статевого розмноження одноклітинних і багатоклітинних організмів.....	205

## ВСТУП

Генетика є основою сучасної біології, оскільки встановлені закономірності процесів спадковості та мінливості справедливі для всіх організмів – від вірусів до людини, а генетичні методи використовуються під час будь-яких біологічних досліджень. Генетичні дослідження відіграють провідну роль у розвитку сучасних біологічних наук: ембріології, цитології, селекції, рослинництві, біотехнології, медицині, біохімії та інших. Тому пізнання закономірностей спадковості та мінливості, оволодіння сучасними методами генетичних досліджень мають велике значення для біолога.

Сучасна генетика значно розширила свої межі та розділилася на низку спеціалізованих областей, вивчення котрих представляє певні складності та потребує удосконалення змісту підручників і навчальних посібників. Нині дозріла необхідність у виданні практикуму з генетики для біологічних спеціальностей, оскільки вдосконалення викладання потребує нових підходів до проведення лабораторних і практичних занять, посилення ролі самостійної роботи та її систематичного контролю.

Навчальний посібник містить вивчення явищ спадковості і мінливості на молекулярному, клітинному, організменому та популяційному рівнях. Значна увага приділена вивченню цитологічних та молекулярних основ спадковості, генетичній системі статевого розмноження, реалізації спадкової інформації, генетичному аналізу спадкування ознак і властивостей організмів, складанню генетичних карт хромосом, мутаційній та модифікаційній мінливості, поліплоїдії, інбредному виродженню і гетерозису, генетиці людини, генетиці популяцій.

Практикум з генетики та основ селекції підготовлений у відповідності з навчальною програмою курсу загальної генетики на основі узагальнення літературних даних, багаторічних досліджень автора, досвіду викладання у Херсонському державному університеті та призначений для лабораторно–практичних занять і самостійної роботи студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів. Студенти протягом відносно короткого за обсягом і часом курсу повинні засвоїти основні розділи генетики, оскільки неможливо проводити біологічні дослідження без знання генетичних закономірностей і методів генетичних досліджень. У практикумі поряд з коротким викладенням основних розділів описана методика виконання робіт і розв'язання типових задач, а також задачі для самостійного рішення; в кінці кожної роботи наводяться завдання та контрольні питання для перевірки знань. Задачі підібрані таким чином, щоб у студента викликати інтерес до самостійного їх рішення з використанням теоретичних знань і логічного мислення.

Автор сподівається, що практикум допоможе студентам у засвоєнні програми курсу генетики та буде вдячний за висловлені зауваження та побажання, котрі надалі будуть враховані при вдосконаленні даного посібника.

## РОЗДІЛ 1. ЦИТОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ

Вивчення генетики та селекції на сучасному етапі розвитку науки неможливе без знання основ цитології. Нині знання про клітину значно розширилися та поглибилися. Найважливішими завданнями науки є вивчення спадковості на клітинному рівні, особливостей зміни спадкового апарату клітини під впливом зовнішніх і внутрішніх факторів. Основними типами спадковості є: **ядерна** (контролюється генами хромосом ядра); **неядерна**, або **цитоплазматична** (здійснюється генами органел цитоплазми: пластид, мітохондрій; самої цитоплазми); **акаріотична** (контролюється генами вірусів, бактеріофагів, бактерій). На стику генетики та цитології виникла та успішно розвивається цитогенетика.

Цитогенетика - галузь генетики, яка вивчає цитологічні основи спадковості та мінливості. Предмет досліджень цитогенетики — хромосоми, їх організація, функціонування та спадкування. Питання нехромосомної (цитоплазматичної) спадковості вивчає клітинна генетика. Цитогенетика використовує методи генетики та цитології і тісно пов'язана з розділами цих наук — молекулярною генетикою, цитохімією, каріологією. Під час класичного цитогенетичного аналізу проводять одночасно цитологічне (мікроскопічне) дослідження хромосом і генетичний аналіз спадкування ознак. Цитогенетику поділяють на загальну, в яку включають також популяційну та радіаційну цитогенетику, та приватну — цитогенетику рослин, цитогенетику тварин і цитогенетику людини (в тому числі медичну цитогенетику).

Основним методом цитогенетики є оптична та електронна мікроскопія. Метод оптичної мікроскопії є найстарішим, але таким, що донині не втратив свого значення та використання. Для вивчення біологічних об'єктів використовують світлові та електронні мікроскопи. Нині найпоширенішими світловими мікроскопами є:

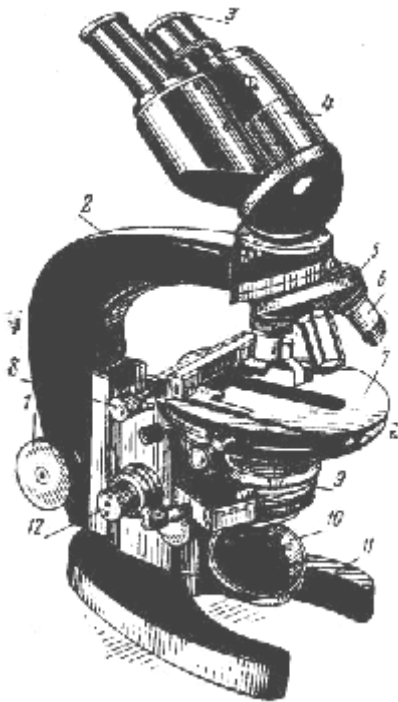
1. Робочий біологічний мікроскоп МБР-1.
2. Біологічний дорожній мікроскоп МБД.
3. Біологічні мікроскопи МБІ-3, МБР-3, Біолам (рис.1 і рис.2).
4. Універсальні біологічні дослідницькі мікроскопи МБІ-6, МБІ-11, МБІ-15.
5. Стереоскопічний мікроскоп МБС-1 (рис. 3).
6. Люмінесцентний мікроскоп УЕМВ-100Б.

Для передачі зображення на відстань користуються телевізійним мікроскопом, у якого оптичне зображення перетворюється у серію електронних сигналів.

Серед **світлових мікроскопів** розрізняють **біологічні**, що використовуються у біології, медицині, та **металографічні**, що використовують у промисловості. Біологічні мікроскопи призначені для дослідження прозорих препаратів у прохідному світлі; їх умовно поділяють на: 1) спрощені; 2) робочі; 3) дослідницькі; 4) універсальні. Для всебічного вивчення об'єкту в залежності від методу спостереження дослідник не обмежується біологічними мікроскопами (МБ), а використовує стереоскопічні (МС) (**рис. 1.3**), поляризаційні (МП), інфрачервоні (МІЧ), електронні мікроскопи.

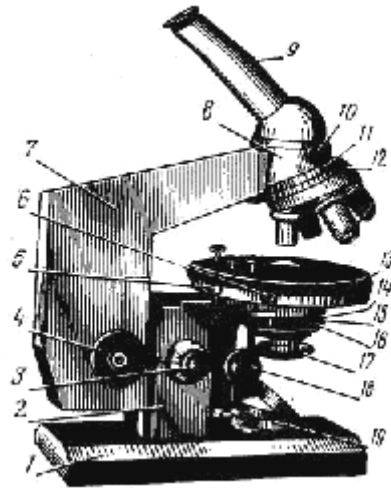
Нині мікроскопи різних марок широко використовуються для візуальних спостережень, фотографування об'єктів, точних кількісних вимірювань. Усі вони мають власні конструктивні відмінності, але обов'язково у своєму складі мають

оптичний і механічний вузли. Для учбових цілей та роботи в лабораторіях використовують моделі робочих біологічних мікроскопів МБР-3 і Біолам, схема будови яких представлена на **рис.1.1** та **рис. 1.2**.



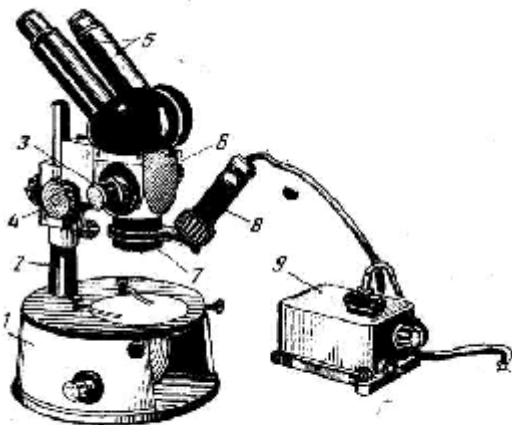
**Рис.1. 1.- Мікроскоп МБР-3:**

1 - рукоятка грубого фокусування; 2 - тубусоутримувач; 3 - окуляр; 4 - бінокулярний тубус; 5 - револьвер; 6 - об'єктив; 7 - предметний столик; 8 - препаратопровідник; 9 - конденсор; 10 - дзеркало; 11 - основа штатива; 12 - рукоятка точного фокусування.



**Рис.1.2.- Мікроскоп «Біолам Р»:**

1 - основа (підшва); 2- коробка з механізмом мікрометричного фокусування; 3 – рукоятка макрометричного фокусування; 5 – стопорний гвинт; 6 – центрировочний гвинт; 7 – тубусоутримувач; 8 – головка; 9 – монокулярна насадка; 10 – гвинт насадки; 11 – гвинт револьверу; 12 – револьвер; 13 – предметний столик; 14 – гвинт конденсора; 15–16 – корпус конденсора; 17 – відкидна лінза в оправі; 18 – рукоятка конденсора; 19 – дзеркало.



**Рис. 1.3. - Стереоскопічний мікроскоп МБС-1:** 1 - основа; 2 – стойка; 3 - рукоятка переключення збільшення; 4 – рукоятка фокусування; 5 – бінокулярний тубус з окулярами; 6 – оптична головка; 7 – об'єктив; 8 – освітлювач; 9 – трансформатор.

**Оптичний вузол** складається із об'єктива, конденсора, дзеркала, окуляра разом із тубусом. У ньому всі складові частини строго відцентровані відносно одна до одної. Найважливішою складовою частиною оптичного вузла мікроскопа є **об'єктив**. Він будує збільшення зображення, геометрично подібне об'єкту, із зворотнім розміщенням частин по відношенню до препарату й одночасно виявляє подробиці, недоступні оку людини (інакше кажучи, "розрішає" структуру). Сучасні об'єктиви – це багатолінзові системи, від якості яких залежить зображення об'єкту. Недоліки лінз – **аберації** - призводять до зміни зображення: воно може бути забарвленим, розмазаним, викривленим. Розрізняють наступні види аберацій: 1) *сферична* (зображення точки передається в вигляді кола розсіювання); 2) *астигматизм* (кола розсіювання мають не круглу, а еліпсоїдну форму); 3) *кома* – чіткість зображення знижується від центра до границь поля зору внаслідок порушення симетрії світлового пучка); 4) *кривизна поля зору* (не дозволяє одночасно бачити різко центр і межі поля зору); 5) *дисторсія* (порушення подібності об'єкту та його зображення); 6) *хроматизм положення* (зображення об'єкта не є чітким, з'являються кольорові окантовки по краю об'єкта).

У залежності від того, наскільки виправлені аберації, розрізняють наступні об'єктиви: ахромати, апохромати, план-ахромати, план-апохромати. В **ахроматів** виправлена сферична аберація, кома, хроматизм положення, вони використовуються у робочих мікроскопах МБР-1, МБР-3, Біолам 70, є найпростішими системами. **Апохромати** (АПО) є більш складною системою, в якій виправлені сферична аберація, кома, астигматизм, хроматизм положення для трьох довжин хвиль, що забезпечує більш високу якість зображення. Вони входять до складу дослідницьких мікроскопів МББ-1, МБІ-3, МБІ-11, МБІ-15. В об'єктивах–ахроматах та апохроматах не ліквідована повністю кривизна зображення, при якій воно опиняється розмитим по краях поля зору, що особливо незручно при мікрофотографуванні. Для усунення цього недоліку створені об'єктиви з плоским полем зору – план-ахромати і план-апохромати. На оправі імерсійних об'єктивів нанесені канавки різного кольору в залежності від виду імерсії: чорна - на об'єктиві олійної імерсії (помітка МІ на оправі), біла – на об'єктиві водної імерсії (ВІ на оправі), жовта - на об'єктиві гліцеринової імерсії.

Для розрахунку розрішальної здатності об'єктива використовують формулу:  $d = \lambda : A$ , де  $d$  – розрішальна здатність об'єктива (в мкм),  $\lambda$  - довжина хвилі світла (в мкм),  $A$  – числова апертура. **Числова, або нумерична, апертура** визначає здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла і визначається за формулою:  $A = n \sin \alpha$ , де  $n$  – показник заломлення середовища між фронтальною лінзою об'єктива і покривним склом,  $\alpha$  – половинний кут вхідного отвору об'єктива, тобто кут, один бік якого співпадає з оптичною віссю, інший - утворений лінією, яка з'єднує точку виходу променів з об'єкта з межею діючого отвору об'єктива. Оскільки показник заломлення повітря дорівнює 1, то  $A$  може змінюватись у сухих об'єктивів від 0 до 1. Якщо  $\alpha = 90^\circ$ , то  $\sin 90^\circ = 1$ , отже,  $A=1$ ;  $\sin 40^\circ = 0,64$ ,  $A= 0,64$ . Чим більше  $\sin \alpha$ , тим вище апертура, тим краща розрішальна здатність об'єктива, тобто в мікроскоп можна розгледіти більш дрібні деталі. Кращі сухі об'єктиви мають  $A=0,95$ , при якій найменша помітна структура складає розміри 0,35 мкм. Імерсійні об'єктиви мають більш високу апертуру, ніж

сухі, оскільки показник заломлення рідин є менший за 1. Наприклад, вода має  $A = 1,33$ , кедрова олія –  $1,515$ . Отже, найбільша апертура в олійних імерсійних об'єктивах ( $A=1,4$ ).

Розрішальна здатність об'єктива залежить не тільки від апертури, але й від довжини хвилі світла. Зменшуючи довжину хвилі світла шляхом освітлення об'єкта синіми променями з довжиною хвилі  $0,47$  мкм (використовуючи сині світлофільтри), можна побачити більш дрібні частки. Отже, розрішальна здатність об'єктива – величина найменшого діаметра помітних часток або найменша відстань між двома лініями, які можна окремо побачити у мікроскоп. Цю характеристику мікроскопа можна поліпшити шляхом збільшення числової апертури об'єктива і зменшення довжини хвилі світла. Числова апертура вказується на оправі об'єктива. Окрім розрішальної здатності, об'єктив характеризується певною **фокусною відстанню** та **збільшенням**. Чим більшою є фокусна відстань, тим менше збільшення об'єктива. Слабкі об'єктиви мають більшу фокусну відстань :  $50 - 60$  мм, сильні –  $1 - 3$  мм. Збільшення об'єктива вказано на оправі. У мікроскопа “Біолам – 70” об'єктиви мають збільшення  $9x$ ,  $40x$ ,  $90x$  та апертуру відповідно  $0,20$ ;  $0,65$ ;  $1,25$ .

**Конденсор** знаходиться під столиком мікроскопа і складається з двох або трьох лінз. У залежності від метода спостереження розрізняють декілька типів конденсорів: світлого поля, темного поля, для спостереження за методом фазового контрасту, освітлення тощо. Конденсор ОІ-13 призначений для проведення спостережень у темному полі, ОІ-14 – для прямого і косоного освітлення. У робоче положення конденсор приводять, опускаючи або піднімаючи його спеціальним гвинтом. Під конденсором мікроскопу знаходиться **ірисова діафрагма**. Конденсор також має певну числову апертуру ( $1,2$ ;  $1,4$ ). Високоапертурні об'єктиви використовують під час роботи разом з високоапертурним конденсором. Якщо апертура конденсора є меншою за апертуру об'єктива, то можливості об'єктива обмежені і використовуються в роботі не повністю. Отже, розрішальну здатність мають конденсор, око людини, об'єктив.

**Дзеркало** мікроскопа має дві поверхні: пласку та вгнуту. Воно розміщене під конденсором, спрямовуючи на нього світло. Із конденсора світло надходить на препарат, що міститься на столику мікроскопа, а потім входить в об'єктив. Отже, дзеркало і конденсор необхідні для освітлення препарату пучком світла.

**Окуляр** влаштований значно простіше за об'єктив. Найчастіше він складається всього з двох лінз. За призначенням окуляр нагадує лупу, оскільки він так само буде несправжнє зображення і збільшує його, не виявляючи подробиць будови. *Отже, завдяки об'єктиву та окуляру зображення мікроскопа опиняється несправжнім, двічі збільшеним і перевернутим по відношенню до препарату.* **Загальне збільшення мікроскопа** визначається як добуток збільшення об'єктива ( $V_{об}$ ) на збільшення окуляра ( $V_{ок}$ ):

$$V = V_{об} \cdot V_{ок}$$

**Розрішальна здатність мікроскопа** може реалізуватися тільки при певному збільшенні, яке називається **корисним** і визначається таким чином:

$$V_{корисне} = (500 \div 1000) \times A.$$



Розрахунки свідчать, що корисне збільшення не може переважати 1300-1500 разів. Велике збільшення не виявляє нових деталей на зображенні, при цьому освітленість об'єкту зменшується.

Окуляр з необхідним збільшенням вибирають у залежності від об'єктива і величини корисного збільшення таким чином. Наприклад, при наявності об'єктива із збільшенням 90x та апертурою 1,35 корисне збільшення дорівнюватиме  $1000 \times 1,35 = 1350$  разів. Поділивши 1350 на 90, знаходимо величину максимального збільшення окуляра: 15x. При використанні більш сильних окулярів якість зображення погіршується внаслідок дифракції світла. Від збільшення мікроскопа та апертури об'єктива залежить глибина чіткості зображення. При невеликих значеннях показників збільшення та малій апертурі глибина чіткості зображення є більшою, ніж при великих збільшеннях та високій апертурі.

Об'єктив та окуляр мікроскопа тримаються на *тубусі*, переважно нахиленому. Нормальна довжина тубуса складає 160 мм. Для мікрофотографії нахилений тубус замінюється на вертикальний.

**Механічний вузол** мікроскопа складається із штатива, на якому закріплюються деталі предметного столика і механізмів для фокусування мікроскопа. Грубе і точне фокусування здійснюються відповідно макро- та мікрогвинтами. Дуже обережно слід встановлювати точку фокусування об'єктивів із середнім та великим збільшенням, оскільки вони мають незначні робочі відстані.

## Лабораторна робота №1

### Техніка мікроскопування в цитогенетичних дослідженнях. Методика приготування тимчасових «давлених» препаратів

**Мета:** ознайомитися з найважливішими характеристиками мікроскопа, правилами роботи з ним, методами спостереження за допомогою мікроскопу; оволодіти методикою приготування тимчасових «давлених» препаратів.

**Завдання 1.** Записати числову апертуру об'єктивів та конденсора, збільшення об'єктивів та окулярів. Розрахувати розрішальну здатність мікроскопу, корисне збільшення різних об'єктів.

**Пояснення до завдання 1.** У 1609-1610 рр. італійський вчений Галілео Галілей сконструював оптичний прилад, який складався з об'єктива та окуляра. Німецький вчений Фабер у 1625 р. назвав його **мікроскопом**. Але теорія утворення зображення, поняття про апертуру та розрішальну здатність світлового мікроскопа, розрахунки ахроматичних та алохроматичних об'єктів розроблені у другій половині XIX століття німецьким вченим Аббе на заводі К. Цейса.

Для ознайомлення з процесами, що відбуваються в організмі на клітинному рівні, необхідно вміти користуватися мікроскопом, вибрати необхідне обладнання, метод спостереження. Помилковою є думка, що якість мікроскопа визначається його збільшенням: збільшення є лише технічною характеристикою мікроскопа без відомостей про якість приладу та його призначення. Наприклад, при порівнянні біологічних мікроскопів МБР-3 та МББ-1 розраховують загальне збільшення кожного з них як добуток збільшення об'єктива на збільшення окуляра. У результаті встановлено, що загальне збільшення у першого мікроскопу складає 2020, другого - 1600. Отже, можна припустити, що перший мікроскоп є кращим.

Але перший є робочим, а другий – дослідницьким, який має суттєві кращі відмінності за якістю об'єктів.

**Завдання 2.** Ознайомитися з правилами роботи з мікроскопом.

**Пояснення до завдання 2.** Приступаючи до роботи з мікроскопом, слід дотримуватися таких правил:

1. Для роботи з мікроскопом бажано вибрати кімнату з вікнами, що виходять на північ з метою використання природного розсіяного світла у денний час, запобігаючи попаданню на мікроскоп прямих сонячних променів. Стіл має бути з темною поверхнею, що запобігає перенапруженню очей і забезпечує більш спокійні умови для їх роботи. Дослідник має сидіти прямо і впритул до столу, не відчуваючи напруження під час роботи.
2. Перед роботою видалити пил з мікроскопа м'якою, чистою ганчіркою, поставити його на стіл таким чином, щоб окуляр знаходився навпроти лівого ока (у випадку монокулярного тубуса), при бінокулярній насадці – навпроти очей.
3. Перевірити однаковість збільшення в трубках окулярів.
4. Окулярні трубки розворотом тубусів встановити у відповідність до відстані між очима таким чином, щоб поля зору двох трубок зливалися в одне.
5. Розмістити необхідні реактиви, інструменти, предметні та покривні скельця чи постійні мікропрепарати, олівці, папір праворуч мікроскопу.
6. Переносити мікроскоп слід тільки двома руками: однією рукою слід тримати звивину утримувача тубусу, іншою – підтримувати основу штатива. Слід охороняти мікроскопи від поштовхів, подряпин, кислот, лугів, розчинників, які часто використовуються при приготуванні тимчасових препаратів.
7. Не слід виймати з тубуса окуляр, що не забруднити пилом тубус та об'єktiv. Після кожного переривання роботи з мікроскопом навіть на невеликий час слід вимикати освітлювач, щоб зберегти лампу накалювання від швидкого перегорання.
8. Після закінчення роботи об'єktivи поставити в неробоче положення (мале збільшення), препарати зняти зі столика, мікроскоп протерти та поставити в футляр.

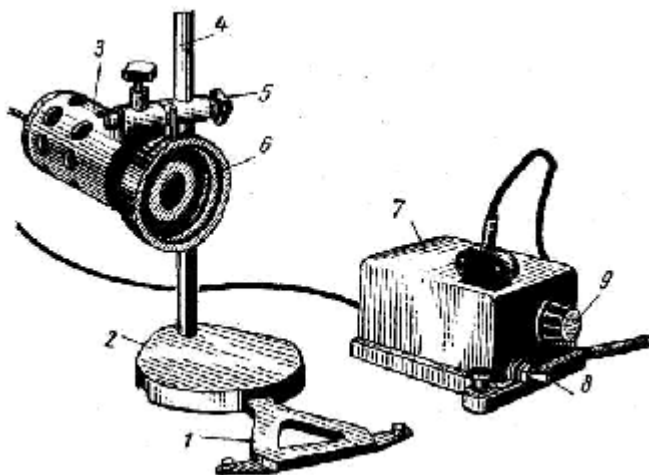
**Завдання 3.** Встановити рівномірне освітлення поля зору мікроскопа.

**Пояснення до завдання 3.** При встановленні освітлення не треба намагатися занадто освітлювати об'єкт, оскільки зайве світло не приймає участь у побудові зображення, але знижує його контраст за рахунок розсіяння та інших причин. Під час освітлення конденсор виконує дуже важливу функцію – збільшує зображення джерела світла для заповнення світловим потоком апертури об'єктива. Дослідник повинен таким чином встановити освітлювач, щоб колектор передав зображення джерела світла на апертурну діафрагму, повністю заповнивши її світлом. Якщо ця умова не виконується, то можливості мікроскопа використовуються не повністю. Найбільш рівномірне освітлення поля зору досягається при установці світла за правилом Келлера: апертура колектора, освітлювача, конденсора, об'єктиву мають бути рівними між собою.

Для рівномірного освітлення поля зору мікроскопа та правильного фокусування світла дотримуються таких правил:

1. Освітлювач (ОІ – 19, ОІ – 9м) встановити перед мікроскопом (МБР-3, МБІ-3) на відстані 25 см від нього (**рис. 1.4**). Зняти матове скло під конденсором та

встановити конденсор у верхнє положення на рівні столика мікроскопа. Світловий потік від освітлювача спрямувати на пласке дзеркальце.



**Рис. 1. 4. – Освітлювач ОІ-9М з трансформатором:** 1 - планка для з'єднання з мікроскопом; 2 - основа освітлювача; 3 - корпус; 4 - стойка; 5 - затискувач; 6 - ірисова діафрагма; 7 - трансформатор; 8 – тумблер для включення лампи освітлювача; 9 – реостат для регулювання накалювання лампи.

2. Сфокусувати мікроскоп на об'єкт, що досліджується, шляхом переміщення тубуса. Діафрагма освітлювача та конденсора при цьому є відкритою.

3. Закрити діафрагму освітлювача і хитанням дзеркала домогтися появи його зображення (світле коло) у полі зору мікроскопу.

4. Домогтися отримати різне зображення отвору діафрагми переміщенням конденсора. Пересунути світле коло у центр поля зору за допомогою дзеркала.

5. Відкрити діафрагму освітлювача таким чином, щоб світле коло трохи виходило за межі поля зору мікроскопу.

6. Видалити окуляр, закрити діафрагму конденсора і дивитися у тубус. Необхідно побачити закриту діафрагму конденсора у вихідній зіниці об'єктива.

7. Відкрити діафрагму доти, поки її отвір не співпаде з межами вихідної зіниці об'єктива. Окуляр вмістити в тубус. Світлофільтр встановити у проріз освітлювача.

8. Об'єktiv малого збільшення відрізняється максимальною робочою відстанню (тобто відстанню від об'єктива до препарату), а також більшим полем зору. Тому дослідження препарату розпочинають завжди з малого збільшення. Надалі змінити об'єktiv на об'єktiv великого збільшення шляхом обертання револьверу за часовою стрілкою і, дивлячись на нього збоку, опустити тубус так, щоб відстань між препаратом і об'єktivом була мінімальною. Після цього грубу установку фокусу провести підйомом тубуса, а тонку - за допомогою мікрометричного гвинта, спостерігаючи за об'єktivом в окуляр. *Під час роботи необхідно ретельно слідкувати за тим, яким гвинтом користуватися при фокусуванні мікроскопа, щоб не розчавити препарат і не зіпсувати об'єktiv.*

9. При знайденні необхідної ділянки препарату за допомогою сильного сухого об'єктива, перейти до спостереження, використовуючи імерсійний об'єktiv. Для цього нанести краплину імерсійної рідини на фронтальну лінзу об'єктива та на препарат, опустити тубус до змикання краплин лінзи та препарату. Фокусування здійснюють мікрометричним гвинтом, який не слід обертати більше ніж на  $\frac{1}{2}$  або

$\frac{1}{4}$  повного оберту. Повну імерсію, тобто нанесення імерсійної рідини не тільки на препарат, але й на конденсор застосовують для більш повного використання апертури.

Після роботи з імерсійним об'єктивом слід протерти його та конденсор спочатку сухою, а потім змоченою у бензині батистовою ганчіркою, ретельно видаливши залишки імерсійної рідини.

10. Під час роботи з мікроскопом важливе значення має товщина покривного і предметного скелець, тому що навіть невелике відхилення від нормальної товщини (норма - 0,17 мм для покривного і 1,2 мм для предметного) негативно впливає на якість зображення сильних високо апертурних об'єктивів. Слід пам'ятати, що кожний об'єктив використовується в конкретних умовах, для яких він призначений. **Не можна міняти об'єктиви у мікроскопів, якщо вони розраховані на різні розміри тубуса.**

**Завдання 4.** Ознайомитися з методами спостережень під мікроскопом. Скласти таблицю:

Метод спостережень	Мета використання	Доступність методу

**Пояснення до завдання 4.** Об'єкти, що досліджує біолог за допомогою мікроскопу, можуть мати різну природу: вони є прозорими та непрозорими, ізотропними та анізотропними, амплітудними та фазовими тощо. Для різних об'єктів, здатних розсіювати світло, використовують різні методи спостереження. При оцінці кожного метода зазвичай враховують два важливих критерії: які питання можна розв'язати цим методом і доступність методу.

**Метод світлого поля** при прямому освітленні є найпростішим методом спостережень. Ним користуються для вивчення прозорих об'єктів, різні ділянки яких неоднаково поглинають світло, що служить основою для створення зображення. Використовують метод для дослідження зрізів тканин рослин і тварин, які монтують на предметних скельцях і вкривають покривним склом, а також забарвлених препаратів в ембріології, цитології, анатомії, цитохімії.

**Метод темного поля** розроблений австрійським вченим Р. Зигмонді, використовується для одержання зображення прозорих об'єктів, зазвичай непомітних при спостереженні у світлому полі: наприклад, для вивчення дрібних органел (мітохондрій), явища коагуляції, зміни дисперсності колоїдів протопласта живих клітин і клітин, що гинуть. Протопласт клітин, що гинуть, яскраво світиться, а протопласт нормальних клітин світиться слабо, крім оболонки. Замість звичайного конденсора при таких дослідженнях використовується темнопольний конденсор ОІ-13, що освітлює предмет збоку. Прямі промені в об'єктив не надходять, фон опиняється темним, яскравість об'єкту досягається розсіяним світлом від окремих його часток.

**Метод фазового контрасту** запропонував використовувати для спостереження прозорих об'єктів голландський фізик Цернике. Метод використовується для спостереження мітозу в живих клітинах, поділу хромосом, мітохондрій; для дослідження дрібних включень та вивчення дії фізичних і хімічних чинників на клітину. Принцип використання методу полягає у виявленні зсування фази світлових коливань, що відбувається внаслідок різної швидкості поширення

світла у середовищах різної щільності. Об'єкти для фазового контрасту має фазову пластинку у вигляді кільця, яка утворюється в результаті розпилення спеціальної речовини, що формує шар завтовшки в декілька десятих мікрометра. Апертурна діафрагма на конденсорі є кільцевою і має такі розміри, щоб її зображення передавалося через конденсор та об'єктив та повністю проектувалося на фазове кільце об'єктива. Ефект фазового контрасту спостерігається у тому випадку, якщо вдається зіставити фазове кільце об'єктива з кільцевою діафрагмою конденсора. Цей метод не змінює розрішальної здатності мікроскопа, але його чутливість збільшується. При цьому слабкі включення прозорих об'єктів, не помітні у світловому полі, дають контрастну інтерференцію з фоном і стають помітними. Для проведення таких досліджень необхідно до біологічного мікроскопа мати фазово-контрастний прилад КФ-4, що складається з фазового конденсора з револьвером, допоміжного мікроскопа, спеціальних об'єктивів на оправі з літерою Ф.

**Метод спостереження у поляризованому світлі** використовується для вивчення об'єктів, які мають подвійне заломлення променів світла, наприклад, структури мітотичного веретена, фібрилярних білків, крохмалю тощо. Для спостереження у поляризованому світлі за допомогою звичайного мікроскопа необхідний поляризатор під конденсором та аналізатор над об'єктивом. Поляризоване світло на відміну від звичайного має коливання хвиль, які поширюються в одному напрямку. При поляризації інтенсивність світла значно зменшується. Від поляризатора світло йде до аналізаторного об'єкта, який має неоднакові оптичні властивості у різних напрямках. Такий об'єкт здатний впливати на поляризоване світло на відміну від аморфних та ізотропних об'єктів. Падаючи на об'єкт, пучок світла розпадається на два промені, поляризовані у взаємно перпендикулярних площинах: один з них заломлюється за оптичними законами (звичайний промінь), інший – проходить через об'єкт з іншою швидкістю. Тому промені виходити з об'єктива будуть неодноразомно. Ці зміни поляризованого світла фіксуються аналізатором, що знаходиться під об'єктивом. Для спостереження у поляризованому світлі можна використовувати барвники: метиленовий синій, акридиновий помаранчевий, риванол тощо.

**Метод флюоресцентної та ультрафіолетової мікроскопії** дозволяє вивчати препарати у світлі, що випромінює сам об'єкт. Широко використовується у цитофізіології, оскільки дозволяє вивчати живі об'єкти, локалізацію різних речовин, патологічні зміни в тканинах тощо. Деякі речовини препарату при освітленні короткохвильовими променями (фіолетовими, ультрафіолетовими та ін.) здатні світитися жовто-зеленим або помаранчевим світлом на темному фоні (власно флюоресценція). Відбувається це тому, що молекули об'єкту переходять після поглинання світла спочатку у збуджений стан, а потім повертаються у нормальний, що супроводжується випромінюванням, яке вже має не коротку, а значно більшу довжину хвилі, характерну для жовто-зеленого або помаранчевого світла. Процес випромінювання світла об'єктом називається *люмінесценцією*.

**Метод спостереження в ультрафіолетових променях.** В таких променях знаходяться спектри поглинання багатьох речовин, що дозволяє вивчити будову і хімічний склад структур клітини на незабарвлених препаратах, кількісний склад нуклеїнових кислот та інших сполук. Окремі речовини препарату мають свій

спектр поглинання, що дозволяє судити про хімічний склад речовин. Так нуклеїнові кислоти не поглинають світло, але здатні поглинати УФ–промені певної довжини хвилі. Шведський вчений Касперсон розробив методику для використання цього явища при аналізі клітинних структур.

**Електронна мікроскопія** не дозволяє вести спостереження за живими об'єктами, але електронні мікроскопи мають високу розрішальну відстань – 50-100 нм (у світловому – 0,24 мкм). Джерелом електронів в електронному мікроскопі просвітлюючого типу є вольфрамова проволока, яку сильно нагрівають електричним струмом. Від катода електрони рухаються до анода, в центрі якого є отвір. Різниця потенціалів між катодом і анодом складає декілька тисяч вольт. Завдяки величезній напрузі електрони набувають великої швидкості. Ця частина мікроскопа називається **електронною гарматою**. За допомогою вакуумної системи у мікроскопі створений безповітряний простір, що забезпечує прямолінійне поширення електронів. З електронного джерела електрони надходять у магнітне поле конденсорної лінзи, яка концентрує їхній потік у вузький пучок. При досягненні об'єкта електрони розсіюються під різними кутами і надходять у лінзу об'єктиву, де створюється первинне збільшене зображення, яке ще раз збільшується проєкційною лінзою. Вона утворює кінцеве зображення, помітне на екрані мікроскопа, що світиться. При цьому зображення фіксується на фотопластинці. Контраст зображення залежить від розсіювання та поглинання електронів об'єктом.

**Завдання 5.** Ознайомитися з принципом дії об'єкт- та окуляр- мікрометра.

**Пояснення до завдання 5.** У дослідженнях часто виникає необхідність у вимірюванні об'єктів під мікроскопом. З цією метою застосовуються спеціальні вимірювальні лінійки, нанесені на круглі скляні пластинки, які вставляються між очною та збиральною лінзами окуляра. Така вимірювальна лінійка отримала назву **окуляр-мікрометра**.

Для вимірювання необхідно поєднати шкалу окуляр-мікрометра з вимірюваним об'єктом, отриману кількість поділок помножити на ціну ділення. Але ціна ділення окуляр-мікрометра – величина непостійна і визначається для конкретного поєднання збільшення об'єктива та окуляра. Ціна ділення окуляр-мікрометра визначається за допомогою об'єкт-мікрометра, ціна ділення якого відома. Об'єкт-мікрометр типу ОМП має шкалу, нанесену на поверхню скляного кола, закладеного в металічну оправу, розміри якої співпадають із розмірами предметного скла. Для визначення ціни ділення окуляр-мікрометра на предметний стіл встановлюють об'єкт-мікрометр. Після суміщення вимірювальних лінійок окуляр- і об'єкт-мікрометра підраховують кількість ділень на лінійці об'єкт-мікрометра і окуляр-мікрометра. Потім ділять перше значення на друге, множать на ціну ділення об'єкт-мікрометра, яка дорівнює 0,01 мм або 10 мк і отримують ціну ділення окуляр-мікрометра для заданого сполучення окуляра та об'єктива:  $C = A \times 10 / B$ , де А – кількість ділень об'єкт-мікрометра; В – кількість ділень окуляр-мікрометра; 10 мк – ціна ділення об'єкт-мікрометра.

**Завдання 6.** Оволодіти методикою приготування тимчасових «давлених» препаратів.

**Пояснення до завдання 6.** Одним з методів досліджень в цитогенетиці є фіксація з наступним забарвленням тканин і клітин. Цим методом можна готувати

постійні та тимчасові препарати. Нині розроблені прискорені методики мікроскопування, зокрема, приготування давлених препаратів, що не вимагає складної обробки матеріалу, яка є обов'язковою при підготовці постійних мікротомних препаратів.

Давлені препарати застосовуються при вивченні мітозу, каріотипів, хромосомних порушень у корінцях і конусах наростання стебел; мейозу в молодих пиляках різних рослин. Для їх приготування використовують **фіксатор Карнуа** – оцтовий алкоголь (6 частин абсолютного спирту + 3 частини хлороформу + 1 частина крижаної оцтової кислоти) або **фіксатор Кларка** – оцтовий алкоголь (3 частини абсолютного спирту + 1 частина крижаної оцтової кислоти). Фарбування препарату можна проводити різними барвниками: ацетокарміном, ацетоорсеїном, ацетолакмоїдом, метиленовим синім. Найчастіше використовують для фарбування ацетокармін, приготовлений наступним чином: 1г карміна розчиняють в 45 мл крижаної оцтової кислоти і 55 мл дистильованої води. Розчинення ведеться в колбі на водяній бані протягом 30-60 хвилин. Після охолодження розчин карміну фільтрують і поміщають в посуд з притертою пробкою.

Приготування давлених препаратів відбувається в такій послідовності:

1. Зафіксувати матеріал в оцтовому алкоголі.
2. Промити матеріал в 70%-ному спирті до зникнення запаху оцтової кислоти.
3. Зберігати матеріал в 70%-ному спирті.
4. Промити матеріал у воді.
5. Занурити матеріал у барвник на 3-5 хвилин і підігріти на спиртівці (об'єкт доводити до кипіння).
6. Пофарбований об'єкт покласти на предметне скло в краплю 45%-ної оцтової кислоти або розчин хлоралгідрату, покрити покривним склом і фільтрувальним папером, постукати зверху сірником або злегка розчавити пальцем до утворення мазка.

Приготовлені препарати можна окантувати парафіном, лаком (для їх більш тривалого використання).

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

### Відповіді на запитання тестових завдань:

1. Чим усуваються аберації при спостереженні в мікроскоп?
  - 1) об'єктивами спеціальної конструкції
  - 2) предметним столиком
  - 3) конденсорами
2. Основні типи аберацій ...
  - 1) нумеричні
  - 2) кривизна поля зору, хроматизм
  - 3) воскові.
3. Барвники, що використовуються для тимчасових препаратів при вивченні поділу клітин, спорогенезу:
  - 1) кармін
  - 2) сірчаноокислий анілін
  - 3) гематоксилін
4. Тимчасові препарати готуються за допомогою ....
  - 1) мікротомом
  - 2) зрізання лезом
  - 3) роздавлювання.

## Лабораторна робота №2

### Аналіз каріотипів. Будова метафазної хромосоми.

### Каріограма хромосом людини

**Цитогенетичний метод** досліджень ґрунтується на вивченні спадкового матеріалу клітини: особливостей хромосом (каріотипування), наявності та кількості Х-хромосом (визначення кількості грудочок статевого хроматину - тілець Барра). Дослідження каріотипу дає змогу виявляти мутації, спричинені зміною кількості хромосом, їх структури. Каріотип досліджують у клітинах на стадії метафази, коли структура хромосом виражена найчіткіше. Цей метод застосовують і в систематиці організмів (каріосистематика). Так, багато видів-двійників (видів, які важко розпізнати за іншими особливостями) розрізняють за хромосомним набором.

**Мета:** ознайомитися з каріотипами різних видів організмів, життєвим циклом клітин, механізмами регуляції клітинного циклу; особливостями будови хромосом; каріограмою хромосом людини та можливостями її використання.

**Матеріал та обладнання:** мікроскопи «Біолам»; постійні цитологічні препарати: “Політенні хромосоми дрозофіли”, “Дроблення яйцеклітини”. Дидактичні картки: “Каріотипи видів рослин, тварин, людини”.

**Завдання 1.** Вивчити різноманітність каріотипів рослин і тварин на постійних мікропрепаратах з метафазними пластинками (збільшення 15x40). При аналізі каріотипу людини звернути увагу на різноманітність форм і розмірів хромосом. Порівняти число хромосом в клітинах курки ( $2n = 78$ ) і людини ( $2n = 46$ ), таргана ( $2n = 48$ ) і шимпанзе ( $2n = 48$ ) і скласти висновок про наявність зв'язку між кількістю хромосом у каріотипі та рівнем організації організму. Замалювати каріотипи скерди (*Crepis capillaris* L.) і дрозофіли (*Drosophila melanogaster*), знайти пари гомологічних хромосом, описати їх морфологічні ознаки (рис.1).

**Пояснення до завдання 1. Каріотип** — сукупність ознак (число, розміри, форма хромосом; форма, кількість і величина вторинних перетинок; розподіл гетеро- та еухроматину) диплоїдного набору хромосом, властива соматичним клітинам певного виду (*видовий каріотип*), даного організму (*індивідуальний каріотип*) або лінії (*клону*) клітин (**рис. 1.5**). Каріотипом іноді називають і візуальну картину повного хромосомного набору - **каріограми**. Термін «каріотип» введений в науку в 1924 році цитологом Г. А. Левитським. Зовнішній вигляд хромосом суттєво змінюється протягом клітинного циклу: впродовж інтерфази ядерні хромосоми зазвичай деспіралізовані та важкодоступні для спостереження. Тому для визначення каріотипу використовують клітини та стадії метафази мітозу. Для процедури визначення каріотипу використовують будь-які популяції клітин, що діляться.

*Примітка.* Найменша кількість хромосом у каріотипі аскариди кінської – *Parascaris megaloccephala univalenus* ( $2n = 2$ ), найбільша – в каріотипі найпростіших, папоротей ( $2n = 300$ ), річкового рака ( $2n = 116$ ). Самки підвиду мурах *Myrmecia pilosula* мають пару хромосом на клітину. Самці мають тільки одну хромосому в кожній клітині. Вид папоротей *Ophioglossum reticulatum* має близько 630 пар хромосом, или 1260 хромосом на клітину. Верхня межа кількості хромосом не залежить від кількості ДНК, яке в них міститься: в американській амфібії *Ampibia* ДНК у приблизно 30 разів більше, ніж у людини, і міститься в 14 хромосомах.



Каріотип вивчають і описують у метафазі мітозу. Парні, морфологічно однакові хромосоми, котрі одержує зигота від материнського та батьківського організмів, називаються **гомологічними**. Гомологічні хромосоми є однаковими за величиною і формою, розміщенням центромір, порядком розташування хромомір і міжхромомірних ниток, розміщенням гетерохроматинових ділянок. У цьому сутність *індивідуальності хромосом каріотипу*.

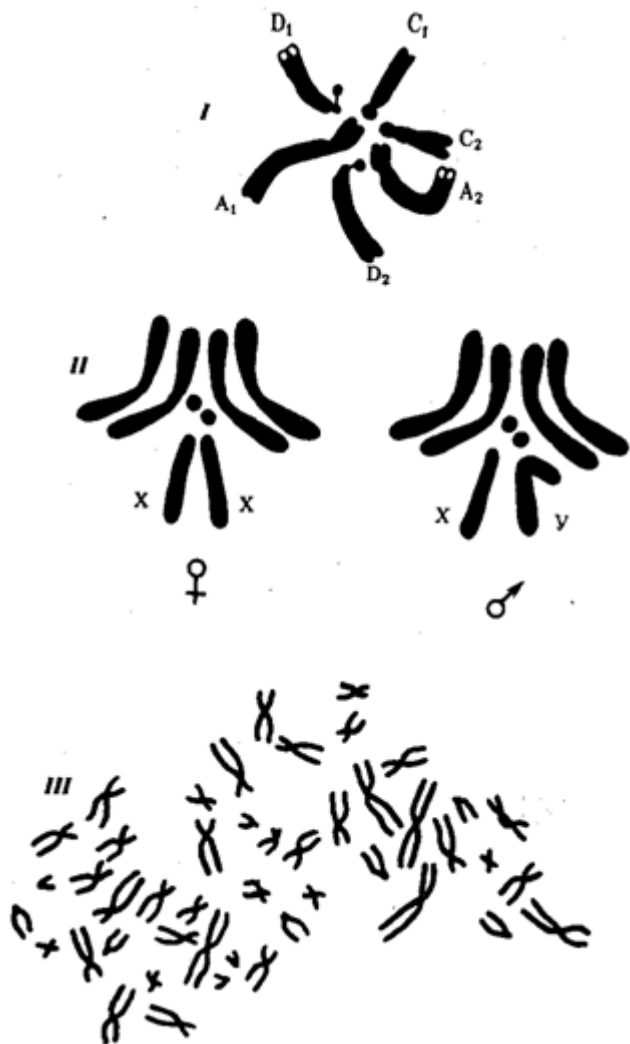


Рис. 1.5. - Каріотипи різних видів організмів: I- скерди; II –дрозофіли; III – людини

У каріотипах вищих організмів розрізняють аутосоми та статеві хромосоми. У каріотипі різностатевих організмів є пара гомологічних хромосом, що відрізняється за морфологією та генним набором – **статеві хромосоми** (X та Y). Всі інші морфологічно однакові хромосоми називаються **аутосомами**, які є гомологічними (під час ідентифікації позначаються одним номером).

Для ідентифікації хромосом використовують **кількісний морфометричний аналіз**, за допомогою якого проводять вимірювання їх довжини в мікрометрах, та визначають відношення довжини короткого плеча до довжини всієї хромосоми - **центромерний індекс**.

**Завдання 2.** 1) Замалювати типи метафазних хромосом (рис. 1.6). Визначити, за яким принципом розрізняють морфологічну будову хромосоми. 2) Розглянути та замалювати будову метафазної хромосоми (рис. 1.7), позначити розміщення центроміри, хроматид, хромонем, хромомір, ядерцевого організатора, вторинної

перетинки, матриксу. Навести відмінні риси гетеро- та еухроматину. 3) Замалювати різні рівні компактизації хроматину (рис. 1.8).

**Пояснення до завдання 2.** У хромосомах розрізняють первинну перетинку (центромеру), яка поділяє хромосому на два плеча. На центромері розміщений **кинетохор** або **первинна перетинка хромосоми** (грецьк. kinesis – рух, phoros–той, що несе), що є її механічним центром, місцем, де прикріплюються нитки веретена поділу у метафазі мітозу та мейозу. Форму метафазної хромосоми визначає розміщення центромери на хромосомі (рис. 6).



**Рис. 1.6.** - Різні типи метафазних хромосом: 1,7 - метацентричні (рівноплечі); 2- субметацентрична (слабко нерівноплечі); 3, 4, 5 - акроцентричні (різко нерівноплечі); 6 - телоцентрична (центромера майже на кінці хромосоми; в нормальних каріотипах такі хромосоми не зустрічаються); 8 - акроцентрична з вторинною перетинкою; 9 – супутникова. Центромери позначені світлим кольором.

Існують хромосоми, які, крім первинної перетинки, містять ще одну – **вторинну перетинку**, де формується ядрце. У деяких хромосом завдяки цьому невелика ділянка опиняється відокремленою від основної маси хромосоми тонкою ниткою. Така відокремлена ділянка називається **супутником**, а сама хромосома – **супутниковою**. Саме ці ділянки у хромосомах еукаріотів, в тому числі людини, є **ядерцевими організаторами**. У людини вторинні перетинки існують на довгому плечі 1, 9, 16 хромосом та на кінцевих ділянках коротких плеч 13-15-ої та 21-22-ої хромосом.

Кінці плечей хромосом – **теломери** - є спеціалізованими ділянками, які запобігають з'єднанню хромосом між собою або з їхніми фрагментами. Кінець хромосоми, позбавлений центромери, опиняється «ненасиченим», «липким» і легко приєднує фрагменти хромосом або з'єднується з такими ж ділянками. У нормі теломери запобігають таким процесам і зберігають хромосому як дискретну індивідуальну одиницю.

**Хромосома** (грецьк. chroma–колір, soma–тіло) може знаходитися в двох структурно-функціональних станах: у конденсованому (спіралізованому) та деконденсованому (не спіралізованому). Речовиною хромосом є **хроматин** - дезоксирибонуклеопротейновий комплекс (ДНП), тобто комплекс ДНК, РНК і білків. Хроматин знаходиться в ядрі клітин еукаріот і входить до складу нуклеоїду прокаріот. Саме в складі хроматину відбувається реалізація генетичної інформації, а також реплікація та репарація ДНК.

Комплекс ДНК з основним білком - гістоном складає близько 90% речовини хромосоми. До складу хромосоми входять також РНК, кислі білки, ліпіди, мінеральні речовини (іони  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ ). У хромосомах присутній також фермент ДНК-полімераза, необхідний для реплікації ДНК. *Вміст ДНК у розрахунку на гаплоїдний набір хромосом є постійним для клітин усіх тканин даного виду організмів.*

Послідовні рівні компактизації хроматину в хромосомі представлені на **табл. 1.1.** і **рис. 1.7.**

Таблиця 1.1

**Послідовні рівні компактизації хроматину в хромосомі**

Рівні компактизації хроматину	Ступінь вкорочення ДНК у порівнянні з:		Діаметр, нм
	передньою структурою	деспіралізованою ДНК	
Деспіралізована ДНК	1	1	1 - 2
Нуклеосомна нитка	7	7	10
Елементарна фібрила	6	42	20-30
Інтерфазна хромонема	40	1600	100-200
Метафазна хроматида	5	8 000	500-600

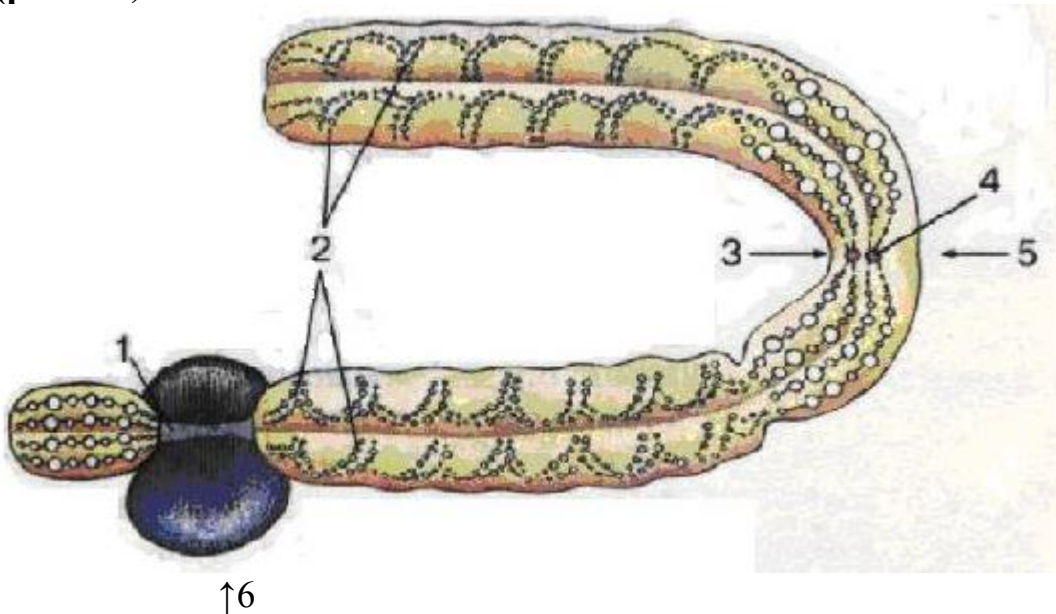


**Рис. 1.7.** – Рівні конденсації хроматину (по порядку згори донизу): 1 – подвійний ланцюг ДНК; 2 - нуклеосома; 3 – хроматинова фібрила; 4 – хроматинові петлі; 5 – конденсована ділянка метафазної хромосоми; 6 – метафазна хромосома

У клітині, що не ділиться, хромосоми не помітні, знайдені лише глибокі і гранули хроматину, оскільки хромосоми частково або повністю деконденсуються. Це їхній неробочий стан. Чим більше хроматин стає дифузним, тим інтенсивнішими є процеси синтезу, що відбуваються в ньому. Перед самим поділом спостерігається конденсація (спіралізація) хроматину, під час мітозу хромосоми стають добре помітними.

Крім звичайних хромосом, у деяких клітинах (наприклад, мальпігієвих судин імаго або слинних залоз личинок двокрилих комах) знайдені *гігантські (політенні) хромосоми*, утворені в результаті ендомітозу. В овоцитах ссавців виявлена ще й інша група хромосом – *хромосоми типу лампових щіток*, які мають центральну вісь і бокові вирости.

Фібрили ДНК попарно скручуються, утворюючи нуклеопротейдні нитки – *хромонеми* (гр.пета – струна), що складаються з мікрофібрил, помітних лише в електронний мікроскоп. Хромонеми входять до складу комплексу більш високого порядку – спіралью закручені *напівхроматиди*. У метафазі мітозу добре помітно, що парні напівхроматиди формують *хроматиду*, а пара хроматид – хромосому (рис. 1.8).



**Рис. 1.8.** - Схема будови метафазної хромосоми: 1- вторинна перетяжка; 2 – хроматиди; 3 – кинетохор (первинна перетяжка); 4 – центромера; 5 – місце прикріплення веретена поділу; 6 - ядрце

На парних *напівхроматидах* розміщені *хромомери* - щільно спіралізовані ділянки хромонем, які чергуються із міжхромомерними ділянками. Найчіткіше вони виявляються на стадії лептотени профазі I мейозу.

Після розходження до полюсів клітини в анафазі мітозу та анафазі II мейозу хроматиди вихідної хромосоми стають самостійними сестринськими хромосомами, а напівхроматиди – хроматидами сестринських хромосом.

Від ступеню скручування нитчастих структур хромосоми залежить її довжина. На різних ділянках тієї ж хромосоми спіралізація та компактність її основних елементів є неоднаковою, з цим пов'язана різна інтенсивність забарвлення окремих ділянок хромосоми. Інтенсивно забарвлені *гетерохроматинові ділянки* хромосоми навіть у період між поділами клітини залишаються компактними, помітними у світловий мікроскоп; вони утворюють хромоцентри в ядрі на стадії інтерфази, а також ділянки інтенсивного забарвлення на метафазних хромосомах. Такі ділянки хромосом у профазі з'являються раніше інших частин у складі мітотичних хромосом, у телофазі не деконденсуються, переходячи в інтерфазне ядро в вигляді інтенсивно забарвлених щільних структур - *хромоцентрів*.

Особливістю гетерохроматину є транскрипційна інертність ДНК, що входить до його складу. Розрізняють гетерохроматин конститутивний і факультативний.

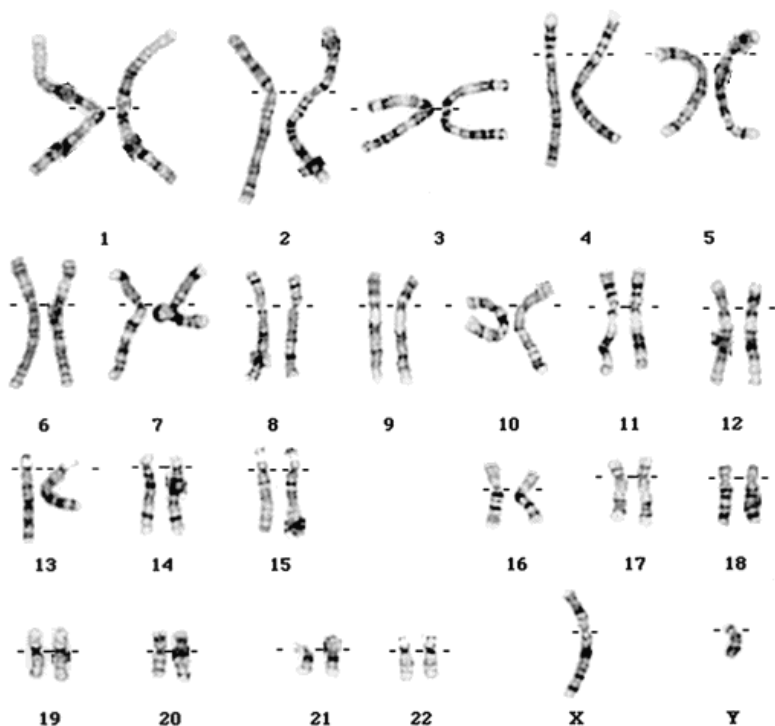
**Конститутивний** (синоніми: *структурний, облігатний*) **гетерохроматин** залишається компактним протягом всього клітинного циклу, не має генів, представлений *сателітними ДНК*. Такі ділянки хромосом пізно реплікуються, не транскрибуються, складаються переважно із часто повторюваних, не кодуєчих послідовностей. Такий гетерохроматин знаходиться у місцях локалізації *центромер* і *теломер*. Усі клітини даного виду упаковують у конститутивний хроматин ті ж самі ділянки ДНК (наприклад, у людини - хромосома 1, хромосома 9, хромосома 16 та хромосома Y містять значні ділянки конститутивного гетерохроматину). Крім них постійно конденсованими можуть бути також деякі ділянки, що входять до складу плечей хромосом – *вставковий* або *інтеркалярний гетерохроматин*; в ядрах він також представлений у вигляді хромоцентрів. Отже, конститутивний гетерохроматин генетично не активний, не транскрибується, реплікується пізніше решти хроматину; до його складу входить сателітна ДНК, збагачена високоповторюваними послідовностями нуклеотидів; локалізований у центромерних, теломерних і інтеркалярних зонах мітотичних хромосом. Частка конститутивного хроматину може бути неоднаковою в різних організмів. Функціональне значення конститутивного гетерохроматину до кінця не з'ясоване. Припускають, що він виконує ряд важливих функцій: регуляторну функцію, парування гомологів у мейозі, структурування інтерфазного ядра.

**Факультативний гетерохроматин** формується в результаті перетворення еухроматину в неактивний конденсований стан. Прикладом факультативного гетерохроматину є X-хромосома в організмі людини. У клітинах чоловіків X-хромосома деконденсована, активна, транскрибується та морфологічно не виявляється внаслідок свого рихлого, дифузного стану. В ядрах клітин жіночого організму, де присутні дві X-хромосоми, одна з них знаходиться в активному, дифузному стані, інша – в неактивному, конденсованому, тимчасово гетерохроматизованому. У такому стані вона існує протягом всього життя організму. Але нащадки цієї хромосоми, потрапляючи в клітини чоловічого організму наступного покоління, знову будуть активованими. У диференційованих клітинах тільки приблизно 10% генів знаходиться в активному стані, решта генів інактивовані та входять до складу конденсованого факультативного гетерохроматину.

Вся інша, основна маса хроматину ядра може змінювати ступінь своєї компактизації у залежності від функціональної активності; вона відноситься до еухроматину. **Еухроматинові ділянки хромосоми** є слабо забарвленими, деконденсуються в періоди між поділами клітини та стають непомітними. Еухроматин відрізняється від гетерохроматину також здатністю до інтенсивного синтезу рибонуклеїнової кислоти (РНК) та більшим вмістом негістонових білків. Крім ДНП, еухроматин містить рибонуклеопротеїдні частки - *РНП-гранули* - діаметром 200—500 нм, необхідні для завершення дозрівання РНК і перенесення її в цитоплазму. Ця обставина пояснює, чому більша частина хроматину ядра структурована. Вважають, що еухроматин містить структурні гени, а гетерохроматин виконує переважно регуляторну функцію.

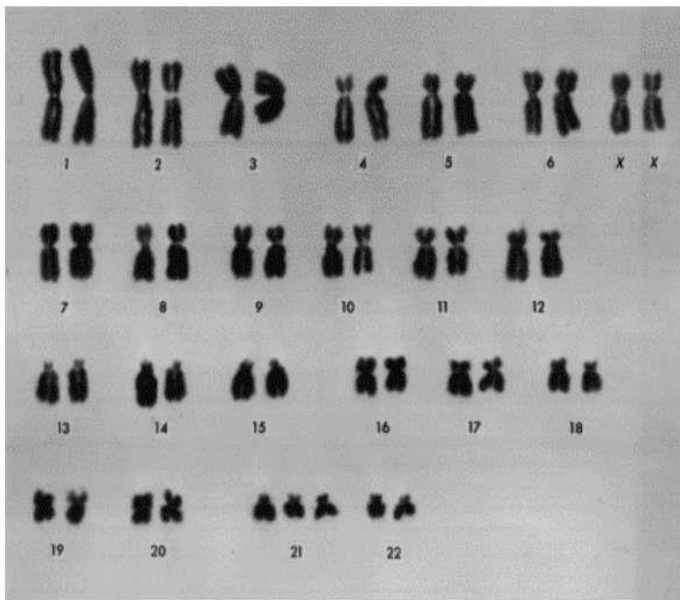
**Завдання 3.** 1) Розглянути каріограму хромосом людини в нормі (рис. 9), з'ясувати, в яких випадках вона використовується в медичній практиці. 2) Порівняти каріотипи людини на рис. 1.9 та рис. 1.10, знайти порушення в кількості хромосом, назвати хромосомне захворювання, спричинене нерозходженням хромосом. 3) Переписати в зошит міжнародну (Денверську) класифікацію хромосом (табл.1.2). 4) Замалювати схему сегментації X-хромосоми людини при диференційному забарвленні (в відповідності до номенклатури ISCN - 1995), проаналізувати рисунок поперечної смугастості (рис. 1.11).

**Пояснення до завдання 3.** *Каріограма, або ідіограма* – графічне зображення каріотипу; систематизований набір хромосом клітини з розміщенням їх у порядку зменшення величини. Складання каріограм, як і сам термін, запропонований цитологом С.Г. Навашиним (1857–1930). Каріограма є своєрідним «паспортом» виду, який дозволяє виявляти порушення структури або кількості хромосом каріотипу. Зокрема, каріограма хромосом людини широко використовується в практиці медико-генетичного консультування (МГК) для діагностики хромосомних захворювань. Порівняння ідіограм хворої людини та здорового індивідууму дозволяє лікарям-генетикам виявити хромосомні порушення та поставити правильний діагноз. На рис. 9 представлена каріограма хромосом здорової людини, на рис. 10 – каріограма хромосом дівчинки з синдромом Дауна (трисомія 21-ої аутосоми).



**Рис. 1.9.** – Каріограма хромосом людини в нормі

Каріотип людини в нормі включає 46 хромосом, з них 22 пари аутосом та 2 статеві хромосоми. Це відкриття здійснили у 1956 році шведські вчені Д.Тійо та А. Леван.



Ідіограма людини, хворої на синдром Дауна (+21)

Рис. 1.10. – Ідіограма (каріограма) дівчинки з хворобою Дауна

Для цитогенетичного аналізу хромосом (каріотипування) та побудови каріограми найчастіше використовують лімфоцити периферичної крові, які культивують *in vitro* та провокують фітогемагглютиніном перехід їх від стадії спокою  $G_0$  до проліферації (поділу). Для збільшення кількості метафазних клітин до клітинної культури щойно перед фіксацією додають колхіцин або нокадазол, котрі блокують утворення мікротрубочок, тим самим запобігаючи розходженню хроматид до полюсів клітин і завершенню мітозу. Колхіцин – речовина, яку виготовляють із клітинного соку рослини пізньоцвіт осінній (родина *Liliaceae*) (рос. безвременник осенній). Надалі клітини обробляють гіпотонічним розчином хлориду натрію, що супроводжується набуханням і розривом клітинних мембран. При цьому хромосоми опиняються вільно розміщеними на деякій відстані одна від одної у вигляді метафазної пластинки, що дає можливість підрахувати їх і досліджувати. Після фіксації препарати метафазних хромосом забарвлюють і фотографують; із мікрофотографій формують так званий *систематизований каріотип*, або *каріограму (ідіограму)* — нумерований набір пар гомологічних хромосом. Зображення хромосом при цьому орієнтуються вертикально короткими плечами догори, їхня нумерація проводиться в порядку зменшення розмірів, пара статевих хромосом розміщується в кінці набору (рис. 9 та рис. 10).

Зазвичай хромосоми класифікують за розмірами в каріотипі, за положенням центромери та іншими особливостями. Рішенням конференцій з хромосом людини в м. Денвер (США) (Denver conference, 1960) та в Лондоні (London conference, 1966) була створена система, за якої пари аутосом пронумеровані від 1 до 22 в порядку зменшення їх довжини та розділені на сім груп від А до G (табл. 2). Пара статевих хромосом позначена символами X і Y.



Відношення хромосом до групи метацентричних, субметацентричних, акроцентричних здійснюється на основі розрахунку *центромерного індексу* - співвідношення довжини короткого плеча до довжини всієї хромосоми. У групі метацентричних хромосом короткі і довгі плечі приблизно рівні, центромерний індекс наближається до 0,5; в субметацентричних хромосомах він становить від 0,25 до 0,35, в акроцентричних - не перевищує 0,2.

Таблиця 1.2

**Денверська класифікація хромосом людини**

Група	Номер за каріотипом	Характеристика хромосом
<b>A</b>	<b>1-3</b>	1 і 3 метацентричні, 2 – субметацентрична; всі великі
<b>B</b>	<b>4-5</b>	Великі субметацентричні
<b>C</b>	<b>6-12, X</b>	Середні субметацентричні; X-хромосома закінчує реплікацію ДНК пізніше інших хромосом
<b>D</b>	<b>13-15</b>	Середні акроцентричні, мають супутники
<b>E</b>	<b>16-18</b>	Дрібні субметацентричні, 18- акроцентрична
<b>F</b>	<b>19-20</b>	Найдрібніші метацентричні
<b>G</b>	<b>21-22, Y</b>	Найдрібніші акроцентричні із супутниками; Y-хромосома дещо довша та має на довгому плечі вторинну перетяжку

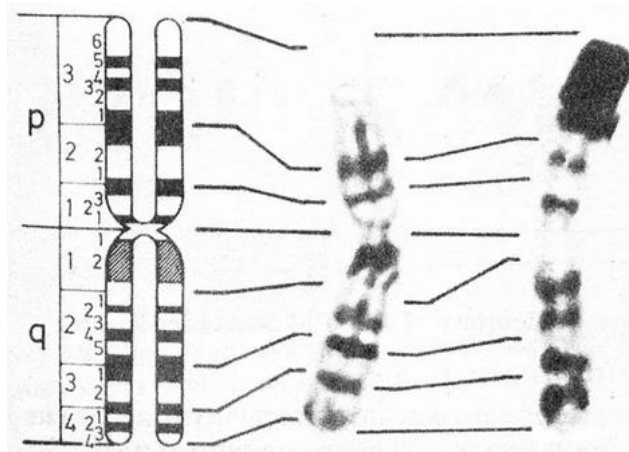
Отже, цитогенетичний метод у медичній практиці використовують для вивчення нормального каріотипу людини, а також при діагностиці спадкових захворювань, спричинених геномними та хромосомними мутаціями. Крім того, цей метод застосовують при дослідженні мутагенної дії хімічних речовин, пестицидів, інсектицидів, лікарських препаратів. Розробка спеціальних методів забарвлення значно спростила розпізнавання всіх хромосом людини, а в сукупності з генеалогічним методом і методами клітинної і генної інженерії дала можливість встановлювати місце розміщення генів в конкретних ділянках хромосом. Комплексне застосування цих методів лежить в основі складання карт хромосом людини.

На початку 70-х років ХХ століття розроблений *метод диференційного забарвлення хромосом*, який виявляє характерну сегментацію, що дозволяє індивідуалізувати кожну з них (**рис. 11**). Різні типи сегментів позначають у відповідності з методами, за допомогою яких вони виявляються найбільш виразно (Q-сегменти, G-сегменти, T-сегменти, S-сегменти). Кожна хромосома людини містить властиву тільки їй послідовність смуг, що дозволяє ідентифікувати кожну хромосому. Нині існують ДНК-маркери або зонди, за допомогою яких можна визначити зміну певного, навіть дуже маленького, сегмента в хромосомі, що дозволяє побудувати її цитологічну карту.

На міжнародному конгресі генетики людини в Парижі в 1971 р. (Паризька конференція з стандартизації і номенклатури хромосом людини) була узгоджена система символів для більш стислого і однозначного позначення каріотипів. При описі каріотипу вказується: загальне число хромосом і набір статевих хромосом, між ними ставиться кома (46, XX; 46, XY); зазначається зайва хромосома або якої



хромосоми не вистачає (це вказується її номером 5, 6 і т.д. або літерами даної групи А, В і т.д.); знаком «+» вказують на збільшення кількості хромосом, знаком «-» - на відсутність даної хромосоми; плече хромосоми, в якому відбулася зміна (подовження короткого плеча вказується позначкою р+; вкорочення - р-; подовження довгого плеча зазначається символом (q+); укорочення (q-); символи хромосомних перебудов (транслокація позначається t, делеція - del) знаходяться перед номерами хромосом, а перебудовані хромосоми укладають в дужки.



**Рис. 1.11.** – Сегментація Х-хромосоми людини внаслідок диференціального забарвлення: р – коротке плече; q – довге плече; в р і q плечах виділяються та нумеруються райони (від центромери до теломери), які складаються із сегментів – світлих і темних смуг (нумерація сегментів також йде від центромери). Сегмент можна умовно прийняти за ген

Наявність двох структурно-аномальних хромосом позначається крапкою з комою (;) або дробом (15/21).

*Примітка:* Система запису каріотипів:

- 46, XX — нормальний каріотип (жінка)
- 46, XY — нормальний каріотип (чоловік)
- 45, X — синдром Шерешевського-Тернера
- 47, XXУ — синдром Клайнфельтера
- 47, XXX — синдром «трисомії Х»
- 47, ХУУ — синдром Вай-Вай
- 47, XX, + 21 — синдром Дауна (жінка)
- 47, ХУ, + 21 — синдром Дауна (чоловік)
- 47, XX, + 18 — синдром Едвардса (жінка)
- 47, ХУ, + 18 — синдром Едвардса (чоловік)
- 47, XX, + 13 — синдром Патау (жінка)
- 47, ХУ, + 13 — синдром Патау (чоловік)
- 46, XX, t (9/22) — хронічний мієлолейкоз (жінка)
- 46, ХУ, t (9/22) — хронічний мієлолейкоз (чоловік)
- 46, XX, t (15/21) — транслокаційна форма синдрому Дауна (жінка)
- 46, ХУ, t (15/21) — транслокаційна форма синдрому Дауна (чоловік)
- 46, XX, del (5p-) — синдром кошачого крику (жінка)
- 46, ХУ, del (5p-) — синдром кошачого крику (чоловік)
- 46, XX, del (13q-) — синдром Орбелі (жінка)
- 46, ХУ, del (13q-) — синдром Орбелі (чоловік)

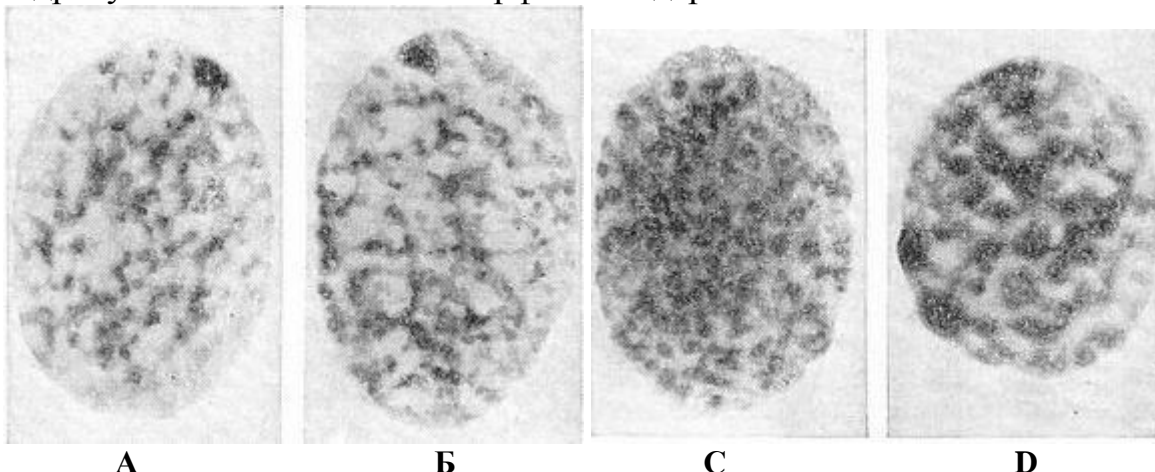
Сегменти і райони метафазної хромосоми позначаються цифрами, центромера слугить вихідною точкою для цифрової схеми. При визначенні локалізації гена

використовують 4 критерії: номер хромосоми, символ плеча, номер району та номер сегмента в межах цього району. Наприклад, запис 1p32 означає, що мова йде про хромосому першої пари, коротке плече, район 3, сегмент 2.

**Завдання 4.** Оволодіти методикою визначення статевих хроматинів.

**Хід виконання завдання 4:**

1. Зробити зіскоб із слизової оболонки порожнини рота (з внутрішньої поверхні щічки). Зіскоб беруть невеликим стерильним шпателем.
2. Зіскоб (білуватий наліт) розмазати якомога рівніше посередині предметного скла.
3. Для фіксації клітин мазок вмістити в 96%-ний спирт.
4. Через 15-20 хвилин мазок підсушити на повітрі, його можна зберігати невизначено тривалий час.
5. На мазок нанести одну-дві краплини ацеторсеїну (або ацетокарміну) та покласти покривне скельце. Через 2-5 хвилин препарат можна розглядати під мікроскопом.
6. Дослідити препарат спочатку при малому збільшенні, а потім з імерсією. У полі зору мікроскопа добре помітні ядра клітин округлої й овальної форми з чітко помітною оболонкою. Враховують тільки інтерфазні ядра з дещо структурною дрібнозернистою нуклеоплазмою (**рис. 1.12**). Ядра, що знаходяться в профазі, не враховують. Вони відрізняються грубим скупченням хроматину.
7. Встановити процент клітин, які містять статевий хроматин. При цьому слід підрахувати не менше 100 інтерфазних ядер.



**Рис. 1.12.** - Статевий хроматин в інтерфазних ядрах клітин людини: А, Б - ядра, що містять статевий хроматин (зіскоб із слизової оболонки порожнини рота здорової жінки); С - ядро, що не містить статевий хроматин (зіскоб із слизової оболонки порожнини рота здорового чоловіка); D - ядро, що містить подвійний статевий хроматин (зіскоб із слизової оболонки порожнини рота хворої на трисомію X) (забарвлення ацеторсеїном; x 1100)

**Пояснення до завдання 4.**

Досліджуючи інтерфазні клітини буккального епітелію слизової оболонки щічки та підраховуючи кількість грудочок статевих хроматинів у них, можна визначити кількість X-хромосом у каріотипі. У жінок статевий хроматин виявляється в 20-60% ядер; у решті ядер він не виявляється в зв'язку з мітотичним станом клітин. Кількість брилок статевих хроматинів у клітинах у нормі дорівнює кількості X-хромосом мінус одиниця. Отже, в жінок в нормі в кожному ядрі повинно бути одне тільки статевих хроматинів. У здорових чоловіків статевих хроматинів у клітинах практично не може бути (в окремих випадках буває незначна кількість). У чоловіків в нормі існує також Y-статевий хроматин (довге плече Y-хромосоми),

який виявляється за допомогою люмінесцентної мікроскопії і має вигляд яскравої плями діаметром 0,3-1 мкм. Зміна числа грудочок статевого хроматину відбувається при геномних мутаціях (при зміні кількості X - та Y-хромосом). В умовах патології можуть змінюватися розміри тілець статевого хроматину, а також їх кількість у кожному ядрі і в середньому на 100 ядер.

**Тільце Барра, або статеий хроматин** є результатом гетерохроматизації однієї з двох X-хромосом жінок (факультативний гетерохроматин). Цей процес відбувається в ранньому ембріогенезі, під час імплантації ембріону в стінку матки і називається **лайонізацією**. За гіпотезою британської дослідниці М. Лайон (1962 р.), іменем якої названий цей механізм, інактивація статевої хромосоми здійснюється випадково (інактивованою може бути або батьківська, або материнська X-хромосома), захоплює всю X-хромосому та характеризується стабільністю, передаючись клітинним нащадкам.

Визначення статевого хроматину використовують як експрес-метод при пренатальному і постнатальному визначенні статі та при діагностиці хромосомних захворювань. Метод пренатальної діагностики полягає в отриманні навколоплідної рідини, де знаходяться клітини плоду, та в подальшому біохімічному і цитологічному визначенні можливих спадкових аномалій. Це дозволяє поставити діагноз на ранніх термінах вагітності та прийняти рішення про її продовження чи переривання.

У постнатальному онтогенезі наявність статевого хроматину встановлюють при цитологічному визначенні статі (наприклад, у випадку гермафродитизму); для виявлення хромосомних хвороб (синдрому Шерешевського-Тернера, для якого характерна відсутність статевого хроматину в жінок; синдрому Клайнфельтера, при якому в чоловіків виявляють статеий хроматин; синдром трисомії X, при якому в ядрі замість одного тільця статевого хроматину виявляють два); у випадку низки патологічних процесів, зокрема злоякісних (для вирішення питання щодо виду гормональної терапії при виявленні раку молочної залози); для одержання характеристики дії фармакологічних засобів (наприклад, кортикостероїдів, здатних змінювати кількість клітин, що містять статеий хроматин).

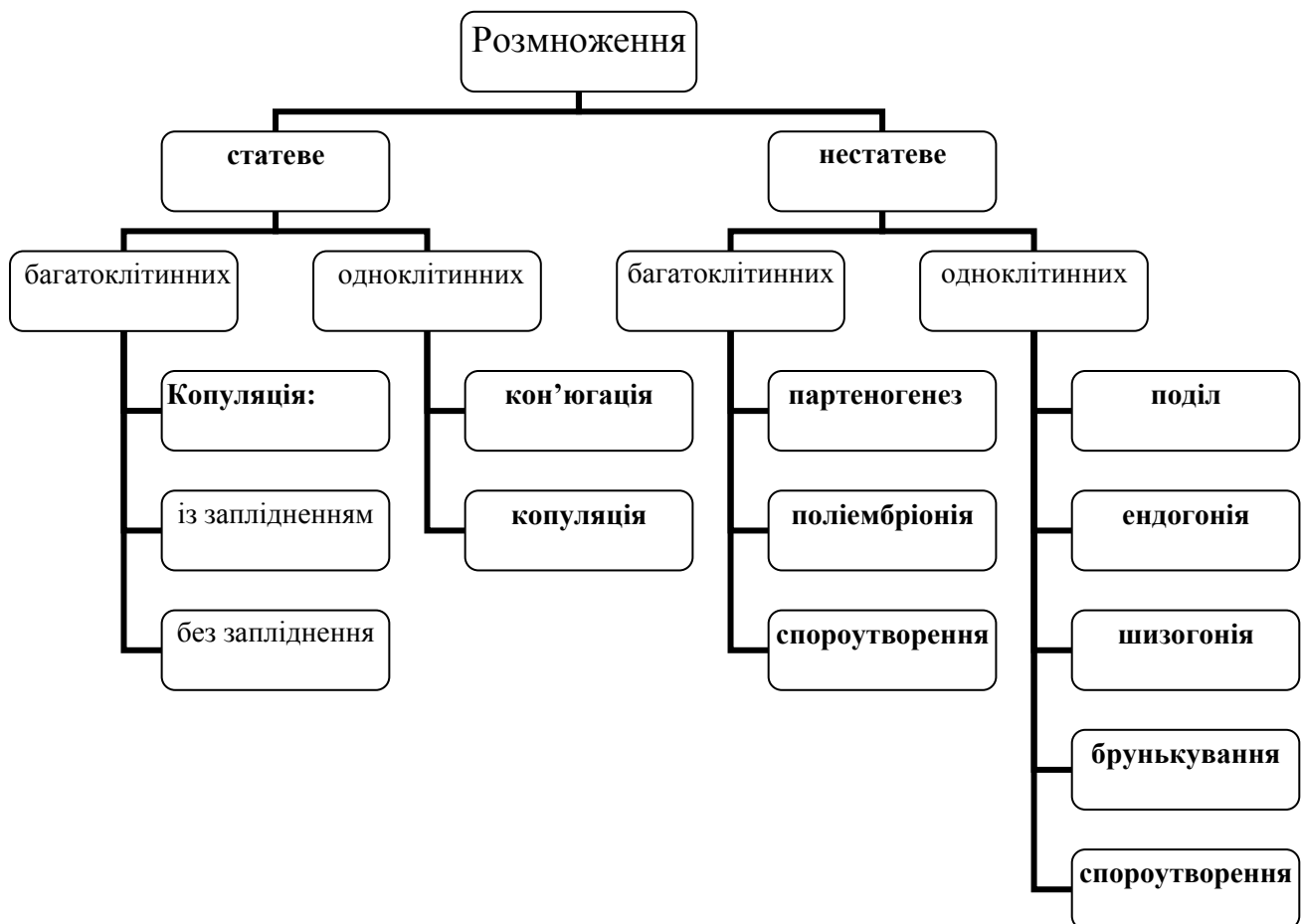
### **ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ**

1. Чи можна визначити, якому організму належить тканина, якщо на її основі приготувати мікропрепарат так, щоб у клітинах були добре помітні хромосоми? Чим це можна пояснити?
2. Як називається сукупність хромосом ядра?
3. Яка структура здійснює контроль за життєдіяльністю клітин під час інтерфази?
4. Чому на початку ХХ століття хромосоми стали ототожнювати із спадковими факторами?
5. Які функції виконують гістони та негістонові білки?
6. Чим відрізняється конститутивний гетерохроматин від факультативного?
7. У чому перевага диференціального забарвлення хромосом перед суцільним?
8. Користуючись навчальною літературою та іншими джерелами, визначити, які ще геномні мутації (крім зміни кількості хромосом) існують в інших видів організмів (не людини).
9. Які функції первинної перетинки хромосоми? вторинної перетинки?

## 1.1. Біологія нестатевого розмноження. Поділ соматичних клітин

**Розмноження, або репродукція** – здатність організмів або клітин до відтворення собі подібних, забезпечуючи тим самим збереження виду. Існування кожної особини підтримується розмноженням (заміщенням, регенерацією) клітин. Існування виду підтримується розмноженням особин. Отже розмноження – необхідна умова існування виду та спадкоємності наступних генерацій в його межах. У результаті розмноження батьківські особини передають нащадкам певну спадкову інформацію. В основі класифікації форм розмноження лежить тип поділу клітин: мітотичний (нестатевий) та мейотичний (статевий).

Форми розмноження можна представити в вигляді схеми:



При *нестатевому* і *вегетативному* розмноженні, а також при *партеногенезі* та *поліембріонії* (нерегулярних типах статевого розмноження) особини дочірнього покоління є генетичною копією материнського організму. При *статевому* розмноженні нащадки за вмістом спадкової інформації у клітинах відрізняються від батьків, що забезпечує спадкову різноманітність ознак і властивостей особин у межах виду.

**Нестатеве розмноження** здійснюється завдяки поділу окремих соматичних клітин (клітин тіла) шляхом ділення навпіл, множинного поділу, брунькування або за рахунок утворення спор (агамне розмноження), коли у спеціальних органах (спорангіях) утворюються внаслідок мейозу гаплоїдні клітини (спори), які є частинами материнської особини, здатні відновлювати при подальшому розвитку цілісний організм. Така форма розмноження притаманна одноклітинним та

окремим багатоклітинним організмам (водоростям, грибам, вищим споровим рослинам).

На відміну від нестатевого, **вегетативне розмноження** здійснюється багатоклітинними частинами тіла або групою соматичних клітин, відокремлених від материнського організму. У багатоклітинних водоростей, грибів, лишайників цей процес відбувається в вигляді *фрагментації*, у вищих рослин - вегетативними органами, їх частинами, видозміненими органами (кореневищами, бульбами, цибулинами, вусами, бруньками тощо). Способи вегетативного розмноження тварин також різноманітні: *брунькування, невпорядкований поділ, фрагментація, впорядкований поділ, стробіляція*.

**Нестатеве та вегетативне розмноження** у одноклітинних і багатоклітинних еукаріотів супроводжується поділом, в основі якого лежить **мітоз**, у прокаріотів – розділенням нуклеоїда.

Отже, нестатеве і вегетативне розмноження мають різні форми (див. схему), але загальною для них залишається спадковість, ідентична материнській. Генетично однорідне потомство рослин чи тварин, що виникло шляхом нестатевого розмноження, називається **клоном** (у мікроорганізмів – *штамом*).

Характеристика всіх відомих нині форм нестатевого і статевого розмноження одноклітинних і багатоклітинних організмів представлена в **Додатку А**.

### Лабораторна робота №3

#### Мітоз. Фази мітозу. Типи мітозу. Визначення мітотичної активності клітин

**Мета:** ознайомитися з фазами мітозу, навчитися визначати на мікропрепаратах фази мітозу та розраховувати мітотичний коефіцієнт.

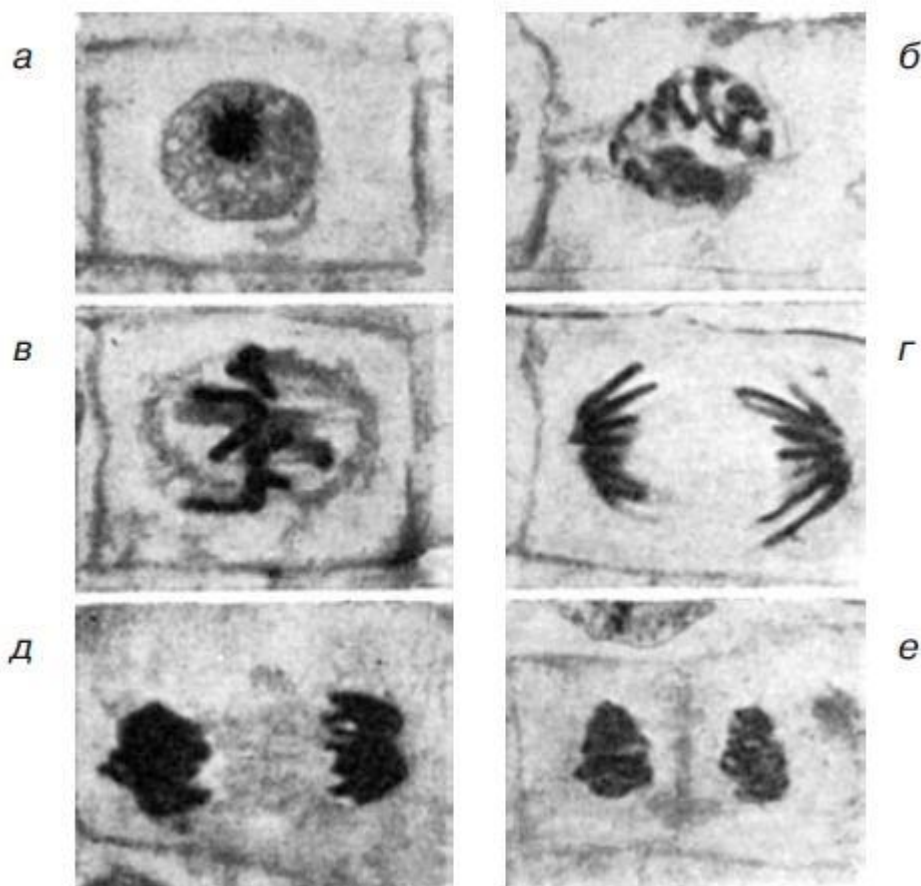
**Матеріал та обладнання:** мікроскопи «Біолам Р», постійні цитологічні препарати: “Мітоз у клітинах корінця цибулі”, “Амітоз”, “Мітоз тваринної клітини. Крайова зона печінки аксолотля”, “Амітоз у клітинах сечового міхура миші”. Дидактичні картки: “Поділ ядра клітини”, “Порівняльна схема мітозу та мейозу”.

**Завдання 1.** Ознайомитися із фазами мітозу, вивчаючи препарат поздовжнього зрізу кінчика корінця цибулі (збільшення 10x40). Уважно розглянути клітини, що знаходяться в інтерфазі, профазі, метафазі, анафазі, телофазі, замалювати їх (**рис. 1.13**). Навести відмінні особливості поділу рослинних і тваринних клітин, заповнивши таблицю:

Рослинна клітина	Тваринна клітина
1. Центріолі .....(є, немає)	1. Центріолі .....(є, немає)
2. Зірки на полюсах клітини... (утворюються, не утворюються)	2. Зірки на полюсах клітини .... (утворюються, не утворюються)
3. Під час цитокінезу..... (утворюється, не утворюється) фрагмопласт у результаті злиття пухирців ендоплазматичної сітки від центра до периферії клітини	3. Фрагмопласт .... (утворюється, не утворюється) у результаті злиття пухирців ендоплазматичної сітки від периферії до центра клітини
4. Поперечна борозна (перетинка) ..... (утворюється, не утворюється)	4. При цитокінезі ..... (утворюється, не утворюється) поперечна борозна
5. Мітози відбуваються у тканині ... (якої ?)	5. Мітози відбуваються у тканинах ..... (яких ?)

**Пояснення до завдання 1.** Поділ соматичної клітини включає два етапи: поділ ядра – *власно мітоз (каріокінез)* та розподіл цитоплазми – *цитокинез*. Цитокинез починається в анафазі та завершується зазвичай у кінці телофази. *Мітоз* – складний непрямий поділ ядра клітини, генетичне значення якого полягає в точному ідентичному розподіленні хромосом із спадковою інформацією між ядрами дочірніх клітин. Тому вони мають такий самий набір хромосом, як у материнській клітині. Хромосоми мають самостійну здатність до реплікації, тоді як інші органели клітини, здатні до реплікації, здійснюють її лише під контролем ядра. Під час мітозу в ядрі клітини послідовно проходять п'ять етапів (фаз): профаза, прометафаза, метафаза, анафаза, телофаза (**рис. 1.13**). Процеси, що відбуваються в ядрі клітини під час мітозу, представлені в таблиці:

Фази мітозу	Процеси, що відбуваються в ядрі
Профаза	У клітинах тварин на початку фази або іноді до її початку кожна <i>центріоль</i> поділяється на дві, які розходяться до полюсів ядра. Одночасно хромосоми спіралізуються, вкорочуються і потовщуються. Хроматиди відходять одна від одної, залишаючись зв'язаними тільки центромірами. У кінці профазу у тваринних клітинах навкруги центріолей утворюються променеві фігури – <b>зірки</b> . У більшості рослинних клітин центріолі відсутні. У кінці профазу ядерця зникають, ядерна мембрана під впливом лізосомних ферментів розчиняється, хромосоми занурені у цитоплазму. Одночасно з'являється ахроматинова фігура з ниток, що тягнуться від полюсів клітини (якщо є центріолі, то від них). Ахроматинові нитки прикріплюються до центромір хромосом. Утворюється характерна фігура, що нагадує веретено. Нитки веретена – це трубочки і каналці ендоплазматичного ретикулюму
Прометафаза	У центрі клітини – цитоплазма з незначною в'язкістю. Занурені в неї хромосоми спрямовуються до екватору клітини.
Метафаза	Усі хромосоми знаходяться на екваторі клітини, добре помітні, завдяки чому вивчення каріотипів (підрахунок кількості, вивчення форми хромосом) проводиться саме на цій стадії. Кожна хромосома складається з двох хроматид, кінці яких розійшлися. Тому на метафазних пластинках та каріограмах метафазних хромосом хромосоми мають Х – подібну форму
Анафаза	Кожна хромосома поздовжньо розщеплюється по всій її довжині, в тому числі і в області центроміри. Хроматиди, що стають самостійними хромосомами, розходяться до полюсів і мають паличкоподібну форму, вигнуту в місці первинної перетинки. Нитки веретена скорочуються, спрямовуються до полюсів, за ними розходяться дочірні хромосоми
Телофаза	Дочірні хромосоми досягають полюсів, деспіралізуються, втрачають ясні обриси, навкруги них формуються ядерні оболонки. Ядро набуває будови, подібної до інтерфазної. Відновлюється ядерце.



**Рис. 1.13.** - Мітоз у клітинах корінця цибулі: а - інтерфаза; б – профаза; в – метафаза; г – анафаза; д – телофаза; е – цитокінез

Основними регуляторними механізмами мітозу є процеси фосфорилування та протеолізу. Почергові реакції фосфорилування та дефосфорилування забезпечують хід зворотних подій мітозу, таких як збирання/розклад веретен поділу або розклад/відновлення ядерної оболонки. Протеоліз забезпечує незворотні події мітозу, такі, як розділення сестринських хроматид в анафазі або руйнування мітотичних циклінів на пізніх стадіях мітозу. Клітини здатні переходити в стан спокою після мітозу (хромосоми монохроматидні  $2n=2c$ ) і по завершенні синтезу ДНК (хромосоми дихроматидні  $2n=4c$ ). Максимальна конденсація хроматину спостерігається в метафазі – на початку анафазі мітозу. Такий максимально конденсований, неактивний, транспортний стан хроматину необхідний для перенесення великих за розмірами молекул ДНК до полюсів клітини без порушень під час клітинного поділу.

**Завдання 2.** Замалювати схему клітинного циклу (рис. 1.14) та коротко описати процеси, що відбуваються в різні його періоди; вказати особливості будови хромосом (моно - або дихроматидні) та кількість ДНК в них ( $2c$ ,  $4c$ ) на кожному етапі життєвого циклу. Засвоїти поняття «клітинний цикл», «мітотичний цикл».

**Пояснення до завдання 2.** Соматичні клітини організму діляться в результаті мітозу. Надалі можливі три варіанти життєвого шляху (циклу) клітин:

1. Клітини готуються до поділу та закінчують своє життя мітозом (мітотичний цикл).
2. Клітини диференціюються, функціонують і гинуть.
3. Клітини переходять до періоду  $G_0$ , в якому можуть знаходитися від декількох годин до

багатьох років. За певних умов вони можуть перейти з цього періоду в мітотичний цикл або до термінальної диференцировки (спеціалізації).

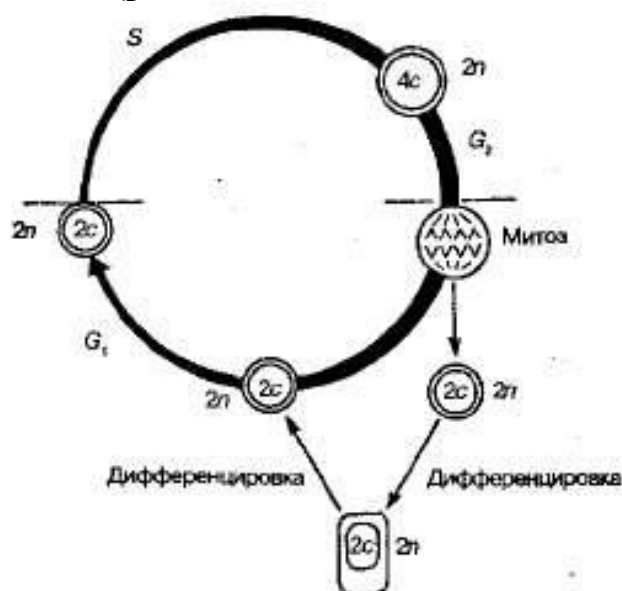
Сукупність процесів, які відбуваються в клітині від закінчення одного поділу до закінчення наступного та завершуються утворенням двох клітин нової генерації, називається **мітотичним циклом**. Розрізняють чотири періоди цього циклу: пресинтетичний ( $G_1$ ), синтетичний (S), постсинтетичний ( $G_2$ ), мітоз.

**Пресинтетичний період ( $G_1$ )** слідує за поділом. У цей період у клітині синтезується і накопичується РНК і білок, необхідний для утворення клітинних структур. Цей період є найтривалішим – від 10 годин до декількох діб.

**Синтетичний період (S)** характеризується самоподвоєнням (реплікацією) ДНК і редуплікацією хромосомних структур. Тривалість цієї фази 6 – 10 годин.

У **постсинтетичний період ( $G_2$ )** триває синтез РНК та ядерних білків протягом 3 – 4 годин.

Деякі клітини, що утворилися в результаті поділу, починають підготовку до наступного поділу, при цьому мітотичний цикл клітини співпадає з усім періодом її існування, тобто життєвим циклом. Якщо ж клітини набувають спеціалізації, починають диференціюватися, пресинтетичний період подовжується. Для клітин кожного типу тканин встановлюється певна тривалість періоду  $G_1$ . У високо диференційованих клітин (наприклад, нервових), період  $G_1$  триває протягом всього життя організму, такі клітини ніколи не діляться. Епітеліальні, сполучнотканинні клітини при певних умовах з періоду  $G_1$  переходять у наступний період мітотичного циклу. У таких клітин життєвий цикл є тривалішим за мітотичний. Отже, **життєвий цикл** клітини – це період її існування від моменту утворення шляхом поділу материнської клітини до наступного поділу або загибелі (рис. 1.14).



**Рис. 1.14.** - Життєвий цикл клітин:  $G_1$  - пресинтетичний період; S - синтетичний період;  $G_2$  - постсинтетичний період; n - гаплоїдний набір хромосом; c - одинарний набір ДНК.

**МЦ (мітотичний цикл) =  $G_1 + S + G_2 + \text{мітоз}$ .**

**Завдання 3. Визначити рівень мітотичної активності клітин кореневої меристеми паростків однорічних рослин (цибуля, пшениця, соняшник).**



### Хід виконання завдання 3:

1. Насіння завчасно замочити в воді на 12 годин, проростити на вологому фільтрувальному папері в чашках Петрі протягом 24 годин.
2. Зафіксувати кінчики пророслих корінців в спиртово-оцтовому фіксаторі (3 частини спирту: 1 частина оцтової кислоти) від 2 до 24 годин, протравити в 4%-ному водному розчині залізо-амонійних квасців протягом 20 хвилин, забарвити в 1%-ному розчині ацетогематоксилину (або ацетоорсеїну) в термостаті при 60<sup>0</sup>С протягом 1-1,5 годин. Приготувати тимчасові давлені препарати (за З.П. Паушевою, 1980).
3. На мікропрепаратах корінця цибулі, під кореневим чошликом підрахувати кількість клітин, що діляться та не діляться, в декількох полях зору (приблизно 1000 клітин).
4. Дані за підрахунками клітин у полях зору занести в таблицю за кожною стадією мітозу, а потім підсумувати:

Поле зору	Кількість клітин у фазі:					
	інтерфаза	профаза	метафаза	анафаза	телофаза	Разом
1						
2						
3						
4						

5. Визначити мітотичний індекс (МІ) за формулою:

$$MI (\%) = (P + M + A + T) \times 100 : N,$$

де **(P+M+A+T)** — сукупність клітин, що знаходяться на стадії профази, метафази, анафази, телофази; **N** — загальна кількість проаналізованих клітин.

6. Визначити відносну тривалість фаз мітозу:

$$P (\%) = P \times 100 : P+M+A+T;$$

$$M (\%) = M \times 100 : P+M+A+T \text{ і т.д.}$$

6. Скласти висновок щодо мітотичної активності клітин меристеми.

**Пояснення до завдання 3.** Мітотичну активність клітин найчастіше визначають в вигляді *мітотичного індексу* в процентах. Крім того, проводиться підрахунок клітин, що знаходяться на різних стадіях фаз мітозу; це дає можливість визначити відносну тривалість різних фаз по відношенню до загальної кількості клітин, що вступили в мітоз. Підрахунок клітин на різних фазах мітотичного циклу проводять у декількох полях зору, при цьому препарат необхідно пересувати послідовно через одне поле вбік і потім знизу догори і т. д., щоб уникнути перегляду того ж самого поля двічі. У зв'язку з тим, що взяття біологічного матеріалу (біопсії) різних тканин людини практично не реально, пропонується провести дану лабораторну роботу з дослідження проліферативної активності на прикладі кореневої меристеми паростків однорічних рослин (цибуля, пшениця, соняшник).

Мітотичний індекс показує інтенсивність поділу за наявності клітин в фазі росту (клітин, що діляться). Чим вище значення, тим інтенсивніше відбувається процес поділу клітин і навпаки. Індекс може свідчити про нормальний хід мітозу, про пригнічення процесу поділу клітин або, навпаки, посилення мітотичної активності тканин. На підставі цього робиться висновок про мітотичну або мітозстимулюючу дію певного досліджуваного фактора.

Окремі органи та тканини рослин і тварин характеризуються різною мітотичною активністю. За цією ознакою тканини поділяються на три категорії клітинних комплексів: 1) стабільні; 2) ті, що ростуть; 3) ті, що відновлюються. У **стабільних клітинних комплексах** не відбуваються мітози, кількісний вміст ДНК залишається постійним. До таких клітин відносяться нейрони та зрілі еритроцити. Ці клітини зберігаються протягом всього життя тварини або людини, але в них відбуваються вікові зміни.

До таких, що **ростуть**, відносяться групи однорідних клітин, в яких завжди зустрічаються окремі клітини, які знаходяться у стані мітозу. Клітини у цих комплексах живуть протягом всього життя організму, а за рахунок знов утворених в результаті мітозу клітин відбувається відновлення або ріст органа. З таких клітинних комплексів складаються печінка, нирки, деякі залози, м'язи людини.

Групи однорідних клітин з великою кількістю мітозів відносять до **клітинних комплексів, що постійно оновлюються**. У таких комплексах кількість знов утворених клітин відновлює таку ж саму кількість клітин, що систематично гине. Це, наприклад, клітини травного каналу, клітини шкірного епідермісу, тканина сім'яників, кровотворних органів людини та тварин; клітини твірної та інтеркалярної меристем вищих рослин.

Відмічений добовий ритм мітотичної активності. У тварин, що ведуть нічний спосіб життя, в більшості органів максимум мітозів відбувається зранку, мінімум – у нічний час, у денних тварин – навпаки. Це пов'язано як із ритмом активності, так із зміною факторів зовнішнього (світло, температура) та внутрішнього середовища. До факторів внутрішнього середовища, які регулюють мітози, відносять нейрогуморальні механізми, що здійснюються нервовою системою і гормонами наднирників, гіпофіза, щитовидної та статевої залоз. Стимулюючий вплив на мітози мають також продукти катаболізму тканин.

У клітин, що старіють, накопичується специфічний фермент «зношування» внаслідок погіршення виділення з клітин речовин, які погано розчиняються, а також відбувається накопичення ліпідів, збільшення вмісту кальцію, спостерігається зміна хімізму клітини. Це призводить до зниження їх функціональної активності.

**Завдання 4.** Ознайомитися з основними типами мітозу. Замалювати поділ клітин під час амітозу, ендомітозу. Заповнити таблицю:

Тип мітозу	Характерні особливості	Назва тканин, в яких цей тип мітозу найбільш поширений

**Пояснення для завдання 4.** Основними типами мітозу є:

1) **мітоз із затримкою цитокінезу**; призводить до утворення багатоядерних клітин. В одноклітинних цей процес спостерігається при розмноженні шляхом **шизогонії**, у багатоклітинних таким способом формуються **синцитії** – тканини, що складаються з протоплазми, в якій відсутні стінки між клітинами. Такими є деякі м'язові тканини, тегумент плоских червів;

2) **амітоз** – прямий поділ ядра клітини. Особливості амітозу: морфологічно зберігається інтерфазний стан ядра, добре помітні ядерця та ядерна мембрана, хромосоми не помітні, рівномірного розподілу їх не відбувається, ядро

поділяється на дві відносно рівні частини без утворення апарату поділу. Тому при амітозі не відбувається рівномірного розподілення хромосом між двома ядрами. У результаті поділу виникає двоядерна клітина, іноді перешнуровується цитоплазма (рис. 1.15).

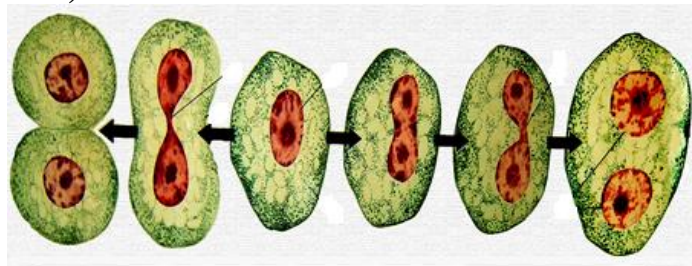


Рис. 1.15. – Процес аміотичного поділу клітин

Амітоз характерний для диференційованих тканин скелетної мускулатури, клітин шкірного та залозистого епітелію, сполучної тканини, а також для патологічно змінених клітин людини. Амітоз не вважається повноцінним розмноженням ядер клітин еукаріот.

3) **ендомітоз** (гр. *endon* – всередині). Поділ клітини не відбувається, що призводить до збільшення кількості хромосом іноді у десятки разів у порівнянні з диплоїдним набором (так формуються поліплоїдні клітини). Ендомітоз характерний для інтенсивно функціонуючих клітин різних тканин, наприклад, для клітин печінки.

4) **політенія** – відтворення у хромосомах хромосом, кількість яких багаторазово збільшується, досягаючи 1000 та більше, але кількість хромосом при цьому не змінюється. Хромосоми набувають великих розмірів. Характерна для спеціалізованих клітин, наприклад, мальпігієвих судин та слинних залоз личинок двокрилих. Клітини з політенними хромосомами у дрозоді використовуються для побудови цитологічних карт хромосом.

**Завдання 5.** Оволодіти методикою приготування цитологічних мікропрепаратів політенних хромосом слинних залоз личинки комара-дзвінця (мотиля). Замалювати політенну хромосому з позначенням її складових частин.

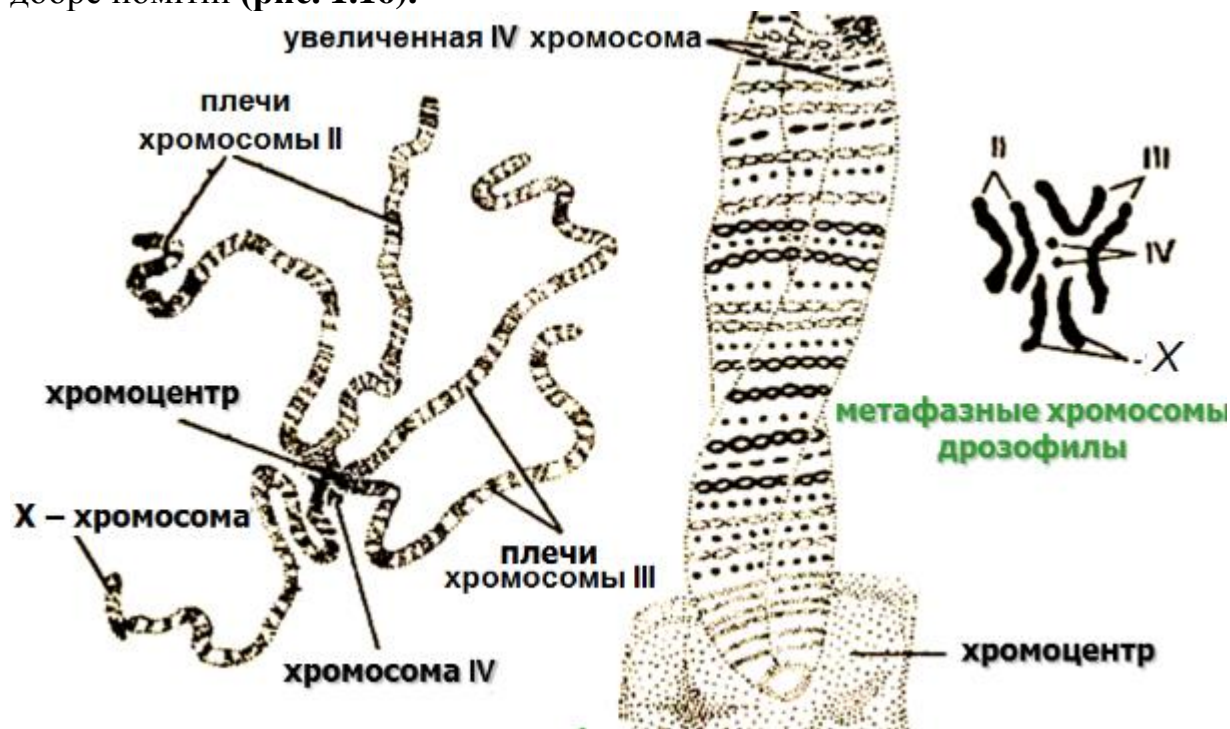
**Пояснення до завдання 5.** Політенні хромосоми — гігантські інтерфазні хромосоми, що виникають у деяких типах спеціалізованих клітин у результаті двох процесів: багаторазової реплікації ДНК, яка не супроводжується поділом клітини, та бічної кон'югації хроматид. Клітини, в яких є політенні хромосоми, втрачають здатність до поділу, вони є диференційованими і активно секретуючими, тобто політенізація хромосом є способом збільшення числа копій генів для синтезу будь-якого продукту. Політенні хромосоми спостерігають у клітинах двокрилих; у рослин в клітинах, пов'язаних з розвитком зародка; в інфузорій при формуванні макронуклеусу. Політенні хромосоми значно збільшуються в розмірах, що полегшує їх спостереження та дозволяє вивчати активність генів. Принциповою відмінністю таких хромосом є їх інтерфазний стан, тоді як всі інші хромосоми можна спостерігати тільки під час міотичного або мейотичного поділів.

Вперше політенні хромосоми були описані Е. Бальбіані в 1881 році в клітинах слинних залоз представника роду *Chironimus* з родини *Chironomidae*. Але природа цих структур достеменно не була відома до їх вивчення у *D. melanogaster* Емілем Хайтцем і Хансом Бауером на початку 1930-х років. У подальшому такі гігантські

хромосоми були описані в личинок двокрилих (Diptera), в ядрах клітин кишечника, мальпігієвих судин (наприклад, у *Sciara*), а також у деяких рослин в ядрах синергид (наприклад, гороху). Термін «політенна хромосома» запропонував П. Коллер (P. Koller) в 1935 році, а остаточно ввів у науку С. Дарлінгтон в 1937 році.

Личинки роду *Chironomus* відомі під назвою «мотиль». Вони є бентосними організмами, що мешкають в піщаному ґрунті або в мулі водойми, на поверхні водних рослин. Личинок вилучають з піщаного або мулистого ґрунту, обережно пінцетом занурюють в ємкість з чистою водою, осушують фільтрувальним папером, фіксують у суміші 96% етанолу та крижаної оцтової кислоти в співвідношенні 3:1 і зберігають у холодильнику.

Існують декілька способів аналізу активності політенних хромосом: спостереження незабарвлених політенних хромосом у заломленому світлі з використанням фазового контрасту, рутинне забарвлення політенних хромосом, специфічне забарвлення політенних хромосом для виявлення ДНК і РНК. При використанні методу фазового контрасту незабарвлені політенні хромосоми виділяються на фоні оточуючої цитоплазми. Активні райони хромосом при цьому добре помітні (рис. 1.16).



### Хромосоми слинних залоз дрозофіли

Рис. 1.16.- Політенні хромосоми дрозофіли

Методика приготування давлених препаратів політенних хромосом із різних тканин личинки для фазового контрасту включає наступні етапи: 1) розміщення фіксованої личинки в кришку від малої чашки Петрі з 70%-ним етанолом; 2) препарування личинки та виділення необхідних для дослідження органів; 3) перенесення ізольованих органів на чисте предметне скло в краплю 45%-ної оцтової кислоти; 4) промивання препарувальними голками виділеного матеріалу в краплинах 45%-ної оцтової кислоти; 5) за допомогою фільтрувального паперу відтягування оцтової кислоти та внесення декількох краплин 50%-ної молочної кислоти.

Якщо препарат готують із слинних залоз, то спочатку видаляють слинний секрет. Для цього однією препарувальною голкою притримують залозу, іншою – відділяють від слинного секрету клітини. Роботу проводять під стереомікроскопом. Обережно, притримуючи голкою, накривають препарат покривним склом, зверху покривне скло накривають фільтрувальним папером, акуратно натискають пальцями для того, щоб видалити залишки кислоти та розправити хромосоми. Важливо не допустити зсуву покривного скла.

Активними районами політенних хромосом є пуфи та ядерця (рис. 1.17).

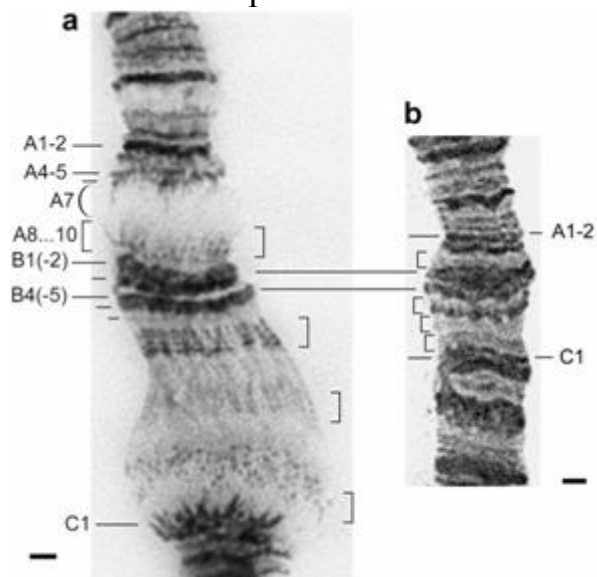


Рис. 1.17. – Хромосома з пуфом (а) та без пуфа (б)

Пуфи – ділянки політенних хромосом, де відбувається активна транскрипція, що призводить до розрихлення хроматину. Пуфи є ділянками найбільшої генної активності та відрізняються найінтенсивнішим синтезом РНК. В ядрах різних тканин політенні хромосоми відрізняються кількістю пувів і їх локалізацією. У політенних хромосомах з клітин слинних залоз деякі пуфи одержали назву **кільця Бальбіані**. Основні відмінності між звичайними пуфами та кільцями Бальбіані заключаються в зовнішньому вигляді та продуктах синтезу. У кільцях Бальбіані синтезується РНК білків слинного секрету та відбувається гіперактивна транскрипція, в результаті чого нитки ДНК сильно випетлюються та утворюють муфтоподібну структуру навкруги хромосоми. У хромосомах з клітин інших тканин, що виконують інші функції, кільця Бальбіані відсутні, і хоча інші пуфи та ядерця можуть бути розвинені дуже добре, рисунок пуфінгу буде відрізнятися. Ядерця – спеціалізований пух, основу якого складає ядерцевий організатор – ділянка хромосоми, яка відповідає за синтез всієї рибосомної РНК клітини. Накопичення речовин ядерця відбувається не тільки в області бокових виростів ядерцевого аналізатора, але й всередині самої хромосоми.

Політенні хромосоми мають характерну поперечну смугастість, обумовлену наявністю ділянок більш щільної спіралізації хромомер — хромомер. У темних ділянках (тобто хромомерах) розташовується спіралізований неактивний хроматин, тоді як світлі смуги вказують на ділянки з підвищеною транскрипційною активністю. Чітке розрізнення темних дисків і світлих міждисккових ділянок пояснюється нерозходженням дочірніх хромомер. Смугастість політенних хромосом виключно корисна для досліджень, зокрема, на

їх прикладі була отримана візуалізація ділянок активного і неактивного хроматину. На них також можна вивчати загальну структуру хроматину.

По суті, політенні хромосоми являють собою пару гігантських гомологічних хромосом, які перебувають у стані ідеально точної соматичної кон'югації. Утворення пуфів характерно для стадії личинки. Формування та зникнення пуфів регулюється внутрішнім середовищем організму у відповідності зі стадією розвитку. Одним з найважливіших регуляторів утворення пуфів у комах є стероїдні гормони, зокрема, гормон линьки — екдизон. Виявлено також вплив білків, синтезованих більш ранніми пуфами, на розвиток більш пізніх пуфів. Таким чином, формування пуфів є яскравим прикладом диференціальної транскрипції. Іншим відомим прикладом цього процесу є формування хромосом типу лампових щіток.

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

### I. Відповісти на теоретичні запитання:

1. Під час мітозу в культурі тканини людини відбулася елімінація однієї хромосоми. Скільки хромосом буде в двох клітинах, що утворилися?
2. В якій фазі мітозу хроматиди відділяються і стають самостійними хромосомами?
3. Що таке життєвий цикл клітин?
4. Що таке мітотичний цикл, з яких періодів він складається? Що відбувається в різні періоди мітотичного циклу?
5. Які молекулярні процеси лежать в основі подвоєння молекули ДНК? Як відбувається подвоєння хромосом?
6. Назвіть фази мітозу, біологічну сутність і значення мітозу.
7. Що таке політенія, ендомітоз і поліплоїдія?
8. Що таке мітотичний коефіцієнт, як він визначається?
9. Які види тканин розрізняють у залежності від їхньої мітотичної активності? Чим вони характеризуються? Що таке стовбурові клітини?
10. Чим відрізняються життєві цикли нормальних і пухлинних клітин?
11. Які механізми регуляції клітинного поділу?
12. Як виникають політенні хромосоми у слинних залозах личинок дрозофіли? В чому особливості їх морфології?
13. Які молекулярні процеси лежать в основі подвоєння молекули ДНК? Як відбувається подвоєння хромосом?
14. Під час якого періоду клітинного циклу відбувається подвоєння хромосом?

### II. Відповісти на запитання тестових завдань:

1. Сукупність хромосом ядра називається...
  - а) фенотипом
  - б) каріотипом
  - в) гомозиготою
  - г) гетерозиготою
  - д) хроматидою
2. Якщо кількість хромосом у кожній з дочірніх клітин камбію дорівнює 10, то у материнській клітині було:
  - а) 5 хромосом
  - б) 20 хромосом
  - г) 30 хромосом
  - д) 15 хромосом
  - в) 10 хромосом

3. Якщо у метафазі мітозу в клітині певного виду тварин налічується 32 хроматиди, то скільки хромосом має каріотип цього виду?  
 а) 24 б) 12 в) 32 г) 16 д) 8
4. В якій фазі знаходиться клітина, якщо в ній синтезується ДНК?  
 а) інтерфазі г) анафазі  
 б) профазі д) телофазі  
 в) метафазі
5. У клітинах листя жита міститься 14 хромосом. Скільки хроматид можна побачити після анафазу у клітинах ендосперму?  
 а) 56 б) 28 в) 14 г) 7 д) 42
6. Скільки всього хромосом можна побачити в кінці анафазу у клітині шкіри людини?  
 а) 23 б) 46 в) 69 г) 92 д) 48
7. Перед мітозом кількість хромосом  $x$ , кількість хроматид –  $m$ , кількість ДНК –  $d$ . Якими будуть ці параметри в одній, утвореній поділом клітині?  
 а)  $x, m, d$  г)  $x, m, d/4$   
 б)  $x, m, d/2$  д)  $x, m/2, d/2$   
 в)  $x/2, m/2, d/2$
8. Коли відбувається перетворення двохроматидних хромосом в однохроматидні?  
 а) під час профазу г) під час анафазу  
 б) під час метафазу д) під час телофазу  
 в) під час інтерфазу

## 1.2. Біологія статевого розмноження. Процес формування статевих клітин. Запліднення

**Статеве розмноження – амфіміксис** – характеризується наявністю статевого процесу, який закінчується злиттям двох статевих клітин. Формуванню гамет у багатоклітинних передують особлива форма поділу клітин – **мейоз**. Тому у життєвому циклі організмів, що розмножуються статевим шляхом, існує дві фази – диплоїдна і гаплоїдна. Тривалість цих фаз у різних груп організмів є неоднаковою: у грибів, мохів та деяких найпростіших переважає гаплоїдна, у вищих рослин і багатоклітинних тварин – диплоїдна.

Гамети розвиваються з первинних статевих клітин, що обособлюються на ранніх стадіях розвитку зародка: у аскариди, ракоподібних, комах, жаби – під час дробіння зиготи, у плазунів і птахів – на стадії гастрюли, у ссавців і людини – в ранньому органогенезі. Первинні статеві клітини на відміну від соматичних мають низку морфологічних та біохімічних особливостей. Якщо у зародка зруйнувати первинні статеві клітини, то його гамети не формуються.

Різноманітні форми статевого процесу об'єднують у дві групи: **кон'югація**, при якій спеціальні статеві клітини (або статеві особини) не утворюються (наприклад, у інфузорій, бактерій); **гаметична копуляція**, коли формуються статеві елементи і відбувається їх попарне злиття. В одноклітинних тварин утворюються однакові ізогамети (**ізогаметія**), у колоніальних джгутиконосців, вольвоксу та багатоклітинних формуються різні за розмірами гамети (**овогамія**).



**Мейоз** (давньогрецьк.  $\mu\epsilon\acute{\iota}\omega\sigma\iota\varsigma$  — зменшення) – поділ ядра еукаріотичної клітини, який передуює утворенню статевих клітин і супроводжується зменшенням (редукцією) вдвічі кількості хромосом, властивий соматичній клітині. Мейоз триває під час гаметогенезу тварин або спорогенезу рослин у два етапи (редукційний та екваційний поділи). Із зменшенням кількості хромосом у результаті мейозу в життєвому циклі відбувається перехід від диплоїдної фази до гаплоїдної. Відновлення плоїдності (перехід від гаплоїдної фази до диплоїдної) відбувається в результаті статевого процесу - *запліднення*. Мейоз був відкритий В.Флемінгом у 1882 році (в тварин) і Е.Страсбургером у 1888 році (в рослин).

Розрізняють наступні типи мейозу:

1) **зиготичний** (початковий) відбувається зразу після *сингамії* (запліднення), коли утворена диплоїдна зигота зразу ж вступає в мейоз. Продукти мейозу - гаплоїдні спори проростають, утворюючи гаплоїдні організми, що дають завдяки мітотичним поділам гаплоїдні гамети. Отже, в цьому випадку мейоз безпосередньо слідує за заплідненням, а диплоїдне покоління – це одна клітина (зигота). Зиготичний мейоз характерний для водоростей, найпростіших, у життєвому циклі яких переважає гаплофаза;

2) **гаметичний** (кінцевий) відбувається в статевих органах під час оогенезу (або сперматогенезу) та призводить до утворення гамет. При цьому життя організмів відбувається в диплоїдній фазі, мейоз безпосередньо передуює утворенню гамет, а гаплоїдне покоління - одна клітина (гамета) – триває недовго. Характерний для тварин, людини, деяких нижчих рослин;

3) **споривий** (проміжний) характерний для вищих рослин і грибів. У цьому випадку відбувається чітка зміна гаплоїдного та диплоїдного поколінь. Так, у папоротей поряд із диплоїдною рослиною, яка в результаті мейозу дає спори, існує гаплоїдне покоління у вигляді заростка, що розвивається з гаплоїдних спор. У покритонасінних гаплоїдне покоління характеризується наявністю зародкового мішка з пилковою трубкою. Споривий мейоз відбувається в материнській клітині мікро- або мегаспор у процесі мікро- або мегаспорогенезу; в результаті утворюються гаплоїдні спори, які без запліднення розвиваються у гаметофіт, що дає гамети. Отже, процес формування статевих клітин у рослин поділяється на два етапи: перший етап - *спорогенез* - завершується утворенням гаплоїдних спор, а під час другого етапу — *гаметогенезу* — відбувається низка поділів гаплоїдних клітин перед утворенням зрілих гамет.

Хід мейозу для всіх трьох типів є однаковим. Він складається з двох послідовних поділів, які супроводжуються лише одноразовим подвоєнням кількості ДНК: першого *редукційного*, або гетеротипного, за якого кількість хромосом у клітині зменшується вдвічі, та другого *екваційного*, або гомотипного, який триває за типом мітозу. Але на відміну від звичайного мітозу, під час другого поділу мейозу хроматиди, що розходяться в анафазі, є неідентичними вихідним завдяки кросинговеру, що відбувся у профазі першого поділу.

**Біологічне значення мейозу:** 1) підтримання видової сталості числа хромосом каріотипу при статевому розмноженні; 2) формування спадково



різних гамет; 3) забезпечення генетичної різноманітності потомства - комбінативної мінливості спадкового матеріалу, який відшліфовується природним добром у процесі еволюції.

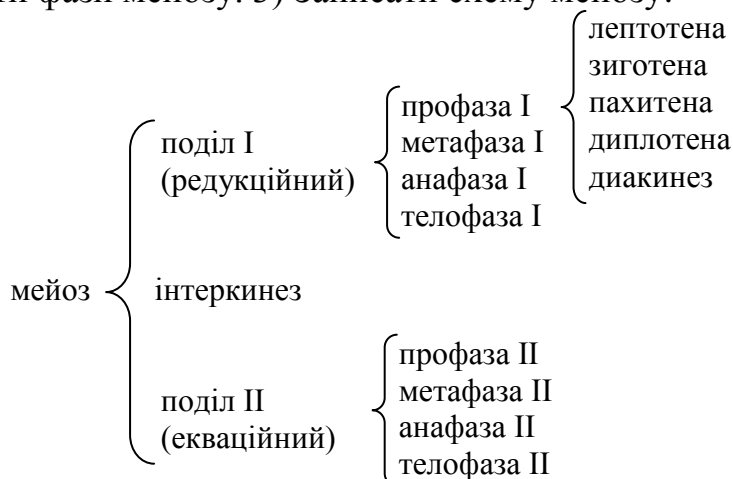
#### Лабораторне заняття №4

### Мейоз. Гаметогенез у тварин. Мікро- та макрогаметогенез у рослин. Процес запліднення

**Мета:** Ознайомитися з особливостями редукційного та екваційного поділу мейозу, окремими етапами сперматогенезу та оогенезу тварин, мікро- та макрогаметогенезу рослин; особливостями процесу запліднення.

**Матеріали та обладнання:** Мікроскопи “Біолам”, цитологічні мікропрепарати “Сім’яник пацюка”, “Яєчник ссавця”; таблиці “Схема мейозу”, “Порівняльна схем мейозу і мітозу”, динамічний посібник “Мейотичний поділ клітини”, мікрофотографії стадій мейозу у пиляках цибулі (*Allium cepa*), мікрофотографії профазі I і метафазі II у клітинах сім’яника коника (*Stenobothrus lineabus*), мегаспорогенезу в лілії (*Lilium umbelabum*), восьмиядерного зародкового мішку (*Lelphinium sp.*).

**Завдання 1.** 1) Ознайомитись з мікрофотографіями та схемою мейозу в пиляках рослин. 2) Розглянути клітини в різних фазах мейозу на тимчасових мікропрепаратах. Для цього із зафіксованих або свіжих молодих бутонів пінцетом витягнути пиляк, подрібнити його на предметному склі, видалити великі залишки тканин, забарвити краплею ацетокарміну, накрити покривним склом і злегка підігріти препарат. Після охолодження вивчити під мікроскопом і визначити фази мейозу. 3) Записати схему мейозу:



та події, що відбуваються в клітині під час мейозу (**табл. 1.3**). Порівняти процес мейозу в рослинних і тваринних клітинах.

**Пояснення до завдання 1.** Мейоз відбувається в археспоріальних материнських клітинах – мікроспороцитах пиляків і макроспороцитах насінного зачатка. У результаті мейозу утворюються гаплоїдні (n) клітини (спори) з одинарним набором хромосом - **гаметофит** у життєвому циклі рослини. Набір генів у хромосомах і сполучення материнських і батьківських хромосом у гаметофіті не будуть ідентичними в порівнянні з материнською клітиною внаслідок обміну гомологічними ділянками хромосом (кросинговеру) в профазі

I та випадкової комбінації батьківських хромосом під час їх розходження в анафазі I.

Мейоз складається з двох поділів: I – редукційного та II – екваційного (табл. 1.3).

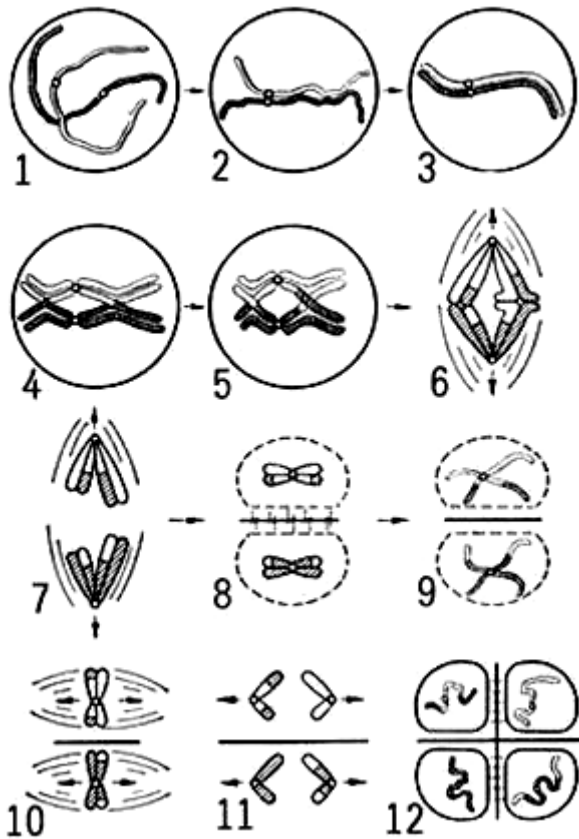
Таблиця 1.3

**Події, що відбуваються у клітинах під час мейозу**

Поділ мейозу	Фаза	Основні події, що відбуваються у клітинах
Перший, редукційний	<b>Профаза I</b>	Профаза I супроводжується структурними складними перетвореннями хромосом, у цій фазі триває синтез ДНК. Складається із послідовних стадій: <i>лептомена</i> – хромосоми мають вигляд довгих тонких ниток, зібраних в ядрі у вигляді клубка. На хромосомах помітні хромери, кількість і розміщення яких є специфічними для кожної хромосоми; <i>зиготена</i> – відбувається <b>кон'югація</b> (синопсис) гомологічних хромосом. Починається з кінців і поширюється вздовж хромосом; вони з'єднуються строго ідентичними ділянками. Процес нормальної кон'югації контролюється генетично; <i>пахітена</i> – попарно з'єднані хромосоми утворюють біваленти, які потовщуються і вкорочуються внаслідок спіралізації. Кожен бівалент складається з чотирьох хроматид. У біваленті може відбуватися <i>кросинговер</i> – обмін ідентичними ділянками несестринських хроматид гомологічних хромосом; <i>діплогена</i> – хромосоми бівалентів починають відокремлюватися одна від одної. Процес розходження починається з відштовхування центромерних ділянок, при цьому хромосоми утворюють $\chi$ -подібні фігури – <i>хіазми</i> . За наявності хіазм можна виявити місце кросинговеру; <i>діакінез</i> – потовщення та вкорочення хромосом у біваленті, триває їх роз'єднання. Гомологічні хромосоми залишаються з'єднаними лише в одній або декількох точках.
	<b>Метафаза I</b>	Завершується формування мітотичного апарату, зникає ядерна оболонка та ядерце, біваленти розміщуються у цитоплазмі на екваторі клітини. Центромери прикріплюються до ниток веретена поділу. На відміну від мітозу центромери не діляться поздовжньо. Кожна з хромосом складається з двох хроматид.
	<b>Анафаза I</b>	Гомологічні хромосоми розходяться до протилежних полюсів клітини; вони не завжди є ідентичними вихідним хромосомам унаслідок кросинговеру.
	<b>Телофаза I</b>	Хромосоми концентруються на полюсах клітини і деспіралізуються. На полюсах формуються ядра, нитки веретена зникають. На екваторі клітини формується оболонка- відбувається <i>цитокінез</i> , утворюється діада клітин. Але в багатьох видів рослин у телофазі I хромосоми не деспіралізуються, не відбувається утворення клітинної оболонки.
<b>Інтеркінез</b>		Це фаза між I та II поділами мейозу, коли діада гаплоїдних клітин зберігається тривалий час. В інших видів рослин зразу ж після телофазі I настає другий поділ мейозу, який відбувається за типом мітозу. У тварин інтеркінез зазвичай відсутній.
Другий, екваційний	<b>Профаза II</b>	В ядрах клітин діади чітко виявляються хромосоми, кожна з яких складається з двох хроматид, з'єднаних центромерою і розміщених по периферії ядра.
	<b>Метафаза II</b>	У кожній клітині діади закінчується формування веретена поділу. Хромосоми розміщуються на екваторі клітини, до центромер

		приєднуються нитки веретена поділу.
	<b>Анафаза II</b>	Цетромери діляться поздовжньо, хроматиди, які вже виконують роль хромосом, розходяться до протилежних полюсів клітини.
	<b>Телофаза II</b>	Хроматиди концентруються на полюсах клітини, деспіралізуються. У кожній клітині формується ядро, ядерце, клітинна мембрана. Усі фази другого поділу тривають одночасно в обох клітинах діади. Після цитокінезу утворюються чотири гаплоїдні гамети.

Загальна схема мейозу представлена на **рис. 1.18.**

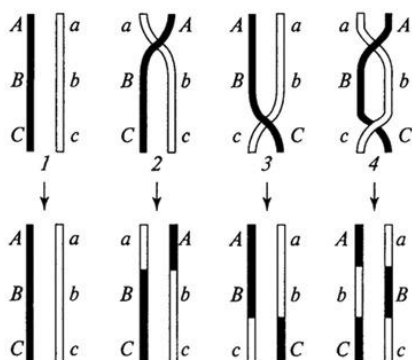


**Рис. 1.18.-** Загальна схема мейозу. Профаза I: 1- лептотена; 2 – зиготена; 3 – пахитена; 4 – диплотена; 5 – діакінез; 6 – метафаза I; 7 – анафаза I; 8 – телофаза I; 9 – інтеркінез; 10 – метафаза II; 11 – анафаза II; 12 – телофаза II.

Оскільки в парі гомологічних хромосом одна з них материнського походження, інша – батьківського, то, як крайній варіант, всі материнські хромосоми в анафазі I можуть відійти до одного полюсу, а батьківські – до іншого, а можуть виникнути будь-які їх поєднання. У кукурудзи, в якій в диплоїдному наборі хромосом  $2n = 20$  (10 бівалентів) кількість можливих комбінацій хромосом в гаметах дорівнює  $2^{10}$ . У загальному вигляді кількість сполучень материнських і батьківських хромосом у гаметах (кількість типів гамет) дорівнює  $2^n$ .

У профазі I відбувається **кросинговер** - обмін гомологічними ділянками хроматид, рекомбінація зчеплених генів, локалізованих в одній хромосомі, внаслідок чого виникають нові сполучення генів у сестринських хроматидах. Наприклад, якщо в парі гомологічних хромосом локалізовані гени ABC/abc, тобто в одній хромосомі – всі домінуючі алелі, а в іншій - рецесивні, то при розходженні такого біваленту до полюсів клітини за відсутності кросинговеру утворяться два типи гамет: ABC і abc. Якщо ж відбудеться кросинговер між A/b,

утворяться гамети з новим сполученням генів –  $Abc$  і  $aBC$ ; між  $B/c$  –  $ABc$  і  $abC$ ; у випадку подвійного кросинговеру –  $AbC$  і  $aBc$ , всього 8 типів гамет. Отже, кросинговер призводить до перекомбінації генетичного матеріалу, тобто до нового сполучення алелей, що лежить в основі комбінативної мінливості організмів (рис. 1.19).



**Рис. 1.19. - Перекомбінація генів гомологічних хромосом під час кросинговеру.** Будь-яка з двох хроматид однієї гомологічної хромосоми може обмінюватися з будь-якою з двох хроматид іншої гомологічної хромосоми. Але сестринські хроматиди в межах однієї гомологічної хромосоми зазвичай не обмінюються ділянками (виключення – коли в даному місці гомологічна ділянка з певної причини відсутня).

Другий, екваційний, поділ (II) мейозу відбувається аналогічно мітозу, він призводить до утворення тетради гаплоїдних гамет (рис. 1.18).

У рослин після *мікроспорогенезу* кожна з чотирьох мікроспор вступає в процес *мікрогаметогенезу*, тобто з кожної мікроспори утворюється пилокве зерно, в якому після першого мітозу утворюються вегетативна і генеративна клітини. В одних культур генеративна клітина ділиться мітозом на 2 спермії ще в пилковому зерні, в інших – при проростанні в пиловій трубці. Таким чином, якщо простежити весь шлях від початку поділів материнської клітини мікроспор до формування чоловічих гамет (сперміїв), можна відзначити, що з однієї материнської клітини - *мікроспороциту* формуються 8 сперміїв.

Під час макроспорогенезу з *макроспороциту* насінного зачатка після мейозу також утворюється тетрада макроспор, але у більшості рослин подальший розвиток і перетворення в зародковий мішок зазнає тільки одна макроспора, три інші дегенерують. Після трьох мітотичних поділів утворюється восьмиядерний зародковий мішок з однією яйцеклітиною. Отже, з однієї клітини-макроспороциту утворюється одна жіноча гамета – яйцеклітина.

Після проростання пилку на приймочці маточки відбувається процес *подвійного запліднення*, в результаті якого утворюється диплоїдна зигота (яйцеклітина+спермії), з якої надалі розвиватиметься зародок насінини, та триплоїдна клітина (диплоїдне центральне ядро+спермії), з якої розвиватиметься триплоїдний ендосперм. *Подвійне запліднення* в рослин призводить до відновлення диплоїдного стану спорофіта з новим поєднанням генів і хромосом у гібридного організму. У деяких видів рослин описані випадки розвитку зародка без запліднення – *аноміксис*, формами якого є партеногенез, апогамія, апоспорія, адвентивна ембріонія.

У тварин мейоз відбувається так само, як і в рослин. У клітинах сім'яника в диплотені добре помітні хіازми - перехрести хромосом, обумовлені обміном гомологічними ділянками. В лептотені профазі I у клітинах сім'яників добре

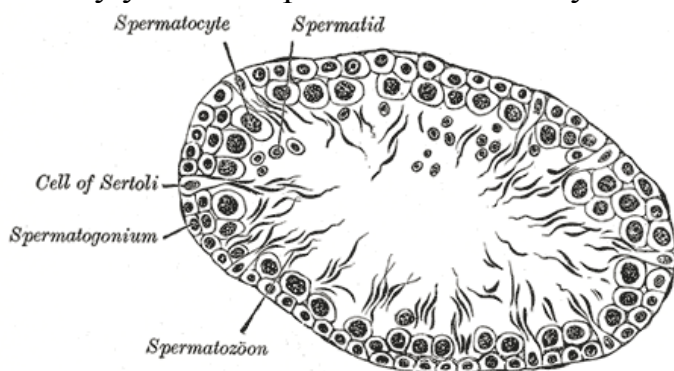
помітні великі ядра, в яких тонкі хромосоми утворюють переплетену сітку. Тим самим лептотена не відрізняється від такої у рослинних клітинах. Але при уважному розгляданні препарату помітно, що під оболонкою ядер знаходяться темні компактні тільця. Це **статеві хромосоми**. На відміну від інших хромосом вони знаходяться у конденсованому стані та поведуться у профазі I мейозу специфічно. У результаті двох послідовних мейотичних поділів з однієї клітини з диплоїдним набором хромосом (сперматоцит II) утворюються чотири клітини з гаплоїдним набором – **сперматозоїди**. При овогенезі з одного овоциту II формуються також чотири гаплоїдні клітини, але лише одна з них – **яйцеклітина** – є гаметою.

У людини при утворенні як чоловічих, так і жіночих статевих клітин відбуваються ті ж самі процеси, хоча в деталях вони дещо відрізняються. Так, дуже суттєвою відмінністю мейозу при овогенезі є присутність спеціальної стадії – **диктиотени**, відсутньої при сперматогенезі. Вона настає після диплотени профазі I мейозу. На цій стадії мейоз в овоцитах припиняється на багато років, і перехід до диакінезу настає лише при дозріванні яйцеклітин у період статевого дозрівання дівчинки.

**Завдання 2.** 1) Ознайомитися з окремими етапами сперматогенезу: 1) На мікропрепараті поперечного зрізу сім'яника пацюка за допомогою світлового мікроскопу (збільшення 10×40) знайти і замалювати сектор сім'яного каналця та клітини на всіх стадіях розвитку: сперматогонії, сперматоцити I, сперматоцити II, сперматиди, сперматозоїди. 2) Замалювати в зошит схему сперматогенезу та овогенезу в тварин. 3) Ознайомитися з розміщенням зон у сім'яних каналцях, які є послідовними стадіями розвитку чоловічих гамет. 4) Розглянути та замалювати будову сперматозоїда на препараті мазку сперматозоїдів жаби.

### Пояснення до завдання 3.

Сперматогенез (утворення чоловічих гамет) відбуваються у сім'яниках. Сім'яник складається з численних каналців. На поперечному зрізі каналця сім'яника (**рис. 1.20**) можна знайти клітини всіх зон, оскільки процес сперматогенезу у статевозрілих ссавців відбувається постійно.



**Рис. 1.20.** – Поперечний зріз сім'яного каналця щура

Клітини з великими, інтенсивно забарвленими ядрами, що мають сітчасту структуру і розміщені на периферії сім'яного каналця – це **сперматогонії**, диплоїдні клітини, що діляться мітозом. Більш глибоко до центру каналця лежать клітини з більшими за розмірами і світлішими ядрами - **сперматоцити I** (першого порядку). Далі до центру каналця розміщені дрібніші гаплоїдні

клітини – *сперматоцити II*. В отворі каналця помітні дрібні клітини, у яких майже весь об'єм зайнятий яскраво забарвленими ядрами – це незрілі *сперматиди*, які надалі перетворюються на зрілі *сперматозоїди* з характерною для них будовою: головка, шийка, хвіст.

Отже, на поперечному зрізі сім'яного каналця розрізняють декілька шарів клітин, які є послідовними стадіями розвитку сперматозоїдів (рис. 1.21).

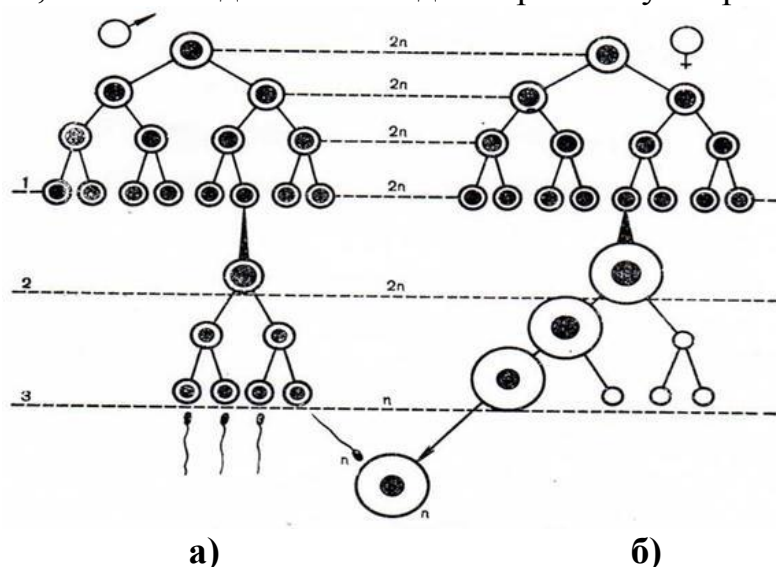


Рис. 1.21. – Схема сперматогенезу (а) та оогенезу (б) тварин: 1 – зона розмноження; 2 – зона росту; 3 – зона дозрівання; 4 – зона формування (дозрілі сперматозоїди)

Зовнішній шар – *зона розмноження* – складають сперматогонії. У період ембріогенезу і після народження до статевого дозрівання ссавців сперматогонії діляться мітозом, завдяки чому збільшується кількість цих клітин і сам сім'яник. Після настання статевої зрілості частина сперматогоніїв також продовжує ділитися мітотично і утворювати такі ж самі клітини, але деякі з них пересуваються у наступну *зону росту*, яка розміщена ближче до отвору каналця. Тут відбувається значне збільшення розмірів клітин за рахунок збільшення кількості цитоплазми. На цій стадії вони називаються *первинними сперматоцитами (сперматоцити I порядку)*. Наступна ділянка, яка знаходиться ближче до центру сім'яного каналця, називається *зоною дозрівання*. У цій зоні сім'яника відбуваються два швидко триваючих один за одним поділи мейозу (рис.3). З кожного первинного сперматоцита спочатку утворюються два *вторинних сперматоцити*, а потім чотири незрілих сперматозоїди - *сперматиди*. Сперматиди переміщуються у зону, яка є найближчою до отвору каналців – *зону формування*, де з них формуються *сперматозоїди*.

У більшості диких тварин сперматогенез відбувається лише у певні періоди року. В інший час у каналцях сім'яників містяться лише сперматогонії. Але у людини і більшості домашніх тварин сперматогенез відбувається постійно. Усі сперматозоїди несуть негативний електричний заряд, що запобігає їх злипанню. Кількість сперматозоїдів, що виділяється при статевому акті, є колосальним: у собаки – близько 60 млн., барана – до 2 млрд., коня – близько 10 млрд., людини – близько 200 млн. Для деяких тварин є характерними атипові сперматозоїди з різноманітною будовою. Наприклад, у ракоподібних



вони мають вирости у вигляді променів або відростків, у круглих черв'яків мають форму кулеподібних або овальних тілець тощо.

**Завдання 4.** Ознайомитися з окремими етапами оогенезу та процесом запліднення у тварин: 1) Розглянути за допомогою світлового мікроскопу та замалювати поперечний зріз яєчника статевозрілої крільчихи (збільшення  $10\times 40$ )(рис. 1.22). 2) Розглянути за допомогою світлового мікроскопу препарат яєць аскариди (збільшення  $10\times 90$ ), на якому знайти процес злиття двох пронуклеусів, тобто власне процес каріогамії (запліднення). При цьому звернути увагу на те, що розміри чоловічого і жіночого пронуклеусів є однаковими, хоча розміри яйця і сперматозоїду розрізняються дуже сильно.

**Пояснення до завдання 4.** При мікроскопічному дослідженні на периферії яєчника статевозрілої крільчихи помітні великі клітини, оточені одним шаром дрібних рівних за розміром клітин. Це утворення – примордіальний або **первинний фолікул**. У багатошаровому фолікулі, утвореному за рахунок поділу фолікулярних клітин, знаходяться порожнини, заповнені рідиною, а в них, неначе на напівострові (яйценосному бугорку), на фолікулярних клітинах знаходиться **ооцит I**, оточений низкою дрібних фолікулярних клітин, що живлять ооцит. Зовні це утворення вкрите сполучнотканинними елементами, які відділяють його від тканини (строми) яєчника. Таке утворення називається **Граффов пухирець** за ім'ям дослідника, який вперше його описав (рис. 1.22).

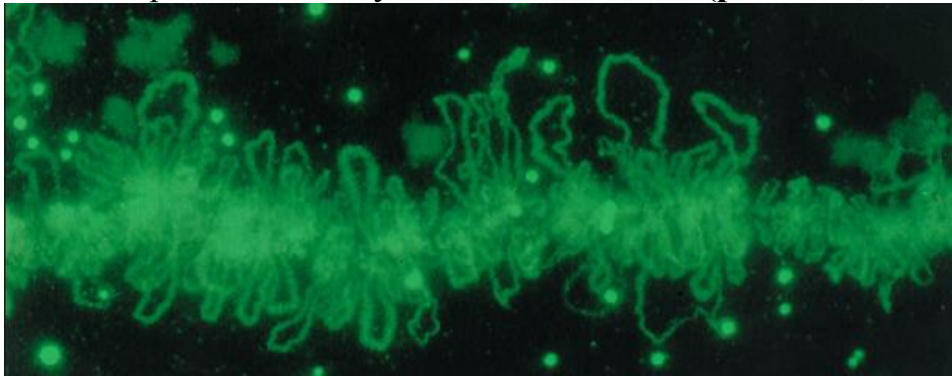


**Рис. 1.22.** - Поперечний зріз яєчника кішки (*Felis silvestris f. catus*): 1 – примордіальний фолікул; 2 – первинний фолікул; 3 – оболонка; 4 – ядро ооциту першого порядку; 5 – цитопlasма ооциту першого порядку; 6 – фолікулярні клітини

Фази оогенезу подібні до таких при сперматогенезі. В яєчнику також наявна зона **розмноження**, де інтенсивно діляться **овогонії** – дрібні клітини з відносно великим ядром і незначною кількістю цитоплазми. У ссавців і людини цей період закінчується ще до народження. **Первинні ооцити**, які сформувалися до цього часу, зберігаються далі без змін довгі роки. Під час статевої зрілості окремі ооцити періодично вступають у період **росту**, збільшуються, в них накопичується жовток, ліпіди, пігменти. У цитоплазмі клітини, в її органелах та мембранах відбуваються складні морфологічні та біохімічні перетворення.

Кожний ооцит оточений дрібними фолікулярними клітинами, які забезпечують його живлення. Надалі ооцит вступає в **період дозрівання**, під час якого відбуваються два послідовних поділи мейозу, що супроводжуються

перетворенням хромосомного апарату та нерівномірним розподіленням цитоплазми між дочірніми клітинами. У зоні дозрівання при поділі первинного ооциту - *ооциту I, або ооциту першого порядку* - утворюється одна велика клітина – *вторинний ооцит* (або ооцит другого порядку), який містить майже всю цитоплазму, і маленька клітина – *оотида*. Під час другого поділу дозрівання цитоплазма знову розподіляється нерівномірно: утворюється одна велика *яйцеклітина* та ще одна оотида. Одночасно оотида, що утворилася при першому поділі мейозу, знову ділиться за типом мітозу з утворенням двох оотид. Таким чином, з одного первинного ооциту утворюється одна яйцеклітина і три *оотида (редукційні, або полярні тільця)*. Пізніше оотида розсмоктуються або зберігаються на поверхні яйцеклітини, але не приймають участь у заплідненні. Нерівномірний розподіл цитоплазми дозволяє яйцеклітині одержати значну кількість цитоплазми і поживних речовин, які будуть необхідними для розвитку зародка, оскільки гени, привнесені у зиготу батьківською гаметою, активуються лише після гастрюляції. Ядра ооцитів містять хромосоми типу «лампових щіток» (**рис. 1.23**).



**Рис. 1.23.** – Хромосоми типу «лампових щіток» в ооцитах

*Хромосоми типу лампових щіток* (вперше виявлені В. Флеммінгом в 1882 році) - це спеціальна форма хромосом, яку вони набувають в зростаючих ооцитах більшості тварин, за винятком ссавців. Найбільш докладно описана організація хромосом типу лампових щіток у хвостатих і безхвостих амфібій, одомашнених (доместикованих) видів птахів і деяких видів комах. В ооцитах, що ростуть, під час протяжної стадії діплотени профазі I мейозу активна транскрипція багатьох послідовностей ДНК призводить до перетворення хромосом в хромосоми, які за формою нагадують щітки для чищення скла газових ламп (хромосоми типу лампових щіток). Вони являють собою сильно деконденсовані полубіваленти, що складаються з двох сестринських хроматид. Такі хромосоми виробляють величезну кількість РНК, що синтезується на латеральних петлях. Кожна латеральна петля завжди містить ту ж саму послідовність ДНК і залишається в витягнутому стані протягом усього росту ооцита, аж до початку конденсації хромосом.

У ссавців і людини під час овуляції стінка фолікула лопається, яйцеклітина надходить у черевну порожнину, а потім у маточні труби. Період дозрівання яйцеклітин відбувається у трубах, де й здійснюється процес запліднення. У жінок звичайно щомісячно дозріває одна яйцеклітина, а за весь період статевої зрілості – близько 400. Для людини має суттєве значення той факт, що первинні ооцити формуються ще до народження, потім зберігаються все життя і тільки



поступово деякі з них починають переходити до дозрівання і дають яйцеклітини. Це означає, що різні несприятливі фактори, яким піддається протягом життя жіночий організм, можуть впливати на подальший розвиток яйцеклітин. Так, отруйні речовини (у тому числі наркотичні, тютюн, алкоголь), що надходять в організм, здатні проникати в ооцити та пізніше викликати порушення нормального розвитку майбутнього потомства.

**Запліднення** – сполучення двох гамет, в результаті чого утворюється запліднене яйце, або **зигота**, є початковою стадією розвитку нового організму. У тварин розрізняють зовнішнє та внутрішнє запліднення. Зовнішнє запліднення характерне для багатьох водних тварин, внутрішнє – для мешканців суходолу, де умови для збереження і зустрічі гамет у зовнішньому середовищі відсутні.

Під час запліднення відбуваються дві важливі події: **активація яйця** (тобто спонукання до розвитку) і **синкаріогамія** (утворення диплоїдного ядра зиготи в результаті злиття гаплоїдних ядер статевих клітин, що несуть генетичну інформацію двох батьківських організмів). Сприятливим фактором для зустрічі гамет є те, що яйцеклітини рослин і тварин виділяють в оточуюче середовище хімічні речовини, що активують сперматозоїди. Сперматозоїди ссавців можуть проникнути в яйцеклітину тільки тоді, якщо вони знаходились у жіночих статевих шляхах не менше 1 години. Вони рухаються невпорядковано і з яйцеклітиною стикаються випадково. Кульмінаційним моментом у процесі запліднення є злиття ядер. Ядро сперматозоїда - **чоловічий пронуклеус** - у цитоплазмі яйця набухає і досягає величини ядра яйцеклітини - **жіночого пронуклеусу**. Одночасно чоловічий пронуклеус повертається на 180° і центросомою вперед рухається у бік жіночого пронуклеусу; останній також рухається йому назустріч. Відбувається злиття ядер – **синкаріогамія**, при цьому відновлюється диплоїдний набір хромосом, і синкаріон починає ділитися.

При вивченні фізіології запліднення встановлено, що воно відбувається лише при оптимальній кількості сперматозоїдів. Наприклад, у кроля при штучному заплідненні у сім'яній рідині має бути не менше 1000 і не більше 1000 млн. чоловічих гамет. Це пояснюється у першому випадку недостатньою, у другому – надмірною кількістю ферментів, необхідних для проникнення сперматозоонів у яйцеклітину.

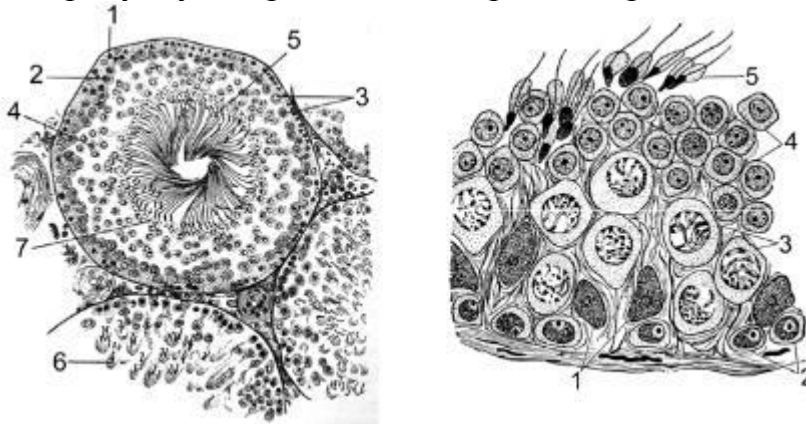
Методика штучного запліднення яйцеклітини людини *in vitro* - **екстракорпорального запліднення** - передбачає видалення яйцеклітини з яєчника хірургічним шляхом перед овуляцією, культивування її у спеціальному хімічному середовищі із сперматозоїдами, де й відбувається злиття гамет, до стадії 8 – 16 бластомерів. Надалі бластоциста імплантується у стінку матки жінки і починає нормально розвиватися.

У людини здатність до репродукції стає можливою після статевого дозрівання. Зберігається здатність до репродукції у жінок до 40 – 45 років (рідко довше), а у чоловіків – до старості, протягом всього життя. Зрілий сім'яник чоловіка безперервно виробляє велику кількість сперматозоїдів; статевозрілий яєчник періодично (один раз у лунний місяць – 28 днів) виділяє дозрілу яйцеклітину, яка дозріває з числа ооцитів, що заклалися на ранніх етапах онтогенезу (до народження) і запаси яких зменшуються протягом життя жінки. Тому потомство, що з'являється у кінці дітородного періоду жінки, розвивається

з ооцитів, у яких за довгий період життя жінки можуть виникати генетичні дефекти. Ось чому у літніх матерів відносно частіше народжуються діти з вродженими аномаліями. Основну небезпеку становить не сам вік матері, а мутагенні фактори і фактори, що впливають на розвиток плоду.

### ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. У результаті елімінації однієї хромосоми в мейоз вступає клітина типу ХО, де О означає відсутність хромосоми. Якими будуть клітини, що утворилися після мейозу?
2. Жінка одержала від матері дві хромосоми неправильної форми, решта - нормальні, від батька одну хромосому аномальну, інші хромосоми нормальні. Яка ймовірність того, що усі три аномальні хромосоми опиняться у одній яйцеклітині: якщо вони є негомологічними; якщо одна батьківська і одна материнська аномальні хромосоми є гомологічними?
3. На рисунку зображений поперечний зріз сім'яника ссавця.



Назвати та вказати зони в сім'яних канальцях, де відбувається формування чоловічих гамет.

4. Перелічити всі стадії профазі I мейозу з їх короткою характеристикою.
5. Яку роль відіграє кон'югація гомологічних хромосом у мейозі?
6. Диплоїдна клітина містить 8 хромосом. В процесі мейозу між гомологічними хромосомами однієї пари відбувся обмін ділянками. Скільки типів гамет (за якістю хромосом, що входять у склад цих клітин) утвориться в результаті мейозу?
7. На яких стадіях поділу проявляються головні відмінності мейозу від мітозу?
8. У материнській клітині перед першим поділом мейозу кількість хромосом дорівнює  $x$ , кількість хроматид –  $m$ , кількість ДНК –  $d$ . Чому дорівнюватимуть ці параметри після редуційного поділу в одній з клітин, які утворилися?
9. У материнській клітині перед першим поділом мейозу кількість хромосом дорівнює  $x$ , кількість хроматид –  $m$ , кількість ДНК –  $d$ . Якими будуть ці параметри після екваційного поділу в одній з клітин, що утворилися?
10. У даної рослини в процесі мікроспорогенезу утворилося 100 пилкових зерен. Скільки материнських клітин пилку приймало участь в їх утворенні?

11. Скільки мікроспор (пилкових зерен) утворюється з однієї материнської клітини мікроспори?
12. Чи можуть яйцеклітини тварин містити більше материнських хромосом, ніж соматичні клітини? Пояснити, чому.
13. Знайти риси відмінності та риси подібності в процесах мітозу та мейозу.

Заповнити таблицю:

Фази	Мітоз	Мейоз (редукційний поділ)
Профаза		
Метафаза		
Анафаза		
Телофаза		
Результат		
Генетичне значення		
Біологічне значення		

## РОЗДІЛ 2. ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УСПАДКУВАННЯ ОЗНАК ПРИ ВНУТРІШНЬОВИДОВІЙ ГІБРИДИЗАЦІЇ

### 2.1. Особливості менделівського спадкування ознак Лабораторне заняття № 5

#### Аналіз моногенного спадкування. Причини відхилень від менделівських закономірностей розщеплення. Множинний алелізм

**Мета:** Ознайомитися з основними закономірностями спадкування ознак при моногібридному схрещуванні; проаналізувати причини відхилень від кількісних закономірностей розщеплення, пов'язаних із диференційною смертністю організмів, малою вибіркою, неповною пенетрантністю та експресивністю генів.

**Матеріал та обладнання:** на кожного студента – набір для роботи з дрозофілою: капельниця з ефіром, ефірізатор (морилка, у найпростішому варіанті – стаканчик для розведення мух з корковою пробкою, на внутрішньому боці якої є поглиблення для вати, на котру крапають ефір); лист щільного білого паперу 10×15 см; препарувальна голка, ручна лупа із збільшенням ×2-×4; половинка чашки Петрі; склянка для «відпрацьованих мух» (0,5 – литрова банка, наповнена на ¼ денатуратом або керосином і закрита половинкою чашки Петрі); вата, таблиці: «Цитологічні основи моногібридного схрещування», «Схема моногібридного схрещування».

**Завдання 1.** Провести генетичний аналіз успадкування ознаки забарвлення тіла дрозофіли, статистичну обробку результатів розщеплення F<sub>2</sub>, одержаних одним студентом, і за сумарними даними, одержаними всіма студентами групи. Використовуючи метод  $\chi^2$ , довести ступінь відповідності фактичного розщеплення в F<sub>2</sub> теоретично очікуваному.

#### Хід виконання завдання 1:

1. Провести гібридизацію двох ліній дрозофіли (материнської – з чорним тілом, батьківської – з сірим). Результати розщеплення в F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> та F<sub>зв</sub> записати в **табл.2.1**. Навести всі три схрещування та результати розщеплення у генетичній символіці.

2. Статистично проаналізувати розщеплення в потомстві гібридів  $F_2$  і  $F_{3в}$ , довести ступінь відповідності фактично одержаного розщеплення теоретично очікуваному методом  $\chi^2$  (за даними, одержаними одним і всіма студентами).

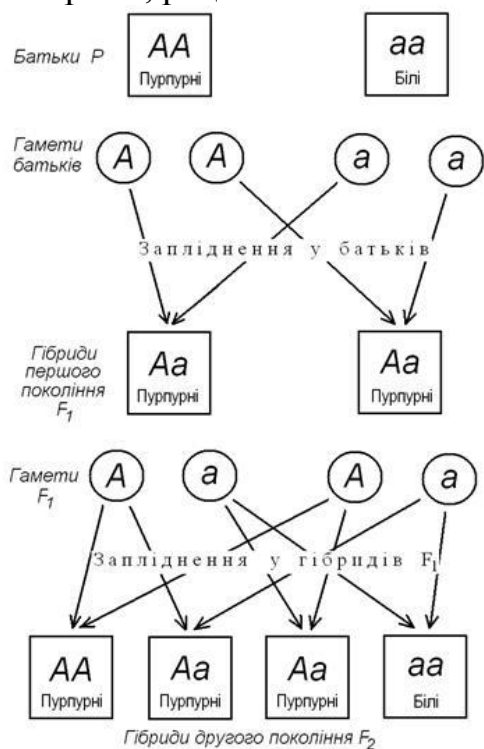
Таблиця 2.1

Результати кількісного аналізу спадкування забарвлення тіла дрозофіли (моногенне спадкування)

	Кількість мух		
	Сірих	Чорних	Всього
Материнська лінія	0	Всі	
Батьківська лінія	всі	0	
<b>F<sub>1</sub>:</b>	всі	0	
<b>F<sub>2</sub> (дані одержані одним студентом):</b>			
Фактичне розщеплення ( $p$ )	78	18	96
Очікуване співвідношення	3/4	1/4	4/4
Теоретично очікуване розщеплення ( $q$ )	72	24	96
<b>F<sub>2</sub> (сумарні дані, одержані всіма студентами):</b>			
Фактичне розщеплення ( $p$ )	1199	385	1584
Очікуване співвідношення	3	1	4
Теоретично очікуване розщеплення ( $q$ )	1188	396	1584
Відхилення ( $d = p - q$ ) = ( $d$ ) <sup>2</sup> =			
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q}$ $n' = 1; \quad P \geq 0,005$			
<b>Результати аналізуючого схрещування F<sub>3в</sub>:</b>			
Дані, одержані всіма студентами групи:	66	58	124
Фактичне розщеплення – сумарні дані, одержані всіма студентами групи ( $p$ )	504	486	990
Очікуване співвідношення	1	1	2
Теоретично очікуване розщеплення ( $q$ )	495	495	990
Відхилення ( $d =$ ( $d$ ) <sup>2</sup> =			
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q}$ $n' = 1; \quad P \geq 0,005$			

**Пояснення до завдання 1. Моногібридним** називається схрещування, при якому батьківські форми відрізняються за однією парою ознак (наприклад, пурпурний колір квітки – білий колір квітки) (рис. 2.1).

Під час проведення генетичного аналізу використовується загальноприйнята символіка. Схрещування позначається значком ( $\times$ ), материнський організм -  $\text{♀}$  (дзеркало Венери), батьківський -  $\text{♂}$  (щит і спис Марса). При написанні схеми схрещування на перше місце ставиться генотип материнської особини, на друге – батьківської (знаки  $\text{♀}$ ,  $\text{♂}$  при ядерній спадковості можна не писати). Батьківські організми, взяті для схрещування, позначаються латинською літерою **P** (*parenta* – батьки). Потомство, одержане в результаті схрещування особин, що відрізняються спадковими задатками, називається *гібридами*, а сукупність таких гібридів – *гібридним поколінням*. Гібридне потомство позначається латинською літерою **F** (*fili* – діти) з цифровим індексом, який відповідає порядковому номеру даного покоління:  $F_1, F_2, F_3, \dots, F_n$ . Гени, що обумовлюють розвиток тієї чи іншої ознаки, позначають буквами латинської абетки. Домінантні гени позначаються великими літерами, рецесивні - малими.



**Рис. 2.1.** – Схема моногібридного схрещування та розщеплення за ознакою забарвлення квіток у гороху посівного

Наприклад, позначимо домінуючий ген пурпурного забарвлення квіток гороху –  $A$ , рецесивний ген білого забарвлення –  $a$ . У кожного диплоїдного організму в нормі ці задатки парні: один алель він одержує з гаметою матері, інший – з гаметою батька. Кожний із генів пари називається *алелем*. **Неалельні гени** визначають різні ознаки (наприклад, колір квітки та форма насіння) та позначаються різними літерами абетки, наприклад,  $A$  і  $B$ . Організми, що мають у генотипі однакові алелі того ж самого гена ( $AA$  або  $aa$ ), називаються *гомозиготними*, а ті, в генотипі яких різні алелі ( $Aa$ ) – *гетерозиготними*.

У гаметі диплоїдного організму присутній лише один алель із кожної алельної пари - **правило чистоти гамет**. Зазвичай гамети позначаються колом, всередину якого вписуються відповідні літерні позначення генів (**G**). При написанні генотипів домінуючі гени кожного алелю пишуться на першому, а рецесивні – на другому місці. Генотип можна записувати в генному ( $AA, Aa, aa; AABB, AaBb$  і т.д.) і в хромосомному

$A A a A B A B$   
 (=, =, =; =, =, = і т.д.) вираженнях.

$A a a A B a b$

Умови задачі записуються в вигляді таблиці, де позначають гени, ознаки та генотипи, що контролюються ними, в вигляді схеми схрещування, в якій наведені або генотипи, або фенотипи всіх наведених в умові задач особин.

У нашому досліді схрещування чорнотілої лінійної самки із сіротілим самцем іншої лінії є моногібридним. У першому поколінні від цього схрещування з'являються гібридні мухи із сірим забарвленням тіла. Це пояснюється тим, що в результаті мейозу гомологічні хромосоми (а з ними й алелі гена, що контролює альтернативні ознаки) розходяться у різні гамети. Але у гомозиготи обидва алелі є однаковими ( $AA$  або  $aa$ ), тому всі 4 гамети несуть той самий алель. Отже, гомозиготна за певним геном особина продукує один тип гамет. Із пари альтернативних ознак у гібридів  $F_1$  проявляється лише одна ознака, домінантна (сіре тіло), інша (чорне тіло) не проявляється. Проявлення у гібридів  $F_1$  ознаки одного із батьків Грегор Мендель назвав **повним домінуванням**, а саме явище пізніше назвали спадкуванням ознаки за **законом домінування** (законом одноманітності гібридів першого покоління). При схрещуванні споріднених гібридів першого покоління між собою в другому поколінні з'являються особини як із домінантними, так і з рецесивними ознаками, тобто спостерігається розщеплення за фенотипом.

Система гібридологічного аналізу в якості обов'язкового елемента включає **аналізуюче схрещування** - схрещування гібрида  $F_1$  з рецесивною батьківською формою. Потомство від такого схрещування позначають  $F_a$ :

P: фенотип  $\text{♀}$  сіра  $\times$  чорний  
 генотип  $Aa \times aa$   
 $G_{\text{♀}} : A; a$      $G_{\text{♂}} : a; a$

$F_a$ : генотип  $Aa; Aa; aa; aa$   
 фенотип:  $\frac{1}{2}$  сірі :  $\frac{1}{2}$  чорні

Отже, в  $F_a$  відбувається розщеплення 1 : 1 за фенотипом і генотипом, тобто розщеплення за генотипом і фенотипом співпадають. Це схрещування дозволяє аналізувати генотип гібрида, оскільки рецесивна батьківська форма дає один тип гамет з рецесивним алелем  $a$ . Якщо від такого схрещування все потомство має один фенотип, то це означає, що батьківська особина, генотип якої аналізується, є гомозиготною; якщо ж у потомстві аналізую чого схрещування відбувається розщеплення, то вихідна батьківська форма є гетерозиготною.

Біологічним механізмом, який забезпечує розщеплення ознак у потомстві гібрида, є мейоз, що обумовлює закономірне розходження до полюсів клітини в анафазі I гомологічних хромосом з алелями гена при утворенні гамет. Аналіз розщеплення проводиться на диплоїдних організмах після процесу запліднення та складних процесів розвитку організмів, унаслідок чого прояв закону розщеплення носить статистичний характер. Виходячи з того, що гамети з алелем  $A$  і алелем  $a$  у гетерозиготного батька утворюються рівноймовірно (з частотою  $\frac{1}{2}$ ), і користуючись правилом множення ймовірностей, можна встановити ймовірність появи того чи іншого генотипного класу. Правило множення ймовірностей

свідчить, що ймовірність спільного здійснення двох або більшої кількості незалежних подій дорівнює добутку ймовірностей кожного з окремо взятих подій.

Зробивши нескладні обчислення, частоту появи кожного з генотипових класів  $F_2$  можна записати у вигляді формули:

$$\frac{1}{4} AA + (\frac{1}{4} Aa + \frac{1}{4} Aa) + \frac{1}{4} aa = \frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Aa + \frac{1}{4} aa.$$

Відповідно, частота появи різних фенотипових класів дорівнює:

$$(\frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Aa) + \frac{1}{4} aa = \frac{3}{4} A- + \frac{1}{4} aa.$$

Цей метод успішно використовується в генетиці при обчисленні ймовірності появи того чи іншого класу потомства, у тому числі в генетиці людини при вивченні характеру спадкування спадкового захворювання. Наприклад, необхідно визначити ймовірність появи дітей-альбіносів у батьків, гетерозиготних за геном альбінізму (Aa), якщо в сім'ї планується мати трьох дітей. За законом розщеплення (другий закон Менделя), ймовірність народження дитини-альбіноса (aa) у двох гетерозиготних батьків ( $Aa \times Aa$ ) дорівнюватиме  $\frac{1}{4}$ . Оскільки за умовою задачі в сім'ї передбачається мати трьох дітей, ймовірність того, що всі з них виявляться альбіносами, дорівнює:  $\frac{1}{4} (aa) \times \frac{1}{4} (aa) \times \frac{1}{4} (aa) = 1/64$ .

Ускладнимо завдання і розрахуємо, яка ймовірність народження в цій сім'ї першого альбіноса і потім двох нормальних дітей:  $\frac{1}{4} (aa) \times \frac{3}{4} (A-) \times \frac{3}{4} (A-) = 9/64$ . Ймовірність появи другої дитини альбіноса, а першого і третього нормального також буде дорівнює  $9/64$ , аналогічно, ймовірність появи третьої дитини альбіноса, а першого і другого нормального – також  $9/64$ .

При аналізі гібридного покоління фактичне розщеплення, одержане в досліді, не завжди відповідає очікуваному, оскільки генетичні співвідношення виражають лише ймовірність того, що при моногібридному схрещуванні у другому поколінні повинно бути  $\frac{3}{4}$  особин з домінантними ознаками та  $\frac{1}{4}$  із рецесивними. При малій кількості нащадків фактичні співвідношення класів розщеплення можуть сильно ухилятися від очікуваних. Але за теорією ймовірностей, чим чисельнішим є фактичний гібридний матеріал, тим точніше співвідношення розщеплення в потомстві гібридів за генотипом і фенотипом відповідають теоретично розрахованим значенням.

Для визначення того, чи відповідає фактичне розщеплення за фенотипом в  $F_2$  теоретично очікуваному співвідношенню, і, якщо не відповідає, чи вважається таке відхилення випадковим або закономірним, використовується дуже простий і зручний метод  $\chi^2$  (*хі - квадрат*), що дозволяє зіставити фактичні (p) і теоретично очікувані (q) результати схрещування. Кожне відхилення (p - q) возводять у квадрат  $(p - q)^2$ , ділять на теоретично очікувану кількість (q) для даного класу, похідні від ділення підсумовують для всіх класів розщеплення та одержують величину  $\chi^2$  за формулою, наведеною в **табл. 2.1**.

Оцінка величини  $\chi^2$  проводиться за таблицею Фішера. За таблицею Фішера з урахуванням кількості ступенів свободи визначають ймовірність випадковості відхилення. **Кількість ступенів свободи** ( $n'$ ) розраховується за формулою:  $n' = n - 1$ , де n – кількість фенотипових класів розщеплення в гібридному потомстві (у нашому випадку із забарвленням тіла дрозофіли таких класів два: сіре тіло – чорне тіло).

**Таблиця значень  $\chi^2$  при різних ступенях свободи  
(за Фішером, із скороченням)**

Кількість ступенів свободи ( $n^1$ )	Імовірність випадковості відхилення, $p$	
	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,341
4	9,488	13,277
5	11,070	15,086
6	12,592	16,812
7	14,067	18,475

Значення  $\chi^2$ , наведені в таблиці, вказують межі, в яких дослідні результати відповідають теоретично очікуванім. При повній відповідності дослідних і теоретичних даних  $\chi^2$  дорівнює 0. Якщо  $\chi^2 \neq 0$ , то різниці величин, що порівнюються, є випадковими (нульова гіпотеза). Ймовірність, яка вказана у таблиці – це ймовірність цієї нульової гіпотези. В статистиці прийнято вважати, що події, які відбуваються з ймовірністю 0,05 і менше, практично не зустрічаються.

Нульова гіпотеза відкидається, якщо значення  $\chi^2$  є більшим за табличне значення, наведене в стовбці  $p = 0,05$  при відповідній кількості ступенів свободи. При цьому відхилення у досліді є не випадковим, воно не може бути пояснено причинами статистичного характеру, тому вважають різниці величин, що порівнюються, суттєвими та закономірними.

У решті випадків, коли  $\chi^2 <$  табличного значення при певній кількості ступенів свободи, відмінності між теоретично розрахованими і фактично одержаними результатами експерименту вважають випадковими, у межах допустимої похибки.

**Завдання 2.** Проаналізувати причини відхилень від менделівських кількісних співвідношень класів розщеплення в гібридному потомстві. Аналіз проводиться під час розв'язання генетичних задач.

Кожна підгрупа студентів виконує завдання окремо, аналізуючи одне з наступних причин відхилень:

**а) відхилення, що пояснюються статистичними причинами, пов'язані з малою вибіркою** (або малою чисельністю гібридного потомства  $F_2$ ).

**Задача.** У 1905 році Бетсон вирішив перевірити справедливість законів Менделя і повторив досліди із схрещування гомозиготних рослин гороху з жовтими і зеленими насінинами. В  $F_1$  усі насінини мали жовте забарвлення сім'ядолей, а в  $F_2$  при самозапиленні рослин, що виростили з гібридного насіння, одержано 3903 насінини із зеленими та 11902 з жовтими сім'ядолями. Чи підтвердив дослід Бетсона справедливість закону розщеплення? Довести це, використовуючи метод  $\chi^2$ .

**б) відхилення від очікуваного розщеплення, пов'язане із присутністю в генотипі летальних генів (плейотропна дія генів)**

**Задача.** При схрещуванні безхвостих кішок одержано 63 безхвостих кошенят та 27 з нормальними хвостами. Чи можна на основі цих даних дійти до висновку



про летальність або нелетальність гена безхвостості у гомозиготному стані? Подальшими даними підтвердилося припущення про те, що більшість кішок із спадково обумовленою безхвостістю є гетерозиготами. В якому напрямку слід вести селекцію, щоб зменшити частку небажаних короткохвостих тварин? Якщо ген безхвостості є летальним у гомозиготному стані і якщо зазвичай плодючість кішок складає у середньому 3,88, то скільки кошенят слід очікувати від схрещування безхвостих кішок?

*Теоретичні відомості. Плейотронія* – здатність мутантного гена впливати на розвиток декількох ознак. Мутація одного гена призводить до порушення обміну на будь-якому етапі біохімічних перетворень речовин в організмі, але оскільки метаболічні шляхи у клітині є багатоступінчастими та взаємопов'язаними, то ця ланка порушеного метаболізму неминуче відображається на наступних етапах обміну речовин, отже, на проявленні інших ознак. *Приклади плейотронії*: домінантний алель сірого забарвлення шерсті каракульських овець у гомозиготному стані спричинює загибель ягня внаслідок недорозвинення травної системи; у людини домінантний ген брахідактилії (короткопалості) фенотипно проявляється при гетерозиготності особи, в гомозиготному стані цей ген призводить до загибелі ембріонів на ранніх стадіях розвитку.

**в) відхилення, пов'язані з неповним проявом дії генів за даних умов (неповна пенетрантність або неповна експресивність)**

**Задача.** Вроджений цукровий діабет обумовлений рецесивним аутосомним геном *d* з пенетрантністю у жінок - 90%, у чоловіків - 70%. Визначити ймовірність народження здорових і хворих дітей у родині, де обидва батьки є гетерозиготними носіями цього гена.

*Теоретичні відомості.* Та ж сама мутантна ознака може проявлятися у одних і не проявлятися у інших особин спорідненої групи. Це явище М. В. Тимофєєв-Ресовський назвав **пенетрантністю** проявлення гена. Пенетрантність вимірюється відсотком особин з мутантним фенотипом у популяції. При повній пенетрантності (100%) мутантний ген проявляє свою дію в кожній особині-носія цього гена; при неповній пенетрантності (менше 100%) ген проявляє свій фенотипний ефект не у всіх особин. Отже, пенетрантність - кількісний показник фенотипної мінливості гена - розраховується (в %) як відношення кількості особин, в яких даний ген виявився фенотипно, до загальної кількості особин, в генотипі яких цей ген присутній у певному стані: гомозиготному (в разі рецесивного пенетрантного гена) або гетерозиготному. Неповна пенетрантність властива дії багатьох генів людини, тварин, рослин і мікроорганізмів. Наприклад, симптоми деяких спадкових захворювань людини виявляються лише в деяких осіб, у генотипі яких присутній аномальний ген; в інших осіб - носіїв цього гена спадкова схильність до хвороби залишається нереалізованою.

**Експресивність гена** – ступінь фенотипного проявлення алеля. Наприклад, алелі груп крові АВ0 у людини мають постійну експресивність (завжди проявляються на 100%), алелі, що визначають забарвлення очей, - мінливу експресивність. Рецесивна мутація, що зменшує кількість фасеток в очах у дрозофіли, в різних особин на різну величину зменшує кількість фасеток аж до повної їх відсутності. Отже, експресивність є реакцією подібних генотипів на середовище.

Експресивність, як і пенетрантність, обумовлені взаємодією генів у генотипі та різною реакцією останнього на фактори зовнішнього середовища; вони характеризують фенотипне проявлення гена. Обидва зазначених явища можуть мати пристосувальне значення для життя організму та популяції, тому ці явища підтримуються природним добром.

**Завдання 3.** Проаналізувати причини відхилень від менделівського розщеплення ознак при різних типах взаємодії алельних генів (повне домінування, неповне домінування, наддомінування, кодомінування, міжалельна комплементация) на прикладах наведених задач. Розв'язавши задачі, визначити, до якого типу взаємодії алельних генів відносяться наведені приклади:

**Задача 1.** Рідкісний рецесивний алель викликає у людини спадкову анофтальмію (відсутність очних яблук). Домінантний алель ( $A$ ) обумовлює нормальний розвиток ока. У гетерозигот очні яблука зменшені. Подружжя є гетерозиготними за геном  $A$ . Визначити розщеплення в  $F_1$  за генотипом та фенотипом.

**Задача 2.** Серпоподібноклітинна анемія – заміна нормального гемоглобіну  $A$  на  $S$  – гемоглобін, в результаті чого еритроцити набувають форми серпа в умовах зниженого вмісту кисню в атмосфері; успадковується як неповно домінантна аутосомна ознака. Гомозиготні індивіди гинуть у ранньому віці. Гетерозиготні люди є життєздатними, їх виявляють, вміщуючи краплю крові у газове середовище без кисню. Малярійний плазмодій не здатний використовувати у живленні  $S$  – гемоглобін, тому люди, які мають цю форму гемоглобіну, не хворіють на малярію. Визначити ймовірність народження дітей, схильних до малярії, у сім'ї, де обидва батьки є стійкими до цього захворювання.

**Задача 3.** У локусі *White* дрозофіли відома серія множинних алелів, що визначає забарвлення очей від темно-червоного до білого кольору, причому кожний попередній алель по мірі зменшення інтенсивності забарвлення повністю домінує над попереднім:  $W^+$  (темно-червоної очі)  $> W^{ch}$  (вишневі)  $> W^e$  (еозинові)  $> W^a$  (абрикосові)  $> W^{bf}$  (руді)  $> W$  (білі). Визначити, скільки різних генотипів і фенотипів є можливим за участю цих алелів, записати їх.

**Задача 4.** У пологовому будинку в ту ж саму ніч народилося четверо малюків із групами крові  $O$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $AB$ . Групи чотирьох батьківських пар були: 1)  $O$  та  $O$ ; 2)  $AB$  і  $O$ ; 3)  $A$  і  $B$ ; 4)  $B$  і  $B$ . Чотирьох малюків можна з повною достовірністю розподілити по батьківським парам. Як це зробити?

**Задача 5.** При скрещуванні стандартних коричневих норок із сріблясто-блакитними в першому поколінні всі цуценя опинилися коричневими, а в другому в декількох пометах було одержано 47 коричневих і 15 сріблясто-блакитних. Як успадковується ознака? Визначити генотипи батьків і гібридів  $F_1$ . Яка частина коричневих норок  $F_2$  гомозиготна?

### Пояснення до завдання 3.

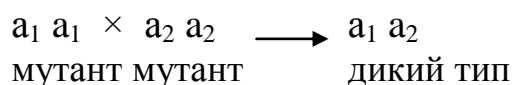
Розрізняють наступні типи взаємодії алельних генів:

- повне домінування** (не спричинює відхилень в  $F_2$ );
- неповне домінування**;
- наддомінування** - домінантний алель у гетерозиготі має сильніший фенотипний прояв, ніж у гомозиготному стані. Наприклад, взаємодія нормального  $S$  і мутантного  $s$  алелей гена, що контролює структуру гемоглобіну в людини.

Людина, гомозиготна за алелем  $s$ , має важке захворювання крові — серповидноклітинну анемію, від якої вони гинуть зазвичай в дитячому віці (еритроцити хворого мають серповидну форму і містять гемоглобін, структура якого змінена в результаті мутації). Проте в тропічній Африці і в районах, де поширена малярія, в популяціях людини постійно присутні всі три генотипи —  $SS$ ,  $Ss$ ,  $ss$ , причому 20—40% населення є гетерозиготами. Виявилося, що збереження в людських популяціях летального алелю ( $s$ ) обумовлено тим, що гетерозиготи ( $Ss$ ) є більш стійкими до малярії, ніж гомозиготи за нормальним геном ( $SS$ ), отже, мають селективну перевагу.

г) **кодомінування** — проявлення в гетерозиготному стані ознаки, що контролюється обома алелями. Наприклад, кожний з алельних генів кодує свій білок, а в гетерозиготного організму синтезуються вони обидва. У таких випадках шляхом біохімічного дослідження можна встановити гетерозиготність без проведення аналізуючого схрещування, що використовується в медико-генетичному консультуванні для виявлення гетерозиготних носіїв генів, які спричиняють хвороби обміну речовин. За типом кодомінування в людини успадковується четверта група крові ( $AB$ ).

д) **міжалельна комплементация** обумовлена явищем множинного алелізму. Множинні алелі виникають у результаті багаторазового мутування того ж самого локусу в хромосомі. Окрім основних (домінантного та рецесивного) алелей гена з'являються проміжні алелі, котрі по відношенню до домінантного поводять себе як рецесивні, а по відношенню до рецесивного — як домінантні алелі того ж самого гена. Міжалельна комплементация спостерігається у *компаундів* ( $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ , і т.д.), якщо продуктом мутантного гена ( $a$ ) слугує поліпептид, який є субодиницею білка — гомомультимера. Об'єднання у компаунд двох рецесивних алельних генів, кожен з яких кодує мутантний поліпептидний ланцюг, призводить до відтворення ознаки дикого типу, тобто із двох типів частково ушкоджених субодиниць збирається білок з майже нормальною функцією. У цих випадках рецесивні алелі того ж гена кодують поліпептиди з ушкодженнями різних доменів (певних функціональних ділянок) у молекулах. Тому схрещування двох фенотипно однакових мутантів призводить до утворення гібридів  $F_1$  дикого типу:



Міжалельна комплементация дуже нагадує результат комплементарної взаємодії генів, однак в останньому випадку взаємодіють продукти неалельних генів.

За типом множинних алелей успадковується система груп крові  $ABO$  у людини. У межах цієї системи існує 4 фенотипи: група I ( $O$ ), група II ( $A$ ), група III ( $B$ ), група IV ( $AB$ ). Кожен з цих фенотипів відрізняється специфічними білками-антигенами, що містяться в еритроцитах, антитілами — у сироватці крові. Фенотип I ( $O$ ) обумовлений відсутністю в еритроцитах антигенів  $A$  і  $B$  і присутністю у сироватці крові вже у новонароджених дітей антитіл  $\alpha$  та  $\beta$ . Фенотип II ( $A$ ) характеризує еритроцити, що містять антиген  $A$  і сироватку крові з антигеном  $\beta$ . Фенотип III ( $B$ ) пов'язаний із присутністю в еритроцитах антигена  $B$ , а у сироватці крові —

антитіла  $\alpha$ . Фенотип IV ( $AB$ ) залежить від присутності в еритроцитах антигенів  $A$  і  $B$  і відсутності у сироватці крові антитіл  $\alpha$  та  $\beta$ .

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Назвати по два види мікроорганізмів, рослин і тварин, зручних для генетичних досліджень. Обґрунтувати свою думку.
2. Які особливості генетичного аналізу у гороху, жита, дріжджів, дрозофіли, бджоли, курки, людини?
3. Дрозофіла в нормі має сіре забарвлення тіла, але, якщо в їжу личинкам додавати нітрат срібла, забарвлення тіла мух буде жовтим. Але існують лінії, в яких мухи є жовтими при будь-якому складі їжі. Якщо ви знайшли жовту муху невідомого походження, то як ви визначите, до першого чи другого типу вона відноситься?
4. Від схрещування рослин редису з овальними коренеплодами одержано 68 рослин із круглими, 130 – з овальними та 71 – з довгими коренеплодами. Пояснити розщеплення. Як успадковується форма коренеплоду в редиса? Визначити генотипи вихідних рослин.
5. Подружня пара належить до груп крові  $B$  і  $A$ , інша пара –  $B$  і  $AB$ . Дитина має групу крові  $O$ . Чия це дитина?
6. Сформулювати правило чистоти гамет. Який дослід підтверджує це правило?
7. Чому закони успадкування ознак Г. Менделя були незрозумілими його сучасникам?
8. Чим відрізняються поняття «компаунд» та «гетерозигота»?
9. Що таке рецус-фактор і як він успадковується?
10. За яких умов виконуються закони Г. Менделя?
11. У чому особливості та генетичне значення гібридологічного методу?
12. Які особливості успадкування ознак при нерегулярних типах статевого розмноження (партеногенезі, гіногенезі, апоміксисі, андрогенезі)?
13. Яке еволюційне значення явища множинного алелізму?
14. У фокстерьєрів іноді спостерігається нервово захворювання, яке запобігає нормальному пересуванню хворих собак. Аномалія спостерігається в цуценят обох статей. Серед 92 цуценят, що народилися в 23 помітах, цей дефект спостерігався в 25. Який висновок можна зробити за цими даними про генетичну обумовленість даного захворювання? Які найбільш імовірні генотипи собак, від яких народилися хворі цуценята ?

### Лабораторне заняття № 6

#### Генетичний аналіз успадкування ознак при дигібридному та полігібридному схрещуваннях

**Мета:** ознайомитися з основними закономірностями незалежного спадкування ознак при дигібридному та полігібридному схрещуваннях; оволодіти принципами проведення генетичного аналізу незалежного комбінування генів у генотипах при внутрішньовидовій гібридизації.

**Матеріал та обладнання:** 1) мутантні лінії дрозофіли *ebony* та *vestigial*; на кожного студента – набір для роботи з дрозофілою: капельниця з ефіром, ефіризатор (морилка, у найпростішому варіанті – стаканчик для розведення мух з

корковою пробкою, на внутрішньому боці якої є поглиблення для вати, на котру крапають ефір); лист щільного білого паперу 10×15 см; препарувальна голка, ручна лупа із збільшенням ×2-×4; половинка чашки Петрі; ємкість для «відпрацьованих мух» (0,5 – литрова банка, наповнена на ¼ денатуратом або керосином і закрита половинкою чашки Петрі); вата; 2) насіння гороху посівного (*Pisum sativum* L.) жовтого та зеленого забарвлення різної форми (гладкі та зморшкуваті); шпателі; розбірні дошки; таблиці.

**Завдання 1.** Провести генетичний аналіз успадкування ознаки забарвлення тіла дрозофіли (сіре – чорне) та довжини крил (довгі – зачаткові), статистичну обробку результатів розщеплення F<sub>2</sub> всіма студентами групи. Використовуючи метод  $\chi^2$ , визначити, чи відповідає фактичне розщеплення в F<sub>2</sub> теоретично очікуваному. Для цього: 1) розділити потомство F<sub>2</sub> на 4 фенотипових класи; 2) підрахувати кількість мух кожного фенотипового класу та записати результат у таблицю; 3) обчислити значення  $\chi^2$  та порівняти його з табличним; 4) скласти висновки та записати схему схрещування.

### Хід виконання завдання 1:

1. Кожному студенту приготувати (протерти стінки і закрити ватними пробками) 10 пробірок із живильним середовищем (по 5 пробірок для прямого та зворотного схрещування).
2. Помістити в пробірки мух для схрещування ( по 2-3 самки і 2 самця). На пробірках написати комбінації схрещувань: P: ♀ *vg* × ♂ *e*; P: ♀ *e* × ♂ *vg*
3. При появі перших лялечок видалити з пробірок батьківських мух (те саме зробити і після схрещування гібридних нащадків F<sub>1</sub>).
4. Розглянути перше покоління дигібридного схрещування, розібравши мушок за спадковими ознаками: сіре тіло, довгі крила – домінантні ознаки; чорне тіло, зачаткові крила – рецесивні ознаки. Одержані дані записати в зошит:

№ пробірки	Комбінація схрещування батьківських форм	Мухи	
		♀ сірі з довгими крилами	♂ чорні із зачатковими крилами
1	♀ <i>e<sup>+</sup> e<sup>+</sup> vg<sup>+</sup> vg<sup>+</sup></i> × ♂ <i>e e vg vg</i>	♀ сірі з довгими крилами	♂ чорні із зачатковими крилами
2	♀ <i>e e vg vg</i> × ♂ <i>e<sup>+</sup> e<sup>+</sup> vg<sup>+</sup> vg<sup>+</sup></i>	♀ чорні із зачатковими крилами	♂ сірі з довгими крилами
3. Кількість мух у потомстві F <sub>1</sub> (пряме схрещування)	<i>e<sup>+</sup> e vg<sup>+</sup> vg</i>	Всі сірі з довгими крилами	
4. Кількість мух у потомстві F <sub>1</sub> (зворотне схрещування)	<i>e<sup>+</sup> e vg<sup>+</sup> vg</i>	Всі сірі з довгими крилами	

5. Поставити дослід на схрещування гібридних мух F<sub>1</sub> для одержання другого покоління (по 5 пробірок для гібридів прямого і зворотного схрещувань). На пробірках написати комбінації схрещувань: F<sub>2</sub>: від F<sub>1</sub> (♀ *e* × ♂ *vg*);

F<sub>2</sub>: від F<sub>1</sub> (♀ vg × ♂ e ).

6. Визначити характер успадкування батьківських ознак у другому поколінні гібридів (F<sub>2</sub>). Мух розподілити на чотири групи за таким сполученням ознак: сірі крилаті, сірі з зачатковими крилами, чорні крилаті, чорні з зачатковими крилами. Підрахувати кількість мух кожної групи і встановити числове співвідношення цих груп. Результати записати в зошит (приклад):

№ пробірки	Комбінація схрещування	Кількість мух F <sub>2</sub> :			
		сірі крилаті e <sup>+</sup> - vg <sup>+</sup> -	сірі із зачатковими крилами e <sup>+</sup> - vg vg	чорні крилаті vg vg e <sup>+</sup> -	чорні із зачатковими крилами e e vg vg
1	♀ e <sup>+</sup> e vg <sup>+</sup> vg × ♂ e <sup>+</sup> e vg <sup>+</sup> vg	<b>319</b>	<b>102</b>	<b>108</b>	<b>31</b>
2	♂ e <sup>+</sup> e vg <sup>+</sup> vg × ♀ e <sup>+</sup> e vg <sup>+</sup> vg	<b>320</b>	<b>100</b>	<b>107</b>	<b>30</b>

7. Результати досліду порівняти з теоретично очікуваними значеннями. При дигібридному схрещуванні розщеплення за фенотипом відбувається у співвідношенні 9:3:3:1 (закон незалежного комбінування ознак Менделя). Мухи з двома домінантними ознаками повинні становити 9 частин від загальної кількості, по 3 частини – мухи з однією домінантною та однією рецесивною ознаками, 1 частину – мухи, рецесивні за двома ознаками.

8. Визначити ступінь відповідності фактично одержаних даних теоретично очікуваним за методом  $\chi^2$ . Для цього скласти робочу таблицю (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Обчислення результатів дигібридного схрещування дрозофіли

Клас	p	q	p - q	(p - q) <sup>2</sup>	$\frac{(p - q)^2}{q}$
Сірі крилаті	319	315	+4	16	0,05
Сірі із зачатковими крилами	102	105	- 3	9	0,08
Чорні крилаті	108	105	+ 3	9	0,08
Чорні із зачатковими крилами	31	35	- 4	16	0,05
Всього	560	360	-	-	$\Sigma = 0,26$

Обчисливши величину  $\chi^2$ , визначають її місце в таблиці Фішера (див. лабораторну роботу № 4). Для цього знаходять у третьому рядку таблиці значення  $\chi^2$  при кількості ступенів свободи  $n = n - 1 = 3$  та порівнюють з обчисленим  $\chi^2 = 0,26 < \chi^2 = 7,815$ . Отже, відхилення наведених дослідних даних від теоретично очікуваних є несуттєвим.

**Завдання 2.** Проаналізувати розщеплення гібридів F<sub>2</sub> за забарвленням і формою насінин гороху самостійно: 1) розділити насінини гороху на чотири фенотипних класи; 2) підрахувати горошини кожного фенотипного класу та записати результат у **табл. 2.3**; 3) обчислити значення  $\chi^2$  і порівняти його з табличним; 4) з'ясувати: чи є відхилення випадковим? Чи незалежно одна від одної успадковуються забарвлення та форма насінин гороху? скількома парами алельних генів контролюються ознаки? Записати ці висновки та схеми схрещування.

Таблиця 2.3

Аналіз розщеплення в F<sub>2</sub> при дигібридному спадкуванні ознак гороху

Фенотипні класи	Очікувана частка	Кількість		Відхилення p-q (d)	d <sup>2</sup>	d <sup>2</sup> /q
		Фактична, p	Очікувана, q			
жовті гладкі	9	211	213,75			
жовті зморшкуваті	3	75	71,25			
зелені гладкі	3	68	71,25			
зелені зморшкуваті	1	26	23,75			
<b>Разом</b>	<b>16</b>	<b>380</b>	<b>380</b>			

У другому поколінні гібридів спостерігається розщеплення за забарвленням і формою насінин на 4 фенотипних класи: 211 жовтих гладких, 75 жовтих зморшкуватих, 68 зелених гладких і 26 зелених зморшкуватих.

Припускаємо дигенне успадкування ознаки та визначаємо теоретичне розщеплення 9 : 3 : 3 : 1.

380 насінин складають 16 частин, 1 частина – 23,75 насінин. Визначаємо очікуване співвідношення фенотипових класів (q) (**табл. 2.3**). Кількість ступенів свободи дорівнює 3 = (4 – 1). При  $\chi^2 = 0,57$  імовірність знаходиться між 0,95 > P > 0,90.

**Пояснення до завдання 2.** *Дигібридним* називається схрещування, в якому батьківські форми відрізняються за двома парами ознак: наприклад, у гороху за формою насінин (гладка або зморшкувата) та їх забарвленням (жовта або зелена). У цьому випадку розподілення генів відповідає незалежному розходженню двох пар гомологічних хромосом під час мейозу.

При утворенні гамет у кожену гамету випадковим чином розходиться по одній хромосомі з кожної гомологічної пари (отже, по одному алелю кожного гена). З чотирьох гамет дві матимуть алель A, дві - a:

A            a  
a            A

Одночасно дві з чотирьох гамет матимуть алель B і дві - b, котрі можуть попасти в гамету або з A, або з a:

AB            aB  
Ab            ab

При сполученні цих гамет утворюється 4<sup>2</sup> = 16 комбінацій алелей, отже 16 всіх можливих генотипів. В F<sub>2</sub> за кожною ознакою спадкування відбувається незалежно від іншої ознаки - третій закон Менделя - **закон незалежного**

**комбінуння ознак.** Розщеплення за кожною парою ознак окремо відбувається аналогічно розщепленню при моногібридному схрещуванні в співвідношенні 3:1. За фенотипом в  $F_2$  розщеплення дає  $2^2 = 4$  класи в співвідношенні:

$$(3A - : 1aa) \times (3B - : 1bb) = 9A - B - : 3A - bb : 3aaB - : 1aabb$$

жовтих гладких
жовтих зморшкуватих
зелених гладких
зелених зморшкуватих

За генотипом в  $F_2$  розщеплення відбувається на  $3^2 = 9$  класів у співвідношенні:  $(1AA : 2Aa : 1aa) \times (1BB : 2Bb : 1bb) = 1AABB : 2AABb : 1AAbb : 2AaBB : 4AaBb : 2Aabb : 1aaBB : 2aaBb : 1aabb$ .

Отже, коефіцієнт гомозиготного генотипу - 1 ( $AABB, AAbb, aaBB, aabb$ ); гетерозиготного генотипу за одним геном - 2 ( $AABb, AaBB, Aabb, aaBb$ ); гетерозиготного генотипу за двома генами - 4 ( $AaBb$ ).

Для визначення гетерозиготності організму використовують **аналізуюче схрещування** – схрещування форми з невідомим генотипом з рецесивною гомозиготною формою. Якщо організм є гомозиготним за обома парами домінантних генів  $A$  і  $B$ , то всі нащадки матимуть однаковий фенотип (жовті гладкі), а за генотипом вони будуть дигетерозиготними ( $AABB \times aabb \rightarrow AaBb$ ). Якщо ж організм дигетерозиготний, то буде спостерігатися розщеплення за фенотипом ( $\frac{1}{4}$  жовті гладкі :  $\frac{1}{4}$  жовті зморшкуваті :  $\frac{1}{4}$  зелені гладкі :  $\frac{1}{4}$  зелені зморшкуваті), а за генотипом -  $\frac{1}{4} AaBb : \frac{1}{4} Aabb : \frac{1}{4} aaBb : \frac{1}{4} aabb$ .

**Завдання 3.** Оволодіти основними принципами проведення генетичного аналізу спадкування ознак при ди- та полігібридному схрещуваннях (приклад генетичного аналізу спадкування наведені в кінці завдання 3).

Закріпити набуті знання під час розв'язання генетичних задач:

**Задача 1.** У собак ознаки довжина шерсті, форма вух і присутність плям на тілі успадковуються незалежно. Довга шерсть ( $l$ ) є рецесивною ознакою по відношенню до короткої ( $L$ ), висяче вухо ( $H$ ) домінує над прямим ( $h$ ), присутність білих плям на тілі ( $S$ ) – над їх відсутністю. Схрестили гетерозиготних короткошерстних з білими плямами і прямими вухами собак і гетерозиготних висловухих з білими плямами собак, які мають довгу шерсть. Одержали 40 цуценят.

Скільки різних типів гамет може утворювати кожна з батьківських тварин?

Скільки різних генотипів буде спостерігатися від такого схрещування?

Скільки різних фенотипів може зустрічатися серед цуценят?

Яка частина висловухих потомків буде мати коротку шерсть і білі плями на тілі?

Яка частина цуценят буде довгошерстними?

**Задача 2.** При схрещуванні рослин пшениці, які мають щільний остистий колос, з рослиною, що має рихлий безостий колос, в  $F_1$  всі рослини мають безосте колосся середньої щільності. В  $F_2$  одержали безостих з щільним колосом – 58, безостих з колосом середньої щільності – 125, безостих з рихлим колосом – 18, остистих з колосом середньої щільності – 40, остистих з щільним колосом – 18, остистих з рихлим колосом – 21. Як успадковуються ознаки, що вивчаються? Які генотипи батьківських рослин?

**Задача 3.** У вівса нормальна висота стебла домінує над гігантизмом, а ранньостиглість – над пізньостиглістю. Ознаки успадковуються незалежно. Схрещуються ранньостигла рослина нормальної висоти з пізньостиглим гігантом.



Вихідні рослини гомозиготні. В якому поколінні з'являться гомозиготні ранньостиглі гіганти та з якою ймовірністю?

**Задача 4.** В  $F_1$  від схрещування червоноколосих безостих рослин пшениці з білоколосими остистими рослинами всі опинилися червоноколосими безостими, а в  $F_2$  відбулося розщеплення: 159 красноколосих безостих; 48 красноколосих остистих; 57 білоколосих безостих; 16 білоколосих остистих. Яка частина рослин  $F_2$  буде гетерозиготною за обома ознаками? Яке розщеплення ви очікуєте одержати в аналізуючому схрещуванні; яку форму слід використати в якості аналізатора?

**Задача 5.** Короткозорий (домінантна ознака) лівша (рецесивна ознака) вступає в шлюб з жінкою, нормальною за обома ознаками. Відомо, що у обох подружжя були брати і сестри, які хворіли на фенілкетонурію, але самі подружжя нормальні у відношенні цієї аномалії. В їхній родині перша дитина була нормальна щодо всіх трьох ознак, друга - короткозора лівша, а третя - хвора на фенілкетонурію. Визначити генотипи батьків та всіх трьох дітей, а також ймовірність їх появи в потомстві.

**Задача 6.** Від схрещування чорної курки без гребня з червоним півнем, який має гребень, всі нащадки першого покоління мали гребень і чорне оперіння. Як розподіляться ці ознаки серед 500 нащадків другого покоління, якщо ознаки успадковуються незалежно та кожна з них контролюється одним геном? Які ознаки рецесивні?

**Задача 7.** Рослина має генотип  $AaBbccDdEE$ . Гени успадковуються незалежно. 1) Скільки типів і яких гамет утворює ця рослина? 2) Скільки фенотипів, і в якому співвідношенні буде в потомстві цієї рослини при самозапиленні: а) при умові повного домінування за всіма генами? б) при умові неповного домінування за геном  $A$ ?

**Задача 8.** Рослина з генотипом  $AaBBCcDd$  самоопилюється. Гени успадковуються незалежно. Яку частину потомства складають наступні генотипи: 1)  $Aabbccdd$ ; 2)  $AABbCcDD$ ; 3)  $aabbccdd$ ?

**Пояснення до завдання 3.** При вільному комбінуванні генів у гаметах при моногібридному схрещуванні двох гетерозигот у наступному потомстві ( $F_2$ ) кількість гетерозиготних генотипів складає 2. Тоді в полігібридних схрещуваннях (ди-, три-, тетра- і т.д.) частота утворення генотипів складатиме: гомозиготних -  $(2^0) = 1$ , моногетерозигот -  $(2^1) = 2$ , дигетерозигот -  $(2^2) = 4$ , полігетерозигот -  $2^n$ , де  $n$  - ступінь гетерозиготності (**табл. 2.4**). Наприклад,  $aaBbCcDdEe$  - тетрагетерозигота. Назва зиготи визначає кількість гетерозиготних пар алелей, при цьому гомозиготні алелі не враховуються, оскільки гени в гомозиготному стані не дають розщеплення. Розраховуємо: кількість типів гамет -  $(2^4) = 16$ ; кількість генотипів  $F_2$  -  $(3^4) = 81$ ; суму комбінацій гамет в  $F_2$  -  $(4^4) = 256$ ; кількість фенотипів  $F_2$  при повному домінуванні -  $(2^4) = 16$  (вона дорівнює кількості типів гамет) (**табл. 2.4**).

Таблиця 2.4

Кількість класів гібридних особин за фенотипом і генотипом та характер розщеплення в  $F_2$  при різній кількості пар ознак і повному домінуванні

Схрещування	Кількість альтернативних пар ознак	Кількість типів гамет	Кількість можливих комбінацій гамет в зиготі	Кількість класів розщеплення		Кількісне співвідношення класів за фенотипом
				за фенотипом	за генотипом	
моногібридне	1	$2^1=2$	$4^1=4$	$2^1=2$	$3^1=3$	3:1
Дигібридне	2	$2^2=4$	$4^2=16$	$2^2=4$	$3^2=9$	9:3:3:1
Тригібридне	3	$2^3=8$	$4^3=64$	$2^3=8$	$3^3=27$	27:9:9:9:3:3:3:1
тетрагібридне	4	$2^4=16$	$4^4=256$	$2^4=16$	$3^4=81$	$(3:1)^4$
Полігібридне	N	$2^n$	$4^n$	$2^n$	$3^n$	$(3:1)^n$

Існують правила вписування гамет, що дозволяє це зробити швидко і точно. По-перше, кількість типів гамет ділять на 2, оскільки половина їх буде нести домінуючий, половина – рецесивний алель. У нашому прикладі:  $16 : 2 = 8$ . Отже, слід 8 разів поспіль написати **B**, потім 8 разів – **b**. Оскільки логіка судження для кожної гетерозиготної пари залишається однаковою, то для наступного гена 8 ділять на 2 і 4 рази поспіль пишуть **C**, потім 4 рази – **c** і т.д. Для наступного гена 4 ділять на 2, 2 рази поспіль пишуть **D** і 2 рази – **d**; **E** залишається написати через раз. Що стосується гомозиготних сполучень, то вони є однаковими в кожній гаметі. Отже:

- |              |               |
|--------------|---------------|
| 1) a B C D E | 9) a b C D E  |
| 2) a B C D e | 10) a b C D e |
| 3) a B C d E | 11) a b C d E |
| 4) a B C d e | 12) a b C d e |
| 5) a B c D E | 13) a b c D E |
| 6) a B c D e | 14) a b c D e |
| 7) a B c d E | 15) a b c d E |
| 8) a B c d e | 16) a b c d e |

Після написання гамет можна легко написати фенотипові радикали  $F_2$ , ними будуть всі перелічені типи гамет. Не слід забувати, що наявність рецесивного алеля в гаметі потребує його написання і в радикалі. Для прискорення роботи можна одночасно виставляти коефіцієнти перед радикалами, для чого визначають ступінь гетерозиготності в радикалі та число 3 возводять у відповідний ступінь:

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| 1) 81 aa B- C- D- E- | 9) 27 aa bb C- D- E- |
| 2) 27 aa B- C- D- ee | 10) 9 aa bb C- D- ee |
| 3) 27 aa B- C- dd E- | 11) 9 aa bb C- dd E- |
| 4) 9 aa B- C- dd ee  | 12) 3 aa bb C- dd ee |
| 5) 27 aa B- cc D- E- | 13) 9 aa bb cc D- E- |
| 6) 9 aa B- cc D- ee  | 14) 3 aa bb cc D- ee |
| 7) 9 aa B- cc dd E-  | 15) 3 aa bb cc dd E- |
| 8) 3 aa B- cc dd ee  | 16) 1 aa bb cc dd ee |

Тепер знайдемо суму всіх коефіцієнтів. Якщо одержимо  $4^4 = 256$ , то помилок немає. Яким чином розшифрувати будь-який фенотиповий радикал, тобто як

написати приховані в ньому генотипи? Спочатку слід визначити, скільки їх має бути. Наприклад, радикал  $81\ aаВ-С-D-E-$  об'єднує  $2^4 = 16$  генотипів. Як написати їх швидко та без помилок? Для цього використовуємо той самий спосіб, що й при виписуванні гамет. Під радикалом існують два різні генотипи: гомозигота та гетерозигота. Тому  $16:2= 8$  разів поспіль пишуть **ВВ** та 8 разів – **Вв**, потім по 4 рази **СС** та **Сс**, по 2 рази **DD** і **Dd**, через раз **ЕЕ** та **Ее**. Потім проставляють коефіцієнти, визначаючи їх у відповідності з наведеним вище правилом ступеню гетерозиготності:

- |                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| 1) аа ВВ СС DD ЕЕ - 1 | 9) аа Вb СС DD ЕЕ – 2   |
| 2) аа ВВ СС DD Ее - 2 | 10) аа Вb СС DD Ее - 4  |
| 3) аа ВВ СС Dd ЕЕ - 2 | 11) аа Вb СС Dd ЕЕ - 4  |
| 4) аа ВВ СС Dd Ее - 4 | 12) аа Вb СС Dd Ее - 8  |
| 5) аа ВВ Сс DD ЕЕ - 2 | 13) аа Вb Сс DD ЕЕ – 4  |
| 6) аа ВВ Сс DD Ее - 4 | 14) аа Вb Сс DD Ее – 8  |
| 7) аа ВВ Сс Dd ЕЕ - 4 | 15) аа Вb Сс Dd ЕЕ – 8  |
| 8) аа ВВ Сс Dd Ее - 8 | 16) аа Вb Сс Dd Ее – 16 |

Якщо сума коефіцієнтів дорівнює 81, частота генотипів визначена правильно.

### **Приклади проведення генетичного аналізу спадкування полігенних ознак**

**Приклад 1.** При скрещуванні рослин томатів, одна з котрих мала червоні плоди з гладкою шкіркою, а друга – жовті опушені плоди, в  $F_1$  всі рослини мали червоні гладкі плоди. При схрещуванні гібридів одержали 258 рослин з червоними гладкими плодами, 95 – з червоними опушеними, 100 – з жовтими гладкими та 28 – з жовтими опушеними. Як успадковуються ознаки? Визначити генотипи батьків і гібридів.

#### **Хід проведення аналізу:**

1. Відсутність розщеплення в  $F_1$  свідчить про гомозиготність батьківських форм. Оскільки в  $F_2$  спостерігається розщеплення на чотири фенотипних класи, припускаємо незалежне успадкування ознак.

2. Визначаємо величину одного можливого сполучення гамет:  $481 : 16 = 30,1$ . Знаходимо розщеплення в досліді:  $258 : 30,1 = 8,6$ ;  $95 : 30,1 = 3,1$ ;  $100 : 30,1 = 3,3$ ;  $28 : 30,1 = 0,9$ , тобто приблизно  $9 : 3 : 3 : 1$ . Отже, ознаки успадковуються незалежно. Вводимо позначення алелей: А – червоне забарвлення плодів, а – жовте забарвлення плодів, В – гладка шкірка плодів, в – опушена шкірка плодів.

**Висновки:** 1. Ознаки контролюються двома парами алельних генів з домінуванням червоного забарвлення плодів над жовтим і гладкої шкірки плодів над опушеною. 2. Генотипи батьків – ААВВ – червоні гладкі плоди, аавв – жовті опушені, гібридів  $F_1$  – АаВв – червоні гладкі плоди.

**Приклад 2.** При схрещуванні високої рослини духмяного горошку з жовтими круглими насінинами з карликовою рослиною з зеленими круглими насінинами одержано розщеплення:  $3/8$  високих рослин із зеленими круглими насінинами,  $3/8$  – карликових із зеленими круглими насінинами,  $1/8$  – високих із зеленими зморшкуватими насінинами и  $1/8$  – карликових зелених із зморшкуватими насінинами. Визначити генотипі всіх рослин.

#### **Хід проведення аналізу:**

1. В  $F_1$  спостерігається одноманітність за забарвленням насінин, отже батьківські форми гомозиготні за цією ознакою.

2. За рештою ознак при їх розщепленні –  $3/8 : 3/8 : 1/8 : 1/8$  (8 комбінацій гамет), припускаємо, що один з батьків утворює чотири типи гамет, тобто є дигетерозиготним – **AaBbCc** (висока з жовтими круглими насінинами), інший – 2 типи гамет, тобто є гетерозиготним за ознакою форми насінин – **aaBBcc** (карликова з зеленими круглими насінинами):

Гамети:	♂ aBC	♂ aBc
♀ ABc	AaBbCC	AaBbCc
♀ Abc	AaBbCc	AaBbcc
♀ aBc	aaBbCC	aaBbCc
♀ abc	aaBbCc	aaBbcc

**Висновки:** генотипи вихідних рослин – AaBbCc та aaBBcc; генотипи нащадків –  $3/8$  AaBbC– (висока з зеленими круглими насінинами);  $3/8$  aaBbC– (карликова з зеленими круглими насінинами);  $1/8$  AaBbcc (висока із зеленими зморшкуватими насінинами);  $1/8$  aaBbcc (карликова із зеленими зморшкуватими насінинами).

**Приклад 3.** Рослина має генотип AABbccDd. Гени успадковуються незалежно.

1) Які типи гамет та скільки їх утворює ця рослина? 2) Скільки фенотипів і в якому співвідношенні може з'явитися в потомстві цієї рослини при самозапиленні: а) при умові повного домінування за всіма генами? б) при умові неповного домінування за геном В?

**Хід проведення аналізу:**

1. Кількість типів гамет визначаємо за формулою  $2^n$ , де  $n$  – кількість генів у гетерозиготному стані (табл. 3). Типів гамет  $2^2 = 4$  (гени  $A$  та  $c$  в гомозиготному стані).

2. Визначаємо гамети: ABcd; ABcD; AbcD; Abcd.

3. При розщепленні за двома генами (В і D) в потомстві можлива поява  $2^2 = 4$ -х фенотипів.

а) при визначенні співвідношення фенотипів при умові повного домінування за всіма генами визначають ймовірність появи кожного фенотипу в  $F_2$  за теорією ймовірності. При незалежному спадкуванні генів ймовірність домінантного фенотипу за кожним геном при повному домінуванні ознак дорівнює  $3/4$ , рецесивного –  $1/4$ , тобто за геном В: ( $3/4$  В– :  $1/4$  vv), за геном D: ( $3/4$  D – :  $1/4$  dd). Знайшовши добуток ймовірностей, одержуємо:  $9/16$  AAB–ccD – :  $3/16$  AAB–ccdd :  $3/16$  AABbccD – :  $1/16$  AABbccdd.

б) співвідношення фенотипів при неповному домінуванні за геном В: ( $1/4$  BB :  $2/4$  Bb :  $1/4$  bb), за геном D: ( $3/4$  D – :  $1/4$  dd). Знайшовши добуток ймовірностей, одержуємо:  $3/16$  AABVccD – :  $6/16$  AABVccD – :  $3/16$  AABvccD – :  $1/16$  AABVccdd :  $2/16$  AABvccdd :  $1/16$  AABvccdd. Всього 6 фенотипов в соотношении 6 : 3 : 3 : 2 : 1 : 1.

### ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке дигібридне схрещування? Навести приклади.
2. Сформулюйте закон незалежного комбінування неалельних генів.
3. Назвіть формули розщеплення гібридів  $F_2$  за генотипом і фенотипом при дигібридному схрещуванні?
4. Які схрещування називають аналізуючими? Яке розщеплення спостерігається в таких схрещуваннях?

5. Що таке полігібридне схрещування? Як визначити кількість фенотипів і генотипів у полігібридних схрещуваннях при повному та неповному домінуванні?
6. Дайте визначення термінам: бекрос, реципрокне схрещування, алель, алельні гени, неалельні гени.
7. За яких умов спостерігається спадкування ознак за законами Менделя?
8. У чому сутність правила чистоти гамет? Який дослід може підтвердити це правило?

## 2.2. Взаємодія неалельних генів

Іноді під час аналізу спадкування деяких ознак у гібридів спостерігаються незвичні для менделівського розщеплення співвідношення фенотипів, наприклад, 9:7, 9:6:1, 9:3:4, 12:3:1, 13:3, 15:1 та інші. Ці випадки на перший погляд спростовують універсальність законів Менделя. Однак, як це часто трапляється в генетиці, уважний аналіз відхилень від менделівських формул розщеплення тільки підтверджує загальну закономірність, з якої ці відхилення можуть походити.

Типові менделівські співвідношення фенотипних класів у гібридів спостерігаються, якщо кожна пара ознак контролюється парою алелей гена; проявлення таких ознак не залежить від експресії інших генів. Але існують ознаки організму, що формуються в результаті активності декількох генів. У цьому випадку при появі в генотипі нових комбінацій алелей фенотип особини змінюється. Інакше кажучи, неалельні гени, зустрічаючись у генотипі та взаємодіючи продуктами своєї експресії (білки, пігменти, гормони, ферменти), спричиняють розвиток нової ознаки або видозміну існуючої. Неалельні гени локалізовані в різних парах гомологічних хромосом або в одній парі гомологічних хромосом, але в різних її локусах. Розрізняють наступні типи взаємодії неалельних генів: **комплементарність, епістаз, полімерія, плейотронія.**

### Лабораторне заняття № 7

#### Генетичний аналіз успадкування ознак при неалельній взаємодії генів

**Мета:** Ознайомитися з основними закономірностями спадкування ознак, що контролюються взаємодією білків - продуктів неалельних генів; оволодіти принципами проведення генетичного аналізу спадкування ознак при різних типах неалельної взаємодії.

**Матеріал та обладнання:** мутантні лінії дрозофіли *brown* і *scarlet*. Обладнання для роботи з дрозофілами (див. лабораторні роботи № 5 і № 6).

**Завдання 1.** Провести генетичний аналіз успадкування ознаки забарвлення очей дрозофіли при схрещуванні рецесивних мутантів ***brown*** і ***scarlet***. Мутантний ген ***brown*** зумовлює коричневе забарвлення очей, а ***scarlet*** – яскраво-червоне (ген ***bw*** локалізований у II-й хромосомі, ген ***st*** – III-й хромосомі). Визначити тип успадкування ознак.

**Хід виконання завдання:**

1. Поставити дослід на схрещування мутантних ліній *brown* і *scarlet* (по 5 пробірок на кожного студента). На пробірках написати схему схрещування:  
P: ♀ *bw* x ♂ *st*
2. Переглянути F<sub>1</sub>. (Усі мухи мають нову ознаку – червоні очі за домінантними алелями генів *bw* і *st*).
3. Провести схрещування гібридних мух F<sub>1</sub> між собою. На пробірках написати схему схрещування: F<sub>2</sub> від F<sub>1</sub> (♀ *bw* x ♂ *st*).
4. З'ясувати тип успадкування забарвлення очей у мух F<sub>2</sub>. У цьому поколінні серед усіх мух виявилася ще одна нова ознака – білі очі; ця ознака зумовлена гомозиготним станом рецесивних алелів *bw* і *st*.
5. Мух F<sub>2</sub> розподілити на чотири фенотипні класи – з червоними очима, коричневими, яскраво-червоними, білими. Підрахувати мух кожного класу і встановити числове співвідношення розщеплення ознаки. Результати записати в зошит і визначити ступінь відповідності фактично одержаного розщеплення теоретично очікуваному за допомогою метода  $\chi^2$  (приклад):

Комбінація схрещування	Фенотип мух F <sub>2</sub> (вибірка – 257 мух)			
	червоні	Коричневі	яскраво-червоні	Білі
фактично одержане розщеплення (p)	142	48	50	17
Співвідношення фенотипних класів F <sub>2</sub>	9	3	3	1
теоретично очікуване співвідношення фенотипів (q)				

6. Написати схему схрещування за ознакою забарвлення очей у дрозофіл і провести генотипний аналіз.

**Пояснення до завдання 1.** У модельного генетичного об'єкту плодової мушки *Drosophila melanogaster* існує велика кількість форм, які спадково відрізняються за забарвленням очей. У мух дикого типу (найпоширенішого в природі), очі темно-червоні. Існують форми з яскраво-червоними очима. Ця ознака рецесивна відносно ознаки дикого типу. Вона успадковується за моногібридною схемою при схрещуванні мух із темно-червоними очима та мух з яскраво-червоними очима. Відповідний ген позначається: *st* (*skarlet*) – яскраво-червоні очі (рецесивна ознака), *st*<sup>+</sup> – темно-червоні очі (домінантна ознака). Існують також мухи з коричневими очима. Це також рецесивна ознака, що успадковується за моногібридною схемою при схрещуванні мух дикого типу і мух з коричневими очима. Відповідний ген позначається *bw* (*brown*) – рецесивна ознака (коричневі очі); *bw*<sup>+</sup> – домінантна ознака (темно-червоні очі). Якщо схрестити мух з яскраво-червоними та з коричневими очима, то в першому гібридному поколінні всі мухи матимуть темно-червоні очі (дикий тип), а в F<sub>2</sub> з'являться чотири класи

розщеплення: мухи з темно-червоними, яскраво-червоними, коричневими, білими очима в співвідношенні 9:3:3:1. Для пояснення цього результату використаємо логіку генетичного аналізу.

Результати схрещування в першому гібридному поколінні свідчать, що існує певний тип взаємодії генів. Можна припустити, що це взаємодія алелей одного гена при моногібридному схрещуванні. Однак в  $F_2$  з'являються чотири класи (а не три, як у випадку взаємодії алелей при неповному домінуванні) у співвідношенні, характерному для дигібридного схрещування при повному домінуванні за обома ознаками, і серед них формується самий малочисельний клас – мухи з білими очима. Якщо припущення про те, що це схрещування є дигібридним, справедливе, то генотипи батьківських форм записують таким чином: P: ♀  $st\ st\ bw^+\ bw^+$  х ♂  $st^+\ st^+\ bw\ bw$

Враховуючи, що алелі  $st$  і  $bw$  рецесивні, можна пояснити появу перших трьох фенотипових класів  $F_2$ . У присутності в генотипі доміnantних алелей  $st^+$  і  $bw^+$  мухи мають дикий фенотип за забарвленням очей (9/16 - з темно-червоними очима). При гомозиготності тільки за рецесивним алелем  $st^+ - bw\ bw$  мухи матимуть коричневі очі (3/16); так само при гомозиготності тільки за  $bw^+ - st\ st$  мухи матимуть яскраво-червоні очі (3/16). Нарешті, залишається останній клас – подвійний гомозиготний рецесив (1/16  $ststbwbw$ ) - мухи з білими очима. Всі ці висновки можна перевірити, надалі досліджуючи розщеплення після аналізуючих схрещувань і схрещувань між собою особин  $F_2$ . Отже, припущення про дигенне спадкування в цьому схрещуванні підтверджується, а новоутворення – білооких мух в  $F_2$  - є результатом взаємодії рецесивних алелів  $st$  і  $bw$ . Такий тип взаємодії генів називається **комплементарністю** (тобто взаємне додавання, доповнення); при цьому доміnantні алелі обох генів зумовили нормальний (або дикий) фенотип. В  $F_2$  рецесивні алелі цих генів обумовили появу білооких мух. Наведений приклад є прикладом формально-генетичного аналізу, за якого повністю абстрагуються від механізмів дії генів, що досліджуються.

Біохімічний механізм взаємодії алелів  $st$  і  $bw$  досліджений досить ретельно. Відомо, що в дрозофіли забарвлення очей обумовлене синтезом двох пігментів – червоного та коричневого. Рецесивний алель  $bw$  в гомозиготному стані блокує синтез червоного пігменту, тому очі мух містять лише коричневий пігмент. Рецесивний алель  $st$  в гомозиготному стані блокує синтез коричневого пігменту, внаслідок чого в очах мух міститься лише червоний пігмент. Ланцюг реакцій утворення коричневого пігменту починається з перетворення триптофану та в мух, рецесивних за обома парами алелей, переривається на проміжному етапі, при утворенні 3-гідроксикинуреніну. Далі реакція не йде, оскільки продукт експресії гена  $st$  – неактивний фермент. Тому 3-гідроксикинуренін не поглинається тканинами та накопичується у великих кількостях у мух з яскраво-червоними очима. Коли в дигетерозиготі опиняються разом доміnantні алелі обох генів, синтезуються обидва пігменти. Результат – комплементарна взаємодія нормальних алелей, що спостерігається в  $F_1$ . Якщо в  $F_2$  у гомозиготному стані опиняються обидва рецесивні алелі обох генів, то не синтезується жодного пігменту, очі незабарвлені, білі.

Отже, **комплементарними** називаються гени, які при спільній дії у генотипі в гомо- чи гетерозиготному стані (A–B–) обумовлюють розвиток нової ознаки. Дія

кожного гена окремо (A–vv або aaV–) відтворює ознаку лише одного з батьків. У такому випадку при дигібридних схрещуваннях можливі відхилення від формули розщеплення за фенотипом (9:3:3:1): в F<sub>2</sub> з'являються співвідношення 9:7, 9:6:1, 9:3:4, 9:3:3:1 з появою нових ознак, відсутніх у батьків.

**Завдання 2.** Провести генетичний аналіз успадкування ознак при комплементарній взаємодії неалельних генів, досліджуючи особливості їх спадкування при розщепленні в F<sub>2</sub> за фенотипом 9:7; 9:6:1; 9:3:4, 9:3:3:1 під час розв'язання задач:

1. У. Бетсон і Р. Пеннет, схрещуючи дві лінії духм'яного горошку з білими квітками, одержали в F<sub>1</sub> всі рослини з пурпурними квітками, а в F<sub>2</sub> - 9/16 рослин з пурпурними квітками та 7/16 - з білими. Пояснити результат схрещування, визначити тип успадкування ознаки, генотипи батьків і потомства.

2. При схрещуванні рослин гарбуза з дископодібною формою плода в потомстві було отримано 121 рослину з дископодібною формою плода, 77 - зі сферичною та 12 - з подовженою. Пояснить розщеплення, визначте генотипи вихідних форм. Як успадковується ознака? Яке розщеплення ви очікуєте отримати в аналізуючому схрещуванні і яку рослину будете використовувати в якості аналізатора?

3. При схрещуванні ліній дрозофіли з яскраво-червоними та коричневими очима всі гібриди F<sub>1</sub> - з червоними очима. В F<sub>2</sub> одержали 9/16 особин із червоним забарвленням очей, 3/16 - з яскраво-червоними очима, 3/16 потомства з коричневими очима, 1/16 мали новий фенотип – білі очі. Пояснити результат схрещування, визначити тип успадкування ознаки, генотипи батьків і потомства.

4. При схрещуванні рослин квасолі з білими насінням з рослинами, що дають коричневе насіння, в першому поколінні все насіння виявилось пурпуровим, а в другому - 560 пурпурних, 188 коричневих і 265 білих. Як це можна пояснити? Визначте генотипи вихідних форм.

5. При схрещуванні рослини з незабарвленою (білою) цибулиною з рослиною, що має жовту цибулину, в F<sub>1</sub> всі рослини - з червоною цибулиною. В F<sub>2</sub> спостерігається розщеплення на рослини з червоною (9/16), жовтою (3/16) і білою (4/16) цибулинами. Пояснити результат схрещування, визначити тип успадкування ознаки, генотипи батьків і потомства.

*(Примітка:* червоне забарвлення цибулини обумовлено наявністю двох домінантних генів. Домінантний алель одного гена детермінує жовте забарвлення цибулини, а рецесивний алель – біле. Домінантний алель іншого гена не має власного фенотипного проявлення, тому за фенотипом проявляється рецесивна гомозигота. Цей випадок цікавий у практичному відношенні. Забарвлені цибулини стійкі до плямистості (хвороба цибулі), яка є результатом присутності речовин, при наявності яких синтезується пігмент. Рецесивні білі форми, позбавлені пігменту, вражаються хворобою, а білі форми (з генотипом aaV-) стійкі до неї. У цьому випадку неалельний ген забарвлення цибулини не проявляє своєї дії фенотипно, якщо не взаємодіє з іншими неалельними генами).

**Завдання 3.** Провести генетичний аналіз успадкування ознак при епістатичній взаємодії неалельних генів, досліджуючи особливості їх спадкування при розщепленні в F<sub>2</sub> у співвідношенні фенотипових класів 13:3, 12:3:1, 9:3:4 під час розв'язання задач:



1. При схрещуванні рослин льону з гладкою формою пелюсток в першому поколінні всі рослини мали гладкі пелюстки, а в другому серед 632 рослин 125 мали гофровану форму пелюсток, решта – гладку. Як успадковується ознака? Які генотипи вихідних рослин і рослин  $F_1$ ?
2. При схрещуванні чорної курки з білим півнем всі курчата чорні. В аналізуючому схрещуванні одержано 28 білих та 10 чорних курчат. Як успадковується забарвлення оперіння? Які генотипи всіх форм?
3. При схрещуванні жовтоплідного гарбуза з білим все потомство з білими плодами. При схрещуванні одержаних гібридів між собою в  $F_2$  відбулося розщеплення: рослин з білими плодами – 204, із жовтими – 53, із зеленими – 17. Визначити генотипи батьків і нащадків.
4. Сутність так званого бомбейського феномену в тому, що в сім'ї, де батько мав  $O$  групу крові, а мати групу  $B$ , народилася дівчинка з  $O$  групою крові, що є зрозумілим. Але, коли дівчинка виросла й вийшла заміж за чоловіка з групою крові  $A$ , у них народилося дві дівчинки – перша з групою крові  $AB$ , друга – з групою  $O$ . Народження дівчинки з групою крові  $AB$  від матері з групою  $O$  викликало явне непорозуміння. Але в літературі описано ще декілька подібних випадків. За повідомленням Макк'юсіка, деякі генетики пояснюють це явище рідкісним рецесивним епістатичним геном, здатним пригнічувати дію генів, що визначають групи крові  $A$  та  $B$ . 1) Приймаючи цю гіпотезу про присутність рецесивного алеля гена  $H$ , встановити генотипи особин всіх трьох поколінь, описаних в бомбейському феномені. 2) Визначити ймовірність народження дітей з  $O$  групою крові в сім'ї першої дочки з третього покоління, якщо вона вийде заміж за такого ж за генотипом чоловіка, як вона сама.

**Пояснення до завдання 3.** *Епістаз* – тип неалельної взаємодії генів, при якому ген однієї алельної пари пригнічує дію генів іншої пари. Гени, що пригнічують проявлення інших генів, називаються *інгібіторами* або *супресорами*, а пригнічені гени – *гіпостатичними*. Виділяють два типи епістазу: домінантний і рецесивний. При домінантному епістазі – *супресії* - пригнічуючий вплив має домінантний алель:  $A > B$ ;  $A > b$ . При цьому розщеплення за фенотипом в  $F_2$  складає 13:3 (або 12:3:1 у випадку, коли рецесивний алель епістатичного гена має власне фенотипне проявлення).

Генну детермінацію розщеплення в  $F_2$  при домінантному епістазі (13:3) розглянемо на прикладі спадкування забарвлення оперення у курей. Воно визначається двома генами, що взаємодіють за типом домінантного епістазу. Алель  $C$  одного гена обумовлює забарвленість оперення, його алеломорф ( $c$ ) – біле; домінантний алель іншого гена ( $I$ ) пригнічує проявлення пігменту ( $I > C$ ); алель ( $i$ ) на забарвлення не впливає. Тому при схрещуванні курей породи леггорн (ССІІ) з півнями породи білий віандот (ссіі) в  $F_2$  зазвичай одержують 13/16 курей з білим оперенням і 3/16 із забарвленим оперенням.

Розщеплення **12:3:1** за фенотипом в  $F_2$  спостерігається, якщо рецесивний алель епістатичного гена має власне фенотипне проявлення. Подібна взаємодія генів спостерігається при спадкуванні масті коней. Воронна масть контролюється домінантним геном  $V$ , руда – рецесивним геном  $v$ , домінантний алель гена  $C$  унаслідок раннього посивіння волоса дає сіру масть і пригнічує проявлення гена  $V$

(C > B). У потомстві F<sub>2</sub> від схрещування сірої (CCBB) та рудого (ccbb) коней 12/16 матимуть сіру масть, 3/16 – воронну, 1/16 - руду.

При рецесивному епістазі – *криптомерії* - рецесивна гомозигота одного гена пригнічує дію іншого домінантного гена: aa > B. При цьому в потомстві F<sub>2</sub> спостерігається розщеплення 9:3:4. Наприклад, у мишей сіре забарвлення шерсті одержало назву «агуті»; воно обумовлене взаємодією двох домінантних генів A та B. Ген A забезпечує синтез чорного пігменту, ген B сприяє розподіленню пігменту по довжині волоса, рецесивний ген b не впливає на забарвлення шерсті. Рецесивний ген a порушує синтез пігменту та в гомозиготному стані пригнічує дію гена B (aaB–альбіноси). При схрещуванні чорних і білих мишей в F<sub>1</sub> з'являються лише миші типу агуті (AaBb). В F<sub>2</sub> 9/16 мишей мають забарвлення агуті, 3/16 – чорне та 4/16 – біле. Таке ж розщеплення характерне і для комплементарної взаємодії генів.

Отже, характерними ознаками *епістатичної взаємодії генів* є:

1) дія двох генів на одну ознаку; 2) пригнічення проявлення гіпостатичного гена в F<sub>1</sub>; 3) зміна формули дигібридного розщеплення в F<sub>2</sub> за рахунок розширення частки особин з фенотипом гена-супресора, при цьому характерні формули розщеплення для домінантного епістазу 13:3 та 12:3:1, для рецесивного епістазу – 9:3:4.

**Завдання 4.** Провести генетичний аналіз успадкування ознак при взаємодії генів за типом полімерії, досліджуючи особливості їх спадкування при розщепленні в F<sub>2</sub> у співвідношенні фенотипових класів 15:1; 1:4:6:4:1 під час розв'язання задач:

1. У кукурудзи одного сорту в качані є 16 рядів зерен, а у іншого – 8 рядів. При схрещуванні цих сортів в F<sub>1</sub> спостерігається проміжний фенотип, в середньому 12 рядів. Рослини F<sub>2</sub> фенотипічно дуже неоднорідні, кількість рядів варіює від 8 до 16, причому приблизно в одному з кожних 32 качанів є стільки ж рядів зерен, що і у одного з батьків. Скільки генів визначає даний ознака?

2. Зелена рослина кукурудзи при самозапиленні дає близько 15/16 зелених і 1/16 білих (летальних) сіянців. Пояснити ці результати, визначити генотип вихідної рослини.

3. Від шлюбу темношкірих і білошкірих людей народжуються мулати. Аналіз потомства великої кількості шлюбів між мулатами дав розщеплення 1: 4 : 6 : 4 : 1. Фенотипово це були чорношкірі та білошкірі нащадки, мулати, а також темні й світлі мулати. Визначити кількість генів, що обумовлюють забарвлення шкіри, характер їх взаємодії та генотипи батьків й нащадків. Як ви вважаєте, чи може від шлюбу білої жінки з мулатом або з африканським негром народитися зовсім чорношкіра дитина? Чому?

4. При самозапиленні зеленої рослини гороху одержано 544 зелених і 45 хлорофільних світло-зелених рослин. Пояснити розщеплення. Визначити генотип вихідної рослини. Як можна використовувати мутантні рослини для подальшої селекційної роботи, якщо вони опиняться життєздатними?

5. У пшениці щільність колоса визначається за кількістю колосків на 10 см довжини колосового стрижня. Розрізняють наступні щільності колоса: пухкий - менше 17 колосків, середньої щільності - 17-20, вище за середній-20-23, щільний-23-26, дуже щільний (булавовидний) - більше 26. Припустимо, що щільність

колоса детермінується двома парами полімерних неалельних генів, які мають кумулятивну дію: чим менше міститься в генотипі доміантних алелей, тим щільнішим буде колос. При схрещуванні двох сортів пшениці, які мають колос вище середньої щільності і генотипи Аавв х ааВВ, в F<sub>1</sub> отримали 50 рослин, в F<sub>2</sub> - 320.

- а) Яку максимально можливу щільність колоса можуть мати рослини F<sub>1</sub>?
- б) Скільки різних фенотипів можуть бути мати рослини F<sub>2</sub>?
- в) Скільки рослин F<sub>2</sub> можуть бути трансгресивними (матимуть більш щільний колос, ніж кожна з батьківських форм)?
- г) Скільки трансгресивних щільноколосих рослин F<sub>2</sub> можуть дати потомство, яке надалі не розщеплюється?
- д) Скільки в F<sub>2</sub> може бути трансгресивних рослин, які мають більш пухкий колос, ніж кожна з батьківських форм?

**Пояснення до завдання 4. Полімерія** – тип неалельної взаємодії генів, при якому декілька пар генів впливають на формування однієї ознаки в різному її фенотипному проявленні. Явище полімерії відкрите в 1909 році шведським генетиком Нильсоном-Еле, який описав серію однозначно діючих генів, що визначали різну інтенсивність забарвлення ендосперму пшениці. Це випадок **кумулятивної полімерії** (складної), коли ступінь проявлення ознаки залежить від числа доміантних алелей у генотипі. Так успадковується, наприклад, довжина початку кукурудзи. За типом кумулятивної полімерії успадковується також пігментація шкіри людини. Наприклад, у потомстві чорношкірого чоловіка та білої жінки (або навпаки) народжуються діти з проміжним кольором шкіри – мулати. У подружньої пари мулатів народжуються діти з кольором шкіри від чорного до білого, що визначається числом доміантних алелей в генотипі. При **некумулятивній полімерії** (простій), наявність у генотипі хоча б одного доміантного алеля полімерних генів визначає проявлення доміантної ознаки, наприклад, трикутної форми плоду грициків звичайних.

При схрещуванні рослин грициків із трикутними плодами (стручками) з рослиною з овальними плодами в F<sub>1</sub> утворюються рослини з плодами трикутної форми (**рис. 2.2**). При самозапиленні грициків у F<sub>2</sub> спостерігається розщеплення на рослини з трикутними та овальними плодами в співвідношенні 15:1. Якщо розщеплення в F<sub>2</sub> складає 63:1, то формування ознаки забезпечується трьома парами генів із однаковим фенотипним ефектом.

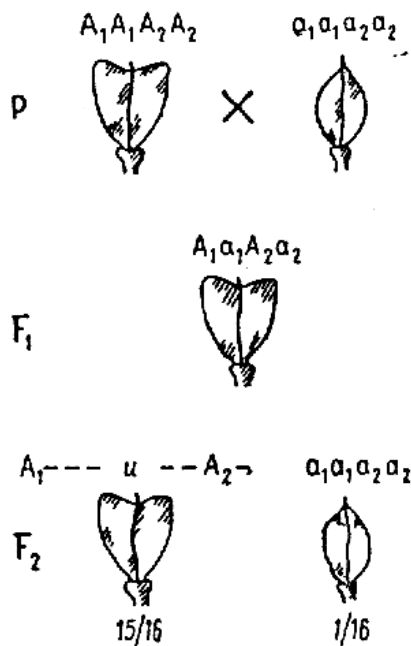


Рис. 2.2. - Успадкування форми стручка у *Capsella bursa pastoris* при взаємодії алелей двох генів

При полімерному типі спадкування можливе проявлення трансгресій. **Трансгресія** – посилене або послаблене проявлення будь-якої спадково обумовленої ознаки в потомства у порівнянні з обома батьківськими формами. Тому трансгресії можуть бути **позитивними** та **негативними**:

P: A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>a<sub>2</sub>a<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub>a<sub>4</sub>a<sub>4</sub> × a<sub>1</sub>a<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>a<sub>3</sub>a<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>4</sub>

F<sub>1</sub>: A<sub>1</sub>a<sub>1</sub>A<sub>2</sub>a<sub>2</sub>A<sub>3</sub>a<sub>3</sub>A<sub>4</sub>a<sub>4</sub>

F<sub>2</sub>: A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>A<sub>3</sub>A<sub>4</sub>A<sub>4</sub>

a<sub>1</sub>a<sub>1</sub>a<sub>2</sub>a<sub>2</sub>a<sub>3</sub>a<sub>3</sub>a<sub>4</sub>a<sub>4</sub>

**позитивна трансгресія**

**негативна трансгресія**

Трансгресії проявляються в F<sub>2</sub>, коли батьківські форми F<sub>1</sub> мають проміжний ступінь проявлення ознаки. При наявності у кожної батьківської особини одного або більшої кількості домінантних генів у нащадків можуть поєднуватися в генотипі два або більше домінантні алелі, що буде посилювати прояв даної ознаки (**позитивна трансгресія**); аналогічне поєднання рецесивних алелей цих генів призводить до послабленого проявлення ознак (**негативна трансгресія**). Явище трансгресії використовують у селекційній роботі для одержання нових сортів рослин, що самозапилюються. Використання трансгресії обмежується тією обставиною, що ймовірність її проявлення знижується зі збільшенням кількості генів, що контролюють проявлення кількісної ознаки.

**Завдання 5.** Визначити, якому типу взаємодії неалельних генів відповідає розщеплення за фенотипом у наведених нижче задачах. Розподілити всі задачі на групи, дати характеристику дії генів. (Приклади генетичного аналізу спадкування неалельних генів наведені нижче).

**Задача 1.** Від схрещування білих і блакитних кролів отримали в F<sub>1</sub> 28 чорних кроленят, а в F<sub>2</sub> - 67 чорних, 27 блакитних і 34 білих. Як успадковуються чорне, блакитне та біле забарвлення шерсті у кролів? Поясніть розщеплення. Визначте генотипи батьків і нащадків.

**Задача 2.** Визначити тип взаємодії неалельних генів у прикладі, наведеному нижче. З'ясувати генотипи форм вівса, що схрещуються (дослід Г.Нильсона-Еле):  
P: ♀ чорне насіння x ♂ з сіро-біле насіння

F<sub>1</sub>: всі насінини чорні

F<sub>2</sub>: 630 рослин з чорним насінням: 40 насінин з сіро-білими насінинами

В аналізуючому схрещуванні одержано співвідношення фенотипових класів 3:1.

**Задача 3.** Від схрещування білих курей з розовидним гребенем з чорними півнями з простим гребенем в F<sub>1</sub> всі курчата виявилися білими, половина з них була з розовидним , половина - з простими гребенями. Схрестивши нащадків F<sub>1</sub>, що розрізняються за формою гребеня, отримали розщеплення: 115 білих з розовидним гребенем; 112 білих з простим гребенем; 23 чорних з розовидним гребенем; 26 чорних з простим гребенем. Всього 276. Поясніть результати, визначте генотипи вихідних птахів і нащадків F<sub>1</sub>.

**Задача 4.** Від схрещування білого півня із забарвленими курками в першому поколінні було отримано 3/8 забарвлених і 5/8 білих курчат. Поясніть розщеплення, визначте генотипи вихідних птахів.

**Задача 5.** Рослина, гомозиготна за трьома парами рецесивних генів, має висоту 32 см, а гомозиготна за домінантними алелями цих генів має висоту 50 см. Приймаємо, що вплив окремих домінантних генів на ріст у всіх випадках однаковий і їхня дія підсумовується. В F<sub>2</sub> від схрещування цих рослин отримано 192 нащадка. Скільки з них матиме генетично обумовлений ріст 44 см?

**Задача 6.** У кукурудзи одного сорту в качані 16 рядів зерен, а в іншого - 8 рядів. При схрещуванні цих сортів в F<sub>1</sub> спостерігається проміжний фенотип, у середньому 12 рядів. Рослини F<sub>2</sub> фенотипно дуже неоднорідні, кількість рядів варіює від 8 до 16, причому приблизно в одному з кожних 32 качанів є стільки ж рядів зерен, що і у одного з батьків. Скільки генів визначає ця ознака?

**Задача 7.** Алель *A* у щурів обумовлює жовте забарвлення шерсті. Алель *B* іншого гена викликає різноманітність чорного забарвлення шерсті. У особин *A-B*-шерсть сірого кольору, а у особин *aabb* - білого. Сірого самця схрестили з жовтою самкою і отримали в F<sub>1</sub> 3/8 жовтих, 3/8 сірих, 1/8 чорних і 1/8 білих щурят. Визначте генотипи батьків.

**Завдання 6.** Охарактеризувати особливості спадкування ознак при плейотропній дії генів і дії генів-модифікаторів. Навести відомі вам приклади успадкування ознак, що контролюються плейотропними генами і генами-модифікаторами.

**Пояснення до завдання 6. Плейотропія** – явище, при якому один ген впливає на проявлення декількох ознак. Прикладом є вплив плейотропного гена забарвлення хутра лисиць на життєздатність потомства. Ген платиного забарвлення є домінантним по відношенню до сріблясто-чорного, але в гомозиготному стані цей ген призводить до загибелі зародків (*AA*) на ранніх стадіях розвитку. Виживають лише платинові лисиці, гетерозиготні за цим геном. За цією ж схемою успадковується наявність (*aa*) та відсутність (*Aa*) луски у дзеркального коропа, сіре (*Aa*) і чорне (*aa*) забарвлення шерсті каракульських овець. У людини синдром Марфана спричинений проявленням в генотипі домінантного гена, що визначає ознаку «пальці павука». Одночасно цей ген спричинює аномалію кришталика ока та вади серця.

**Гени-модифікатори** – гени, що посилюють або послаблюють дію основного гена. Дослідження спадкування забарвлення ссавців показало, що разом із крайніми формами, в яких відбувається повний синтез пігменту (чорне забарвлення) або його відсутність (альбіноси), існує цілий ряд проміжних форм – сіруватих, бурих, жовтих. Забарвлення шерсті залежить від наявності в генотипі генів-модифікаторів, які не мають власного проявлення, але змінюють дію основного гена. Гени-модифікатори контролюють смак, колір і аромат плодів, тому їх рекомендується накопичувати шляхом рекурентної селекції для поліпшення сортових ознак плодових культур.

### Приклади генетичного аналізу спадкування неалельних генів

**Приклад 1.** Від схрещування рослин кукурудзи з червоними зморшкуватими і білими гладкими зернами в першому поколінні всі рослини мали пурпурні гладкі зерна. У другому поколінні відбулося наступне розщеплення: 840 пурпурних гладких; 280 пурпурних зморшкуватих; 378 білих гладких; 123 білих зморшкуватих; 273 червоних гладких; 89 червоних зморшкуватих. Як успадковуються ознаки? Визначте генотипи вихідних рослин і гібридів F<sub>1</sub>.

#### Хід проведення генетичного аналізу:

- Оскільки в F<sub>1</sub> спостерігається однаковість гібридів, батьківські форми гомозиготні за обома ознаками.
- Аналізуємо спадкування кожної ознаки:

1) Забарвлення зерен в F<sub>2</sub>:

Пурпурні	Червоні	Білі
840	273	378
<u>280</u>	<u>89</u>	<u>123</u>
1120	362	501

Розщеплення не відповідає розщепленню при моногенному спадкуванні 1: 2: 1.

3. Припускаємо дигенне спадкування. Знаходимо величину одного можливого поєднання гамет - 1983: 16 = 123,9. Розщеплення в досліді: 1 120: 123,9 = 9,1; 362: 123,9 = 2,9; 501: 123,9 = 4,0, тобто приблизно 9: 3: 4. Отже, забарвлення зерен визначається двома генами, взаємодіючими за типом комплементарності.

4. Вводимо позначення алелей: наявність в генотипі домінантних генів А і В детермінує пурпурне забарвлення, ген А обумовлює червоне забарвлення, домінантний ген В не має власного фенотипного проявлення (aaВ- біле забарвлення). Гомозиготна вихідна рослина з червоними зернами має в генотипі домінантний алель А та рецесивний b (AAbb). Рослина з білими зернами має в генотипі рецесивну гомозиготу гена a (aaBB). Генотип гібридів F<sub>1</sub> – AaBb, F<sub>2</sub>: 9 А–В– пурпурні; 3 А–bb червоні; 4 aaВ– білі; aabb білі.

- Аналізуємо розщеплення за формою зерна:

Гладкі	Зморшкуваті
840	280
378	123
<u>273</u>	<u>89</u>
1491	492

Розщеплення відповідає двом фенотипним класам з переважанням гладкої форми зерен. Припускаємо моногенне спадкування. Знаходимо величину одного можливого поєднання гамет: 1983: 4 = 495,7. Розщеплення в досліді:



$F_2$ :  $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$ ,  $A_1A_1A_2A_2A_3a_3$  и т.д.,  
 1/64 – 12 г                      6/64 – 11 г  
 $A_1A_1A_2a_2A_3a_3$  и т.д.,  $A_1A_1A_2a_2a_3a_3$  и т.д.,  
 15/64 – 10 г                      20/64 – 9 г  
 $A_1A_1a_2a_2a_3a_3$  и т.д.,       $A_1a_1a_2a_2a_3a_3$  и т.д.,  
 15/64 – 8 г                      6/64 – 7 г  
 $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$   
 1/64 – 6 г

### ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. При аналізуючому схрещуванні тригетерозиготи розщеплення за фенотипом склало 7:1. При якому типі взаємодії генів можливе таке співвідношення? Написати схему схрещування.
2. Домінантний алель гена В епістатує проявлення домінантного алеля гена А. Алелі гена В власного фенотипового проявлення не мають. Яке розщеплення за фенотипом слід очікувати від схрещування Р: АаВв х Аавв?
3. Чим відрізняється явище домінування від епістазу?
4. Які подальші схрещування можна запропонувати для перевірки висновків, сформульованих у завданні 1 на основі аналізу розщеплення в  $F_2$  від схрещування мух з яскраво-червоними та коричневими очима?
5. При схрещуванні рослин пшениці з червоним щільним колосом з рослинами з білим пухким колосом в першому поколінні отримали червоні колосся середньої щільності, а в другому - розщеплення: 186 червоних з щільним колосом: 358 червоних з колосом середньої щільності: 184 червоних з рихлим колосом: 12 білих з щільним колосом: 25 білих з колосом середньої щільності: 10 білих з рихлим колосом. Всього 775. Як успадковуються ознаки? Які генотипи вихідних рослин?
6. Назвіть основні причини відхилення числа фенотипічних класів від класичної схеми менделівського успадкування ознак .
7. Надайте визначення поняттю про комплементарність, формули розщеплення і приклади комплементарної взаємодії генів.
8. Надайте визначення поняттю про епістаз, формули розщеплення і приклади епістатичної взаємодії генів.
9. Дайте визначення поняттям полімерії, трансгресії. Навести приклади.

### 2.3. Особливості зчепленого зі статтю спадкування

Більшість вищих організмів двостатеві, їхній каріотип містить однакові хромосоми – **аутосоми** та хромосоми, за якими статі розрізняються – **статеві хромосоми**. Причому одна стать має однакові статеві хромосоми – XX і називається **гомогаметною**, інша – різні (XY або XO) і називається **гетерогаметною**. Статеві хромосоми гетерогаметної статі XY, а нею може бути або самка (птахи, метелики), або самець (двокрилі комахи, дрозоділа, більшість ссавців) розрізняються морфологічно і багаті на гетерохроматин, особливо Y-хромосома.

Гени статевих хромосом можна віднести до трьох груп. До першої відносяться гени, локалізовані тільки в Y-хромосомі. Це – **голандричні** (чоловічі) або **гологенічні** (жіночі) гени, що залежить від того, яка стать є гетерогаметною. Наприклад, у людини описана ознака – волохаті вуха (гіпертріхоз), який



проявляється фенотипно лише в чоловіків і передається від батька всім синам з Y-хромосою. У чоловічих рослин дрьоми *Melandrium sp.* описаний ген – інгібітор плямистості листя, який передається від чоловічої рослини чоловічій.

Гени іншої групи локалізовані тільки в X-хромосомі, їх алелі відсутні в Y-хромосомі. Ознаки, які детермінуються цими гологенічними генами, називають **зчепленими із статтю**. Характер успадкування ознак, зчеплених із статтю, відрізняється від усіх інших типів успадкування: 1) реципрокні схрещування дають різні результати; 2) в одному напрямі реципрокних схрещувань має місце одноманітність, а в іншому – розщеплення, причому дочки схожі на батька, а сини на матір (успадкування хрест – нахрест, або **кріс-крес**); 3) у другому поколінні гібридів у тому напрямі схрещування, де в  $F_1$  була одноманітність, розщеплення буде 3:1, за Менделем, з тією лише різницею, що 1/4 рецесивів складатимуть особини однієї статі; у другому напрямі схрещування в  $F_2$  розщеплення за певною ознакою буде 1:1 серед самок і самців. Якщо ознака успадковується таким чином, то можна стверджувати, що ген, який її визначає, локалізований в X-хромосомі, а в Y-хромосомі його алеля немає. До числа подібних ознак відносяться, наприклад, гемофілія і дальтонізм у людини, вузьке листя у *Melandrium alba* тощо.

Успадкування ще однієї групи генів, локалізованих у статевих хромосомах, не відрізняється від аутосомного, оскільки їх алелі знаходяться в гомологічних плечах X- та Y-хромосом, зазвичай між ними відбувається кросинговер. Ознаки, які визначаються цими генами, називаються **частково зчепленими із статтю**. Успадкування цих ознак відрізняється від успадкування аутосомних тільки тим, що в  $F_2$  при розщепленні 3:1 за певною ознакою 1/4 рецесивних особин буде завжди однієї статі, тієї, яку мала вихідна рецесивна особина (або онук буде таким, як дідусь, або в онуки проявиться ознака бабусі). Це означає, що результати реципрокних схрещувань будуть відрізнятися тільки в  $F_2$ . Прикладом може служити загальна кольорова сліпота у людини, аномалії квіток у дрьоми.

Знання цих особливостей успадкування дає можливість легко виявити ознаки, що контролюються генами, локалізованими в статевих хромосомах, тобто встановити групу зчеплення.

## Лабораторна робота № 8

### Генетичний аналіз успадкування ознак, зчеплених із статтю

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями проведення генетичного аналізу успадкування зчеплених із статтю ознак; оволодіти методикою визначення статевого хроматину людини; закріпити одержані знання під час розв'язання тестових завдань.

**Матеріал та обладнання:** мухи *Normal* і мутанти ліній *white* (білі очі) та *Bar* (смугоподібні очі); пробірки із середовищем; таблиці: «Статеві хромосоми», «Механізм визначення статі. Хромосомні комплекси людини», «Генний баланс статі». **Дидактичні картки-схеми:** «Успадкування обмеженого статтю забарвлення айширської худоби», «Схрещування чорної курки з рябим півнем», «Схрещування білоокої самки з червонооким самцем дрозофіли», «Схема довільного одержання бажаної статі в тутового шовкопряда».

**Завдання 1.** Провести генетичний аналіз успадкування рецесивної, зчепленої із статтю ознаки *white* (білі очі) у дрозоділі:

**Хід виконання завдання:**

1. Закласти дослід на пряме та зворотне схрещування (по 5 пробірок кожного варіанта (мухи *Normal* і мутанти лінії *white*). На пробірках написати комбінації схрещувань:

**P:** ♀  $X^{w+}X^{w+}$  × ♂  $X^wY$

**P':** ♀  $X^wX^w$  × ♂  $X^{w+}Y$

2. Порівняти результати прямого та зворотного схрещувань.

**Завдання 2.** Розглянути особливості спадкування ознаки *Bar* – «смугоподібні очі» - ознаки, яка служить зручним маркером для обліку мутантів за генами статевих хромосом. У дрозоділі при схрещуванні самки із смугоподібними очима з нормальним самцем в  $F_1$  всі самці та самки - із смугоподібними очима:



У зворотному схрещуванні в  $F_1$  самки із смугоподібними, а самці з нормальними очима. Визначити, тип успадкування ознаки та потомство  $F_2$  в цих схрещуваннях.

**Примітка.** На відміну від рецесивного гена *white*, ген *Bar* – ген з неповним домінуванням. Тому ознака «смугоподібні очі» проявляється в гомозигот, гетерозигот і гемізигот. Але в гомозигот і гемізигот кількість фасеток є значно меншою, ніж у гетерозигот. При схрещуванні самок з нормальними очима та самців, які мають смугоподібні очі, в  $F_1$  усі мухи матимуть смугоподібні очі (фенотип *Bar*). Але у зв'язку з тим, що ген *Bar* неповністю домінує над нормальним алелем форми очей, у самців (гемізигот) кількість фасеток є значно меншою, ніж у самок (гетерозигот). В  $F_2$  всі самки мають смугоподібні очі, в самців відбувається розщеплення на мух з нормальними та смугоподібними очима в співвідношенні 1:1.

**Завдання 3.** Оволодіти логікою генетичного аналізу зчепленого зі статтю спадкування ознак, розв'язуючи задачі:

**Задача 1.** У дрозоділі рецесивний ген жовтого забарвлення тіла (*yellow* - *y*) локалізований в X-хромосомі. Визначити генотип і фенотип потомства від схрещування диплоїдного самця з жовтим тілом і триплоїдної самки з генотипом  $++y$ .

**Задача 2.** У молодих курчат немає помітних статевих відмінностей, а між тим економічно доцільно встановлювати для майбутніх півників і курочок різні режими годування. Чи можна для виявлення статі скористатися тією обставиною, що ген, який визначає забарвлення, локалізований в X-хромосомі, причому рябе забарвлення домінує і відмінність між забарвленням помітна відразу ж після вилуплення?

**Задача 3.** У собак деяких порід відома мутація вкорочення кігтів на лапах, мутація рецесивна. При схрещуванні нормального самця та самки з короткими когітками в  $F_1$  всі цуценята мали нормальні кігті, а в  $F_2$  короткі когітки з'явилися у половини самок. У реципрокному схрещуванні всі особини першого покоління мали нормальні когітки, а в другому поколінні короткі кігті були знайдені у

половини цуценят чоловічої статі. Як успадковується довжина кігтів у собак? Записати обидва схрещування у генетичній символіці.

**Задача 4.** Яке потомство може народитися у шлюбі між жінкою-дальтоником і нормальним щодо зору чоловіком при нерозходженні в неї X-хромосом? Якою буде стать цієї дитини?

**Задача 5.** Якщо чорна кішка принесла кошеня, одне з яких має черепахове забарвлення шерсті, а три – чорне, то що ви можете сказати про забарвлення шерсті батька цих кошенят? Про стать цих кошенят?

**Задача 6.** Пилком чоловічої рослини дрьоми з зеленим листям запилюють квітки жіночих рослин з жовто-зеленими листями. В  $F_1$  жіночі рослини мають зелене листя, а чоловічі - жовто-зелене. У зворотньому схрещуванні всі гібридні рослини були зеленими. Як це можна пояснити? Яке потомство в  $F_2$  від цих схрещувань ви очікуєте одержати? Визначити генотипи вихідних рослин.

**Задача 7.** У родині, де жінка має першу групу крові, а чоловік – четверту, народився син - дальтонік з третьою групою крові. Обидва батьки розрізняють кольори нормально. Визначити ймовірність народження в цій сім'ї здорового сина та можливі його групи крові.

**Задача 8.** У здорових подружжя народився син - альбінос і дальтонік. Навести генотипи батьків і сина. Яка ймовірність того, що ця подружня пара матиме здорову дочку?

**Задача 9.** У курки внаслідок захворювання яєчник дегенерував, із правої гонади розвинувся сім'яник. У результаті ця особина стала функціонувати як самець. Яке співвідношення за статтю слід очікувати від схрещування такої особини з нормальною куркою?

### Приклади генетичного аналізу зчепленого зі статтю спадкування

**Приклад 1.** При схрещуванні кішок з різним забарвленням шерсті було одержано розщеплення:

P ♀ чорні x ♂ руді	♀ руді x ♂ чорні
$F_1$ ♀ черепахові, ♂ чорні	♀ черепахові, ♂ руді
$F_2$ ♀ черепахові і чорні	♀ черепахові і руді
♂ чорні і руді	♂ чорні і руді.

Визначити генотипи форм, що схрещуються, і локалізацію генів.

#### Хід проведення генетичного аналізу

1) Про те, що гени, що визначають наведені ознаки, містяться не в аутосомах, свідчать різні результати реципрокних схрещувань в  $F_1$ . Отже, гени локалізовані в статевих хромосомах.

2) Тепер необхідно визначити, як успадковується ознака забарвлення шерсті. Оскільки в  $F_1$  та в  $F_2$  з'явилися самки черепахового забарвлення, робимо висновок, що в гетерозиготі проявляються ознаки обох батьків, тобто має місце кодомінування двох алелів (B і b):

$P_1$ :  $X^B X^B \times X^b Y$   
чорні руді

$F_1$ :  $X^B X^b \times X^B Y$

$F_2$ :  $X^B X^B$ ;  $X^B X^b$ ;  $X^b Y$ ;  $X^B Y$

черепахові чорні

чорні черепахові руді чорні

3) Якщо наше припущення є вірним, то в іншому напрямі реципрокних схрещувань можна записати очікувані результати і порівняти їх з одержаними в досліді:

$$P_2: \underset{\text{руді}}{X^b X^b} \times \underset{\text{чорні}}{X^B Y}$$

$$F_1: \underset{\text{черепахові}}{X^B X^b} \times \underset{\text{руді}}{X^b Y}$$

$$F_2: \underset{\text{черепахові}}{X^B X^b}; \underset{\text{руді}}{X^b X^b}; \underset{\text{чорні}}{X^B Y}; \underset{\text{руді}}{X^b Y}$$

Спостерігаємо повне співпадання з умовами задачі. Отже, висловлена нами гіпотеза про зчеплене із статтю спадкування ознаки забарвлення шерсті, була справедлива, а ген *B-b* локалізований в *X*-хромосомі.

**Відповідь:** генотипи батьківських форм : 1)  $X^B X^b$ ;  $X^b Y$ ; 2)  $X^B X^b$ ;  $X^B Y$ .

**Примітка.** З усіх ссавців тільки у кішок і в сирійських хом'ячків є ген *orange* -зчеплений зі статтю ген, що впливає на колір шерсті. Домінантний алель гена *orange* блокує синтез еумеланіна, і в шерсті утворюється феомеланін; інший - не блокує. У кожній клітині зародка активний або той, або інший алель (друга *X*-хромосома інактивована), всі нащадки цієї клітини успадкують той самий ген. Всі меланоцити, які походять від клітини з активним алелем *O*, будуть «фарбувати» шерсть в рудий колір, незалежно від генотипу за геном *agouti*. Меланоцити з активним рецесивним алелем «фарбуватимуть» шерсть кішки в чорний колір. Якщо в них активний ген *agouti*, то шерсть буде тикирована чорним пігментом, тобто буде вкрита поясками чорного пігменту. Число і розташування, наприклад, рудих плям залежать від того, куди поширилися меланобласти з активною хромосомою *X* і наскільки сильно вони встигли розмножитися. Тому черепахова кішка — справжня «клаптикова ковдра»; в кожній рудій або чорній плямі меланоцити є нащадками однієї клітини зародка (або декількох, якщо вони вимкнули ту ж саму хромосому). Але самці дуже рідко, але бувають черепаховими, якщо зигота *XXY* виникає внаслідок нерозходження хромосом в овогенезі (*XX*-гамета) або в сперматогенезі (*XY*-гамета). У ссавців, на відміну від дрозофіли, зиготи *XXY* – самці. У цьому випадку і кіт може бути гетерозиготою, отже, бути черепаховим.

За білі плями відповідає домінантна мутація іншого гена, *S* (*white spotting*), не зчепленого зі статтю. Цей ген неповно домінує: при генотипі *SS* плями охоплюють більшу площу, ніж у гетерозигот *Ss*. На його прояв впливають декілька інших генів-модифікаторів. Ця мутація уповільнює міграцію меланобластів. На певні ділянки тіла вони не встигають поширитися до моменту диференціювання волосяних фолікулів, гинуть, і в цих ділянках пігмент не утворюється. Отже, забарвлення шерсті кішок, мишей та інших ссавців відноситься до числа автономних ознак, тобто визначається генотипом клітини, з якої росте шерстинка, а не генотипом особини.

**Приклад 2.** Дві червоноокі довгокрилі особини дрозофіли при схрещуванні між собою дали наступне потомство: *самки*: 154 червонооких довгокрилих, 48 червонооких із зачатковими крилами; *самці*: 98 червонооких довгокрилих, 95 білооких довгокрилих, 25 червонооких із зачатковими крилами, 32 білооких із зачатковими крилами. Яка генетична обумовленість цих ознак? Визначити генотипи батьків і потомства.

#### Хід проведення генетичного аналізу

1) Аналізуємо успадкування кожної ознаки окремо.

##### а) Забарвлення очей:

Оскільки в  $F_1$  розщеплення спостерігається лише у самців, припустимо спадкування, зчеплене зі статтю. Розщеплення у самців: червонооких –  $98 + 25 = 123$ , білооких –  $95 + 32 = 127$ . Отже, розщеплення відбувається у співвідношенні приблизно 1:1, відхилення дуже незначне ( $\chi^2 = 0,032$ ;  $p > 0,80$ ). Таке розщеплення

свідчить про моногенне спадкування ознаки та про гетерозиготність материнської особини. Оскільки ознака зчеплена зі статтю, домінування можна встановити за гетерозиготними самками  $F_1$ . Оскільки у першому гібридному потомстві червонооких самок приблизно втричі більше, ніж білооких, домінує червоне забарвлення очей над білим. Вводимо позначення алелей:  $X^{w+}$  - червон.,  $X^w$  - біл.; генотип батьківських форм: самки  $X^{w+} X^w$ , самця -  $X^{w+} Y$ .

#### **б) Довжина крил:**

В  $F_1$  розщеплення у самок і самців за цією ознакою приблизно однакове: самки 154 довгокрилих: 48 із зачатковими крилами; самці: 193 (98 + 95) довгокрилих: 57 (25 + 32) із зачатковими крилами. Всього за всіма особинами : довгокрилих – 347 (154 + 193), із зачатковими крилами - 105(48 + 57). Разом 452 (347 + 105) .

Розщеплення свідчить про гетерозиготність вихідних мух і про те, що ця ознака не зчеплена зі статтю. Оскільки спостерігається розщеплення на два класи з переважанням ознаки довгих крил, припускаємо моногенне успадкування. Визначаємо величину одного сполучення гамет у розщепленні:  $452:4 = 113$ . Визначаємо розщеплення в досліді:  $347 : 113 = 3,1$ ;  $105 : 113 = 0,9$ , тобто приблизно 3:1. Перевіряємо гіпотезу про моногенне успадкування з розщепленням 3:1 за методом  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 0,76$ ;  $p > 0,30$ ). Фактичне та теоретично очікуване розщеплення за цими ознаками відрізняються несуттєво, відмінності знаходяться в межах похибки. Вводимо позначення алелей: А – ген довгокрилості, а – ген зачаткових крил, генотипи самки та самця за цією ознакою: Аа.

2) Аналізуємо розщеплення за двома ознаками. За висунутою нами нульовою гіпотезою ( $H_0$ ) ознаки успадковуються незалежно, тобто одна з них зчеплена зі статтю, інша успадковується за аутосомним типом. Очікуване розщеплення: **за самцями:** (1 червонооких. : 1 білооких)  $\times$  (3 довгокрилих. : 1 зачат. кр.) = 3 червоноок. довгоокр. : 3 білоок. довгокр. : 1 червоноок. зачат. кр. : 1 білоок. зачат. кр.; **у самок** розщеплення відбувається тільки за аутосомним геном, що контролює довжину крил, у співвідношенні 3 довгокр. : 1 зачат. кр. Перевіряємо розщеплення у самців за  $\chi^2$  : ( $\chi^2 = 1,29$ ;  $p > 0,70$ ) . Отже,  $\chi^2$  не відкидає нульової гіпотези.

**Відповідь:** забарвлення очей контролюється одним геном, локалізованим в Х-хромосомі, червоне забарвлення домінує над білим. Довжина крил контролюється одним геном, локалізованим в аутосомі, довгі крила домінують над зачатковими. Ознаки успадковуються незалежно. Генотипи батьківських форм: самка -  $X^{w+} X^w$  Аа, самець -  $X^{w+} Y$  Аа.

### **ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ**

1. У людини гемофілія А – зчеплена зі статтю рецесивна ознака. У науковій літературі наведений випадок гемофілії у жінки, яка страждає на вроджену аменорею в зв'язку з тестикулярною фемінізацією. Як можна пояснити цей феномен?
2. Назвати типи визначення статі в природі залежно від циклу розвитку організму, навести приклади.
3. Чим відрізняються статеві хромосоми від аутосом?

4. Яке розщеплення за статтю спостерігається при сингамії? Чому статі називають менделюючою ознакою?
5. Порівняти спадкування ознак, зчеплених зі статтю, у дрізофіли, людини, рослин.
6. Як успадковуються ознаки та які ефекти спостерігаються при нерозходженні статевих хромосом у дрізофіли та людини?
7. В чому сутність балансової теорії визначення статі?
8. Дайте визначення ознак, обмежених статтю і залежних від статі.

## 2.4. Зчеплення генів і кросинговер

### Лабораторна робота № 9

#### Генетичний аналіз зчепленого спадкування

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями зчепленого спадкування ознак; оволодіти логікою проведення генетичного аналізу спадкування зчеплених генів.

**Завдання 1.** Розглянути та замалювати схеми розміщення генів у хромосомах при зчепленому спадкуванні (повному та неповному зчепленні). Засвоїти хід проведення генетичного аналізу зчепленого спадкування генів (на прикладі спадкування забарвлення квіток і форми пилкових зерен духмяного горошку) при знаходженні генів у цис-положенні та транс-положенні.

У дослідах Бетсона та Пеннета при схрещуванні рослин горошку з пурпурними квітками (*P*) та видовженими пилковими зернами (*L*- *long*) з червоноквітковими рослинами (*p*) та округлим пилком (*l*) в першому гібридному поколінні всі рослини мали пурпурні квітки та видовжений пилко, а в  $F_2$  відбулося незвичне розщеплення за цими ознаками, відмінне від дигібридного при менделівському спадкуванні: 4831 рослина пурпурно квіткова з видовженим пилком; 393 червоноквіткові рослини з видовженим пилком; 390 рослин з пурпурними квітками та округлим пилком і 1338 рослин червоно квіткових з округлими пилковими зернами. Пояснити одержані результати.

#### *Хід проведення генетичного аналізу:*

Визначимо, скільки генів контролюють ці дві пари ознак. Для цього проведемо генетичний аналіз розщеплення потомства  $F_2$ . Аналіз складається з 2-х етапів.

#### **Етап I**

1. Аналізуємо спадкування забарвлення квітки: пурпурні  $(4831+390) = 5221$  : червоні  $(393 + 1338) = 1731$ . Перевірка методом  $\chi^2$  дозволяє зробити висновок – розщеплення 3:1, тобто ця пара ознак успадковується моногенно ( $\chi^2 < 3,84$ ).

1. Аналізуємо спадкування довжини пилку: видовжений  $(4831 + 393) = 5224$  : округлий  $(390 + 1338) = 1728$ . Це співвідношення також не відрізняється від 3:1 статистично достовірно ( $\chi^2 < 3,84$ ), отже, спадкування моногенне.

**Етап 2.** Визначаємо характер успадкування цих двох ознак. При незалежному спадкуванні генів розщеплення має бути 9:3:3:1. Розрахуємо теоретично очікуване розщеплення та порівняємо його з реальним:

<i>Фактично одержано:</i>	<i>теоретичне співвідношення:</i>	<i>очікувані числа:</i>
Пурпурні, довгий пилко    4831	9	3910,5

Пурпурні, округлий	390	3	1303,5
Червоні, довгий пиллок	393	3	1303,5
Червоні, округлий	1338	1	434,5
<b>Всього:</b>	<b>6952</b>	<b>16</b>	<b>6952,0</b>

Відповідностей між частотами, що порівнюються, немає ( $\chi^2 > 7,81$ ).

Рослин з такою ж самою комбінацією ознак, як в батьків, значно більше, ніж очікується. Отже, гени, що контролюють ці ознаки, успадковуються не незалежно, а зчеплено.

Таким чином, характерними особливостями зчепленого спадкування є:

1. невідповідність дигібридного розщеплення в  $F_2$  очікуваному менделівському розщепленню за фенотипом (9:3:3:1);
2. форм, в яких комбінуються ознаки батьків, - **рекомбінантних** – менше, ніж очікується, а рецесивних форм - суттєво більше (1338 замість теоретично очікуваних 434,5).

У розглянутому нами схрещуванні обидві ознаки однієї батьківської форми є домінантними – це випадок так званого «**притяжіння**», або цис-положення домінантних алелей. А тепер розглянемо випадок «**відштовхування**», або транс-положення алелей, коли батьківська форма має одну ознаку домінантну, іншу – рецесивну:

P: пурпурні квітки × червоні квітки  
 круглий пиллок                      видовжений пиллок

$F_1$ : пурпурні з видовженим пилком

$F_2$ : Фактично одержано:                      теоретичне співвідношення:                      очікувані числа:

Пурпурні, довгий пиллок	226	9	235,8
Пурпурні, округлий	95	3	78,5
Червоні, довгий пиллок	97	3	78,5
Червоні, округлий	1	1	26,2
<b>Всього:</b>	<b>419</b>	<b>16</b>	<b>419,0</b>

Як бачимо, розщеплення також не відповідає 9:3:3:1, тобто гени належать до однієї групи зчеплення. Але в чому відмінність цього випадку? Перш за все, при «відштовхуванні» алелей відмінність типів спадкування (незалежне – зчеплене) не така різка, хоча, як і в випадку «притяжіння» алелей, вона помітна при порівнянні частоти зустрічальності рецесивних форм. Тільки тут вона мала в порівнянні з теоретично очікуваною. Причини таких різноспрямованих відхилень при «притяжінні» та «відштовхуванні» алелей зрозумілі: в першому випадку аавв – батьківська форма, в другому – рекомбінантна, утворена в результаті кросинговеру.

**Пояснення до завдання 1.** Явище зчепленого спадкування вперше описали Бетсон і Пеннет у 1906 році. Аналізуючи спадкування забарвлення квіток і форми пилку духмяного горошку, вони спостерігали в  $F_2$  відхилення від менделівського розщеплення 9:3:3:1. Ознаки батьків передавались потомству переважно в тому ж сполученні:

P ♀ PPLL × ppll ♂  
 пурп. квітки                                      червоні квітки

$F_1 PpLl$

пурпурні квітки з видовженим пилом

$F_2$  :  $P-L$ - 4831 (69, 5%),  $ppL$ - 393 (5, 6%),  $P-ll$  390 (5, 6%),  $ppll$  1338 (19, 36%).

У реципрокному схрещуванні ( $\text{♀ } ppLL \text{ ♂ } PPlL$ ), вони одержали той самий результат:  $ppL$ - і  $P-ll$  з'явилися в  $F_2$  в більшій кількості, ніж припускалося теоретично. Бетсон і Пеннет пояснили це явище теорією притяжіння – відштовхування, котра надалі була пояснена локалізацією генів ( $P$  і  $L$ ) в одній хромосомі, що виключало можливість їх вільного комбінування в генотипах потомства.

Це зрозуміло, якщо згадати, що гени локалізовані в хромосомах, а кількість хромосом у каріотипі зазвичай невелика: до одного або декількох десятків, тоді як ознак організму – тисячі. В одній хромосомі локалізовано багато генів, отже, частина ознак має успадковуватися зчеплено.

Зчеплені гени позначаються інакше, ніж гени, що знаходяться в різних хромосомах. Коли гени успадковуються незалежно та знаходяться в різних хромосомах, ми записуємо дигетерозиготу так:  $AaBb$ , або  $\underline{A} \quad \underline{B}$

а в

тобто гени в різних хромосомах. Якщо гени зчеплені, тоді дигетерозиготу слід позначати так:  $ABaB$  – гени « $AB$ » в одній хромосомі та гени « $ab$ » в іншій гомологічній хромосомі:  $\underline{AB}$ .

ав

Група генів, локалізованих в одній хромосомі, називається **групою зчеплення**. Кількість груп зчеплення в будь-якого організму дорівнює гаплоїдному набору хромосом.

**Завдання 2.** а) порівняти результати розщеплення в потомстві аналізуючого схрещування при різних типах взаємодії генів: незалежному спадкуванні, повному зчепленні генів, неповному зчепленні. Навести схеми всіх трьох схрещувань у генетичній символіці, охарактеризувати причини відмінностей кількісних співвідношень розщеплення в усіх трьох випадках (табл.2.4).

Таблиця 2.4

Кількісні співвідношення розщеплення за генотипом у потомстві від аналізуючого схрещування дигетерозиготи при різних типах спадкування

Характер спадкування:	Генотипи $F_a$ (%)			
	$Aa Bb$	$Aabb$	$aaBb$	$aabb$
Незалежне	25	25	25	25
Повне зчеплення	50	0	0	50
Неповне зчеплення (відстань між генами 17 морганід)	41,5	8,5	8,5	41,5

б). Провести аналіз успадкування ознак при повному зчепленні генів на конкретному прикладі: у томата високий зріст рослин ( $D$ ) домінує над



карликовим (d), гладкі плоди (P) - над опушеними (p). Гомозиготна висока рослина з гладкими плодами схрещена з гомозиготною карликового росту з опушеними плодами:  $P \text{♀} (PD)(PD) \times \text{♂} (pd)(pd)$ . Одержані гібриди при схрещуванні між собою в F<sub>2</sub> дали два фенотипові класи: високорослі з гладкими плодами (75%) та карликові з опушеними плодами (25%). Пояснити розщеплення, написати генотипи потомства.

**Завдання 3.** Провести аналіз успадкування ознак при неповному зчепленні генів з використанням аналізуючих схрещувань. Описати в генетичній символіці досліди К.Гетчинсона (на кукурудзі) та Т.Моргана (на дрозофілі). Визначити відстань між генами та генотипи батьківських форм і потомства в обох дослідах.

А) У 1922 році К.Гетчинсон при схрещуванні рослин кукурудзи, що відрізнялися за забарвленням і формою насіння, одержав наступні результати:

**1. випадок «притяжіння» алелей:**

*P: забарвлені гладкі × незабарвлені зморшуваті*

*F<sub>1</sub>: забарвлені гладкі × незабарвлені зморшуваті*

*F<sub>2</sub>: 4032 – забарвлені гладкі; 149 – забарвлені зморшуваті; 152 – незабарвлені гладкі; 4035 – незабарвлені зморшуваті (всього 8368 рослин).*

**2. випадок «відштовхування» алелей:**

*P: незабарвлені гладкі × забарвлені зморшуваті*

*F<sub>1</sub>: забарвлені гладкі × незабарвлені зморшуваті*

*F<sub>2</sub>: 638 – забарвлені гладкі; 21379 – забарвлені зморшуваті; 21906 – незабарвлені гладкі; 672 – незабарвлені зморшуваті (всього 44595 рослин). Пояснити результати.*

Б) У 1906 році Т. Морган із співробітниками провели наступне схрещування (рис. 2.3):

*Чорні дрозофіли із зачатковими крилами (рецесивні ознаки) схрещені з сірими довгокрилими (домінантні ознаки). Потім самки F<sub>1</sub> схрещені з чорними самцями, що мають короткі крила. В F<sub>2</sub> отримано: сірих довгокрилих - 86 особин, сірих з короткими крилами - 17, чорних довгокрилих - 28, чорних з короткими крилами - 92 особини. Пояснити результати.*

**Пояснення до завдання 3.** У досліді Т.Моргана при схрещуванні гетерозиготної самки дрозофіли з сірим тілом і нормальними крилами з гомозиготним рецесивним самцем з чорним тілом і зачатковими крилами, спостерігалось розщеплення на чотири фенотипових класи в співвідношенні: 41,5 % сірих довгокрилих, 41,5% чорних безкрилих (усього 83%), 8,5 % чорних довгокрилих і 8,5% сірих безкрилих (усього 17%) (рис. 2.3).

**Примітка.** Вивчаючи явище зчеплення генів, Томас Морган і його учні встановили, що зчеплення майже ніколи не буває повним. Тільки у самців дрозофіли (♂ XY) і самок тутового шовкопряда (♀ ZW або XY) спостерігається повне зчеплення генів у хромосомах! Характер зчеплення генів зазвичай вивчають за даними аналізуючого схрещування.

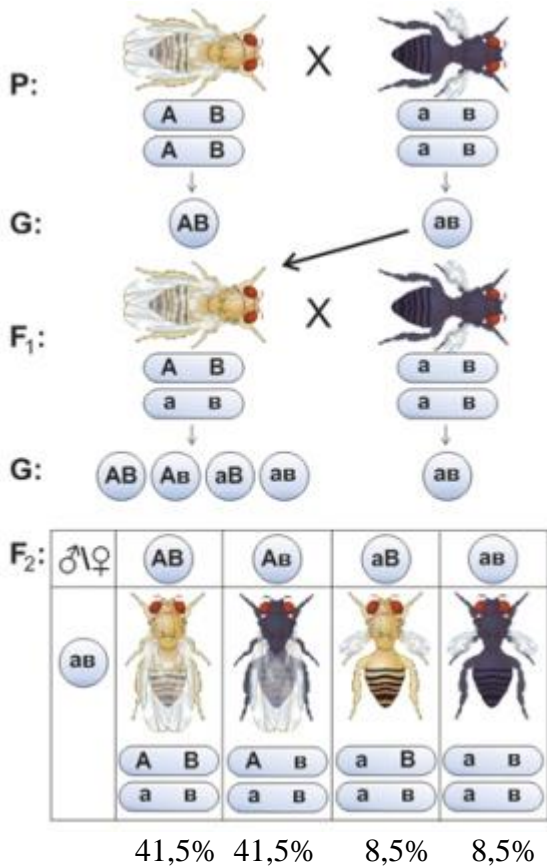
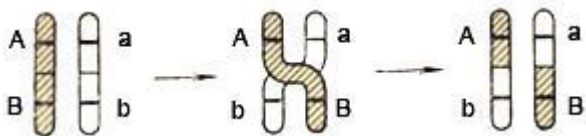


Рис. 2.3. – Генотипи та фенотипи дрозofil у потомствi від аналізуючого схрещування дигетерозигот

Порушення зчеплення в 17% випадків Морган пояснив обміном гомологічними ділянками між гомологічними хромосомами (кросинговером), який можна представити наступною схемою:



У результаті такого обміну утворюються кросоверні хромосоми (Ab і aB), які дають кросоверні гамети (Ab і aB). Оскільки кросинговер – рідкісна подія, то й частота виникнення кросоверних гамет і відповідних генотипів є незначною, суттєво меншою за некросоверні форми. Спочатку цю гіпотезу зустріли вельми критично, проте досить скоро бельгійський цитолог Янссенс описав явище, яке підтвердило теорію Моргана. Він спостерігав, що хромосоми в профазі мейозу утворюють пари (кон'югують), в деяких точках безпосередньо стикаються і перехрещуються одна з одною, утворюючи **хіазми** при розходженні в мейозі.

На думку Моргана, саме в цих точках контакту (хіазмах) і відбувається обмін ділянками хромосом. Пізніше така відповідність цитологічних обмінів і фенотипового розщеплення в гібридів була засвідчена Карлом Штерном на дрозofilі та Барбарою МакКлінток на кукурудзі. Отже, кросинговер **кросинговер** (crossing over) – перехрест хромосом, що призводить до обміну гомологічними ділянками несестринських хроматид, в результаті чого утворюються нові поєднання генів - відбувається в пахітені профазі мейозу між хроматидами гомологічних хромосом, в результаті чого утворюються нові поєднання генів. Гамети з новим поєднанням генів, що утворилися в результаті кросинговеру називаються **кросоверними (рекомбінантними)**.

Частоту кросинговеру визначають за формулою:

$$\% \text{ кросинговеру } (A | B) = \frac{\text{кількість рекомбінантів}}{\text{загальна кількість особин потомства } F_a} \times 100\%$$

Гомологічні хромосоми можуть здійснювати перехрест у декількох місцях. У відповідності з цим кросинговер може бути одинарним, подвійним, потрійним і множинним. Перехрест позначається вертикальною рисою; наприклад, одинарний -  $A/B$ , подвійний -  $A/B/C$ . Нижче наведені схеми одинарного та подвійного перехреста в організмі з генотипом  $ABCabc$  (рис. 2.4).

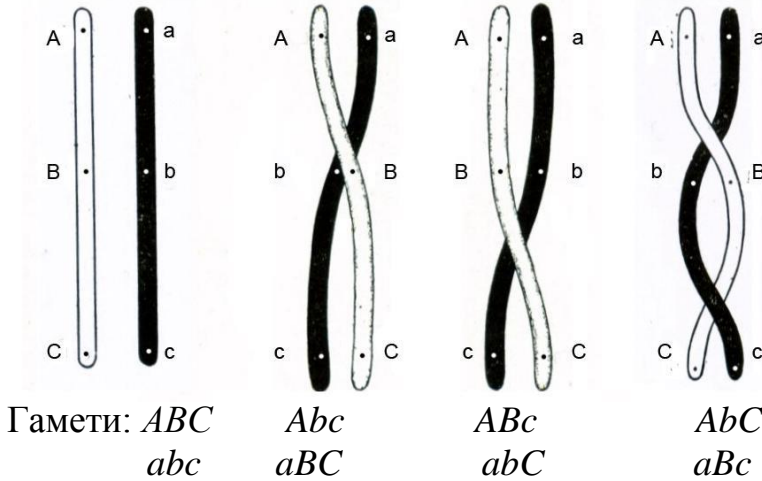


Рис. 2.4. – Схема одинарного та подвійного кросинговеру

Частота некросоверних хромосом і некросоверних гамет завжди найбільша в процентному відношенні, частота подвійних кросоверів – найменша. Морган запропонував використовувати частоту кросинговеру як показник відносної відстані між генами. Одиницею цієї відстані є 1% кросинговеру, який дорівнює частоті появи кросоверних форм у потомстві аналізуючого схрещування. В честь Моргана її назвали сМ - *сантиморган або морганіда*.

Якщо прийняти відстань між генами  $AB=15\%$ ,  $BC=10\%$ , то ймовірність подвійного перехреста дорівнює добутку ймовірностей двох одинарних, тобто  $15\% \times 10\% = 1,5\%$ . Це теоретично, а фактично подвійний перехрест буває меншим унаслідок явища, названого *інтерференцією (I)* - пригнічення перехреста в одній точці перехрестом у сусідній точці. В результаті цього подвійний перехрест відбувається рідше, ніж очікується теоретично.

Інтерференція (I) розраховується за формулою:

$I = 1 - C$ , де  $C$  – *коінциденція* - відношення фактичного подвійного перехреста до теоретично очікуваного:

$$C = \frac{\text{частота подвійних перехрестів фактична}}{\text{частота подвійних перехрестів теоретична}} \quad (\text{в наведеному випадку} - 1,5\%)$$

Якщо гени розміщені близько, наприклад, на відстані 10%, то інтерференція повна, і дорівнює 1, оскільки подвійний перехрест не відбувається зовсім ( $C = 0$ ). Якщо гени розміщені порівняно далеко, то  $I = 1 \rightarrow 0$ . При одинарному перехресті частота обмінів завжди менше 50%. Якщо вона 50%, це означає, що гени вільно комбінуються, не зчеплені та успадковуються незалежно. Вони або знаходяться в різних хромосомах (у разі 50% кросинговеру) або в одній хромосомі, але на

великій відстані один від одного (це явище називається **синтенія**), зчеплення між ними виявляється завдяки проміжним генам.

**Основні положення хромосомної теорії спадковості Томаса Моргана:**

1. Гени знаходяться в хромосомах і в межах однієї хромосоми утворюють групу зчеплення. Кількість груп зчеплення дорівнює галоїдному набору хромосом.
2. Гени розміщені на хромосомі лінійно та успадковуються зчеплено.
3. У пахитені профазі I мейозу між несестринськими хроматидами гомологічних хромосом може відбуватися кросинговер, величина якого пропорційна відстані між генами. В результаті відбувається рекомбінація генів, яка є важливим джерелом появи нових форм для природного та штучного добору.

**Завдання 4.** На основі набутих навичок самостійно провести генетичний аналіз зчепленого спадкування генів:

1. Гени *A* і *B* зчеплені, кросинговер між ними складає 10%, а ген *C* знаходиться в іншій групі зчеплення. Які гамети та в якому співвідношенні утворюватимуть гетерозиготи:

a)  $\frac{AB}{ab} \frac{C}{c}$                       b)  $\frac{Ab}{aB} \frac{C}{c}$

2. В аналізуючому схрещуванні гетерозиготи *AaBb* одержані наступні результати: *A-B-* 903, *A-bb* – 101, *aaB-* 98, *aabb* – 898. Поясніть розщеплення. Якщо гени зчеплені, то в якому стані - «притяжіння» чи «відштовхування» вони знаходяться в гетерозиготі?

3. У томата високий ріст рослини домінує над низьким, гладкий епідерміс — над шорстким. Від схрещування двох рослин отримали розщеплення: 208 високих гладких, 9 високих шорстких, 6 низьких гладких, 195 низьких шорстких рослин. Поясніть розщеплення. Визначте генотипи вихідних рослин і їхній фенотип.

4. В аналізуючому схрещуванні дигетерозиготи відбулося розщеплення на чотири фенотипових класи в співвідношенні: 42,4 % - *AB*, 6,9 % - *Ab*, 7,0 % - *aB* і 43,7 % - *ab*. Як успадковуються гени? Який генотип гетерозиготи? Що вийде, якщо дигетерозиготи схрестити між собою?

5. Від схрещування білих курей без чуба з чорними чубатими півнями в *F1* всі курчата виявилися білими чубатими, а в *F2* відбулося розщеплення: 5005 – білих чубатих; 2505 – білих без чуба; 2460 – чорних чубатих; 30 – чорних без чуба, всього 10000. Як успадковуються ознаки? Визначте генотипи вихідних птахів і гібридів *F1*. Яке розщеплення ви очікуєте отримати в аналізуючому схрещуванні та яких птахів ви маєте використовувати для нього?

6. Від схрещування рослин кукурудзи з жовтим непрозорим (тьмяним) ендоспермом з рослиною з білим прозорим ендоспермом в *F1* всі зерна мали жовтий прозорий ендосперм, а в *F2* відбулося розщеплення: 777 зерен мали жовтий непрозорий ендосперм. 7 - жовтий прозорий, 10 - білий непрозорий і 773 - білий прозорий ендосперм. Як успадковуються ознаки? Визначте генотипи вихідних рослин і гібридів *F1*, а також фенотип аналізатора.

7. В аналізуючому схрещуванні дигетерозиготи відбулося розщеплення на чотири фенотипових класи в співвідношенні; 42,4 % - *AB*, 6,9 % - *Ab*, 7,0 % - *aB* і 43,7 % -

ab. Як успадковуються гени? Який генотип гетерозиготи? Що вийде, якщо дигетерозиготи схрестити між собою?

**Пояснення до завдання 4.** При вивченні зчепленого спадкування для визначення відстані між генами бажано використовувати аналізуюче схрещування, при якому відразу і легко виділяються кросоверні (рекомбінантні) класи. За їх часткою можна обчислити відсоток кросинговеру і виявити відмінності в частоті рекомбінацій у особин різної статі (якщо вони є) за результатами реципрокних схрещувань, використовуючи в якості гетерозиготних особин або материнську форму, або батьківську. Дигетерозиготу  $AaBb$  можна представити в хромосомній формі при зчепленні генів (гени  $A$  і  $B$  в одній парі), причому

$\overline{AB}$  називається цис–положення генів,  $\overline{aB}$  - транс–положення.  
 $ab$   $Ab$

При проведенні генетичного аналізу слід пам'ятати, що: 1) серед кросоверів утворюється два рівних за чисельністю класи за кожним кросинговером; 2) ймовірність об'єднання генів різних груп зчеплення у кожній гаметі дорівнює добутку ймовірностей прояву кожного гена, що утворює цю гамету; 3) ймовірність об'єднання різних типів гамет у зиготі дорівнює добутку частот цих гамет; 4) якщо відома кількість кросоверних особин, то процент кросинговеру між генами розраховується за формулою:

$$\% \text{ кросинговеру (A | B)} = \frac{\text{кількість рекомбінантів}}{\text{загальна кількість особин потомства } F_2} \times 100\%$$

5) якщо відома відстань між генами (в % перехреста або сМ), то кількість кросоверних гамет певного типу (n) можна розрахувати за формулою:

$$n = \frac{\% \text{ кросинговеру}}{2}$$

### Приклади генетичного аналізу зчепленого спадкування

#### I. Аналіз успадкування зчеплених аутосомних генів

**Приклад 1.** Відстань між генами  $A$  і  $B$  становить 20%. Проведена гібридизація рослин з генотипами  $AbAb$  та  $aBaB$ . Визначити розщеплення в  $F_2$ .

#### Хід проведення генетичного аналізу:

1) Наведемо схему схрещування  $P : \text{♀ } \overline{Ab} \times \text{♂ } \overline{aB}$   
 $Ab$   $aB$

$F_1 : Ab aB \times Ab aB$

Відстань між генами – це частота кросинговеру, або відсоток кросоверних особин при аналізуючому схрещуванні, який визначається відсотками кросоверних гамет гетерозиготи. У даному випадку 20% - це сума частот кросоверних гамет  $AB$  і  $ab$ , отже, частота кожного типу ( $AB$  і  $ab$ ) дорівнює 10%. На некросовери залишається 80% (100-20), так що некросоверні гамети ( $Ab$  і  $aB$ ) мають частоту 40%. Для отримання  $F_2$  креслимо решітку Пеннета:

♀ \ ♂	$Ab$ 40%	$aB$ 40%	$AB$ 10%	$ab$ 10%
$Ab$ 40%	$AbAb$ 16%	$Ab aB$ 16%	$Ab AB$ 4%	$Ab ab$ 4%
$aB$ 40%	$aBAb$ 16%	$aBaB$ 16%	$aBAB$ 4%	$aBab$ 4%
$AB$ 10%	$ABAb$ 4%	$AB aB$ 4%	$AB AB$ 1%	$AB ab$ 1%
$ab$ 10%	$abAb$ 4%	$ab aB$ 4%	$ab AB$ 1%	$ab ab$ 1%

$$\Sigma = 100\%$$

Ймовірність кожного типу зигот дорівнює добутку частоти гамет, що їх утворюють. Результати записуємо в кожну клітину (зиготу). Потім підсумовуємо частоти однакових фенотипів і отримуємо розщеплення в  $F_2$ . Запис даємо у формі фенотипового радикала:

(9 класів)  $A-B-$  =  $(16+4+16+4+4+4+1+1+1)=51\%$ .

(3 класи)  $A-вв$  =  $(16+4+4)=24\%$

(3 класи)  $aaB-$  =  $(16+4+4)=24\%$

(1 клас)  $aавв$  = 1%

$$\Sigma = 100\%$$

**Висновок:** розщеплення в  $F_2$ :  $A-B-$  – 51%;  $A-bb$  – 24% ;  $AaB-$  – 24%;  $aabb$  – 1%.

У розглянутому прикладі є один цікавий момент, який дозволяє визначити  $rf$  (частоту рекомбінації) за розщепленням в  $F_2$ . Це частота рецесивних гомозигот ( $aавв$ ). Рецесивні гомозиготи виникають при злитті гамет з рецесивними генами, а їх частота – добуток частот гамет. Це єдиний фенотип із усього розщеплення, утворений злиттям двох однакових гамет ( $ab + ab$ ). Знаходячи корінь квадратний з частоти цих зигот, можна отримати частоту рецесивних гамет ( $ab$ ). Гамети з домінантними генами ( $AB$ ) мають таку ж саму частоту. Якщо сума частот  $ab$  і  $AB > 50\%$ , то ці гамети не кросоверні, якщо менше – кросоверні. Таким чином можна визначити частоту кросинговеру (відстань між генами) і визначити положення генів у хромосомах гетерозиготи (цис - або транс-положення). Цей підхід використовується при визначенні  $rf$  за розщепленням  $F_2$  і отримав назву «метод знаходження кореня».

**Приклад 2.** Від схрещування рослин томата в потомстві  $F_1$  всі рослини високі з кулястими плодами. Від самозапилення гібридів  $F_1$  отримали розщеплення в  $F_2$ : 330 – високі з кулястими плодами; 46 - високі з грушоподібними плодами; 44 – карлики з кулястими плодами; 80 – карлики з грушоподібними плодами (всього 500 рослин). Визначте генотипи батьків і відстань між генами.

### *Хід проведення генетичного аналізу:*

1) На підставі фенотипу  $F_1$  і розщеплення за кожним геном в  $F_2$  – 3:1 (що потрібно перевірити за методом  $\chi^2$ ), визначаємо домінантну та рецесивну ознаки, позначаємо їх буквами:

$A$  – висока рослина;

$a$  – карлик;

$B$  – куляста форма плоду;

$b$  – грушовидна.

2) Позначаємо розщеплення  $F_2$  за допомогою фенотипового радикалу:

330 –  $A-B-$ ; 46 –  $A-bb$ ; 44 –  $aaB-$ ; 80 –  $aавв$ . Всього 500 рослин.

3) Визначаємо частоту подвійних рецесивів ( $aавв$ ) :  $80:500 = 0,16$ . Знаходячи квадратний корінь з цього числа, визначаємо частоту гамет ( $ав$ ) – 0,4 або 40%. Такою ж буде частота гамет  $AB$ . Отже, гетерозигота мала гени в цис – положенні і частота кросоверів дорівнює  $100\% - 80\% = 20\%$ .

**Висновок:**  $rf = 20\%$ . Р:  $ABAB$  х  $aавв$ .

Цей метод простий, але не дуже точний, оскільки у визначенні rf беруть участь тільки рецесивні гомозиготи.

**Приклад 3.** Гени А, В і С локалізовані в одній хромосомі в зазначеному порядку. Відстань між А-В дорівнює 30%, В-С – 20%. Яке потомство буде при схрещуванні гомозиготної особини ABC – з гомозиготною особиною abc і при схрещуванні гібридів F1 з особиною aabbcc?

**Хід проведення генетичного аналізу:**

1) Запишемо схему схрещування:

P ♀ ABC ABC × ♂ abc abc

F<sub>1</sub> : ABCabc × abcABC

2) Розпишемо типи гамет F<sub>1</sub>:

1) ABC некросоверні

2) abc

3) Abc

4) aBC A|B - одинарний кросинговер між генами А і В

5) ABc

6) abC B|C - одинарний кросинговер між генами В і С

7) ABC

8) aBc A|B|C – подвійний кросинговер

Розрахунок частоти кожного типу гамет почнемо з 7 і 8 номерів. Ці гамети утворилися в результаті подвійного перехреста. Його частота дорівнює добутку ймовірностей кросинговерів A|B x B|C, відображеним у вигляді відстані у відсотках. Отже, rf подвійного перехреста дорівнює 30% x 20% = 6%. Отже, частота утворення гамет AbC та aBc становить 6%, по 3% кожного типу. У відстань між генами В і С увійшли всі частоти кросинговеру (rf), тобто одинарний і подвійний перехрест. Тому для вичленення частоти одинарного перехреста B|C від 20% потрібно відняти 6%. Отже, на гамети з одинарним перехрестом залишається 20% - 6% = 14%. На кожен тип гамет ABc і abC припадає по 7%. Так само можна визначити і частоту гамет Abc та aBC (30% - 6% = 24%). Вона дорівнює 12% для кожного типу. Якщо загальна число гамет прийняти за 100%, то на некросоверні залишається (100% - 6% - 14% - 24% = 56%), на кожен тип гамет - ABC і abc - по 28%. Аналізуюче схрещування дає розщеплення, що збігається з частотою гамет тригетерозиготи, тому що фенотип і частота того чи іншого класу повністю визначається гаметами тригетерозиготи.

**Висновок:** F<sub>a</sub>: 1) ABC abc - 28%; 2) abc abc - 28%; 3) Abc abc - 12%; 4) aBC abc - 12%; 5) ABc abc - 7%; 6) abC abc - 7%; 7) Abc abc - 3%; 8) aBc abc - 3%.

**Приклад 4.** Проведена гібридизація рослин кукурудзи із забарвленим алейроном і гладким (кремнистим) ендоспермом та незабарвленим алейроном і зерном із вм'ятиною (зубовидним). В F1 всі рослини мали насінини із забарвленим гладким ендоспермом. В F<sub>a</sub> одержали розщеплення: забарвлених гладких насінин - 4152; незабарвлених із вм'ятиною насінин - 4166; забарвлених із вм'ятиною насінин - 149; незабарвлених гладких насінин - 152. Провести генетичний аналіз, тобто визначити, які ознаки домінують, які - рецесивні, де знаходяться гени: в одній парі хромосом чи в різних; якщо в одній, то на якій відстані один від одного, надати схему схрещування.

**Хід проведення генетичного аналізу:**

В умові задачі присутні дві пари ознак. Оскільки всі нащадки першого покоління мають однаковий фенотип, можна припустити, що батьківські форми були гомозиготними, ознаки забарвленого і гладкого ендосперму свідчать з великою ймовірністю про їхню домінантність.

В  $F_0$  отримали чотири фенотипи, але їх чисельність різна, що не співпадає з менделівським розщепленням 1: 1: 1: 1, яке визначається вільним комбінуванням генів, що знаходяться в різних парах хромосом. Очевидно, гени  $A$  та  $B$  (позначимо їх так) знаходяться в одній парі хромосом, тобто зчеплені, тоді схему схрещувань і результати розщеплення можна представити таким чином:

$P: \text{♀ } ABAB \times \text{♂ } aava$

$F_1: ABaav \times aava$

$F_0$ :  $ABaav$  – забарвлений, гладкий.

$aava$  – незабарвлений, з вм'ятиною.

$Aaav$  – забарвлений, з вм'ятиною.

$aAav$  – незабарвлений, гладкий.

Потомство  $F_1$  дало чотири типи гамет: некросоверні ( $AB$  та  $av$ ) і кросоверні ( $Av$  та  $aB$ ). Батьківська форма для  $F_0$  утворює тільки гамети з рецесивними генами, тому фенотип потомства та частота його класів розщеплення цілком визначаються типом і частотою гамет дигетерозиготи  $F_1$ .

Розраховуємо частоту кросинговеру ( $rf$ ) і тим самим визначаємо відстань між генами  $A$  і  $B$ :

$$rf(A|B) = \frac{149 + 152}{149 + 152 + 4152 + 4166} \times 100\% = 3,6\%$$

**Висновок:** ознаки забарвленого та гладкого ендосперму ( $A$  і  $B$ ) домінантні, гени зчеплені, знаходяться в одній парі хромосом на відстані 3,6% кросинговеру. Гени вступили в схрещування в цис – положенні:

$P \text{♀ } \underline{AB} \times \text{♂ } \underline{av}$   
 $AB \quad av$

## II. Аналіз успадкування зчеплених генів статевих хромосом

Розглянемо тепер, як успадковуються ознаки, якщо їх гени знаходяться в статевих хромосомах.

**Приклад 1.** У дрозофіли ознаки форми крил (зрізані або нормальні) і забарвлення очей (гранатові або червоні) зчеплені між собою. Дикий тип має нормальні крила і червоні очі. В одному досліді було отримано наступне розщеплення в  $F_2$ :

♀ 105 – дикого типу	♂ 26 – дикого типу
100 – із зрізаними крилами	75 – з гранатовими очима
	76 – із зрізаними крилами
	23 – з гранатовими очима та зрізаними кр.

Відсутність ознаки означає, що вона дикого типу. Визначити: 1) де знаходяться гени – в статевій хромосомі чи в аутосомі? 2) в якій хромосомній формі увійшли до схрещування – цис – або в транс-положенні? 3) яка відстань між генами?

### Хід проведення генетичного аналізу:

1) позначимо гени форми крил  $A$  і  $a$ , забарвлення очей  $B$  і  $b$ , ( $A$  і  $B$  – дикий тип). Гени локалізовані в  $X$ -хромосомі, оскільки розщеплення за цими ознаками у самців і самок різне ( $Y$ -хромосома дрозофіли – генетично інертна – цих генів не



несе). Життєздатність особин обох статей однакова, тому що розщеплення за статтю дорівнює 1:1. Запишемо фенотипи нащадків  $F_2$  за допомогою фенотипового радикала:

♀ 105 – A-B-	♂ 26 – ABY
100 – aaB-	75 – AbY
$\Sigma = 205$	76 – aBY
	23 – abY
	$\Sigma = 200$

2) Відстань між генами можна визначити за частотою кросоверів у самців  $F_2$ . Самці мають Y-хромосому від батька, а X-хромосому від матері, тому їх фенотипи, подібно аналізуючому схрещуванню, відображають типи гамет материнської форми  $F_1$ . Виходячи з кількості некросоверів (їх завжди більше) можна зробити висновок, що материнська форма  $F_1$  мала генотип  $aB/Av$ , тобто гени перебували в транс-положенні.

Частота перехреста  $rf = 26+23 : 200 \times 100 = 24,5\%$ . Це й є відстань між генами A і B. Отже, материнська форма  $F_1$  мала генотип  $aB/Av$ .

3) Жіноча особина  $F_1$  (донька) отримала одну X-хромосому від матері, другу – від батька (яку від кого, Ab і aB?). Чоловіча особина  $F_1$  – син – отримав X-хромосому від матері (яку?). Щоб відповісти на це питання, подивимося на ♀♀  $F_2$ : там є особини з генотипом aaB-. Два «a» могли вийти тільки, якщо у сина був генотип aBY, отже у вихідної материнської особини (P) був генотип aBaB. Припустимо, що мати була гомозигота. У доньки є й інша X-хромосома – від батька, її гени Av, отже, генотип самців AvY.

Таким чином, схема схрещування:

P: ♀  $X^{aB} X^{aB}$  × ♂  $X^{Ab} Y$

$F_1$ :  $X^{aB} X^{Ab}$  ×  $X^{aB} Y$

$F_2$ : ♀ A-B-	♂ ABY
aaB-	aBY
	AvY
	avY

**Висновок:** гени локалізовані в X-хромосомі, відстань між ними дорівнює 24,5% кросинговеру (тобто 24,5сМ). Генотипи батьків:  $X^{aB} X^{aB}$  та  $X^{Ab} Y$ ; потомства  $F_1$ :  $X^{aB} X^{Ab}$  та  $X^{aB} Y$ . Гени ввійшли в схрещування в транс-положенні.

### ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Дайте визначення понять «зчеплене спадкування» та «група зчеплення». Від чого залежить кількість груп зчеплення?
2. Розкрийте поняття «кросинговер». Які його типи ви знаєте?
3. Як розраховується частота перехреста і в яких одиницях вона виражається?
4. Наведіть докази кросинговеру (генетичні та цитологічні).
5. Які факти свідчать про лінійне розташування генів у хромосомі?
6. Що означає цис- і транс-положення генів?
7. Яке явище контролює інтерференція?
8. Як розраховується коефіцієнт співпадіння (C)?
9. Які фактори зовнішнього і внутрішнього середовища впливають на частоту кросинговеру?
10. У чому полягає генетичне і еволюційне значення кросинговеру?

11. Сформулюйте основні положення хромосомної теорії спадковості Моргана.

### Лабораторна робота № 10

#### Побудова ділянки генетичної карти хромосоми методом тріангуляції. Генетичний аналіз зчепленого спадкування трьох генів

**Мета роботи:** оволодіти методикою визначення місця локалізації гена в групі зчеплення та побудови ділянки генетичної карти для трьох генів дрозофіли (*b*, *cn*, *vg*); засвоїти принципи проведення генетичного аналізу спадкування трьох і більше зчеплених генів.

**Завдання 1.** Розглянути генетичну та цитологічну карти хромосом, скласти їх порівняльну характеристику. Визначити риси подібності та відмінності між генетичною та цитологічною картами:

	Цитологічна карта	Генетична карта
Риси подібності		
Риси відмінності		
Об'єкт для побудови		
Одиниця виміру відстані між генами		

**Пояснення до завдання 1.** Ідея про лінійне розміщення генів на хромосомі висунута Томасом Морганом за результатами генетичного аналізу розщеплення ознак, що контролюються трьома генами дрозофіли: *black* (*b*) – чорне тіло; *cinnabar* (*cn*) - кіноварні очі, *vestigial* (*vg*) – зачаткові крила в аналізуючому схрещуванні. Морган і його учні склали першу генетичну карту дрозофіли, визначивши частоту кросинговеру між генами, завдяки чому стало можливим визначення їх взаємного розташування в хромосомі.

**Генетична (або хромосомна) карта** – графічне зображення хромосоми (зазвичай у вигляді прямої лінії), на якій вказані гени, локалізовані в хромосомі у відповідності з відстанню між ними за встановленою частотою кросинговеру (**рис. 2.5**).

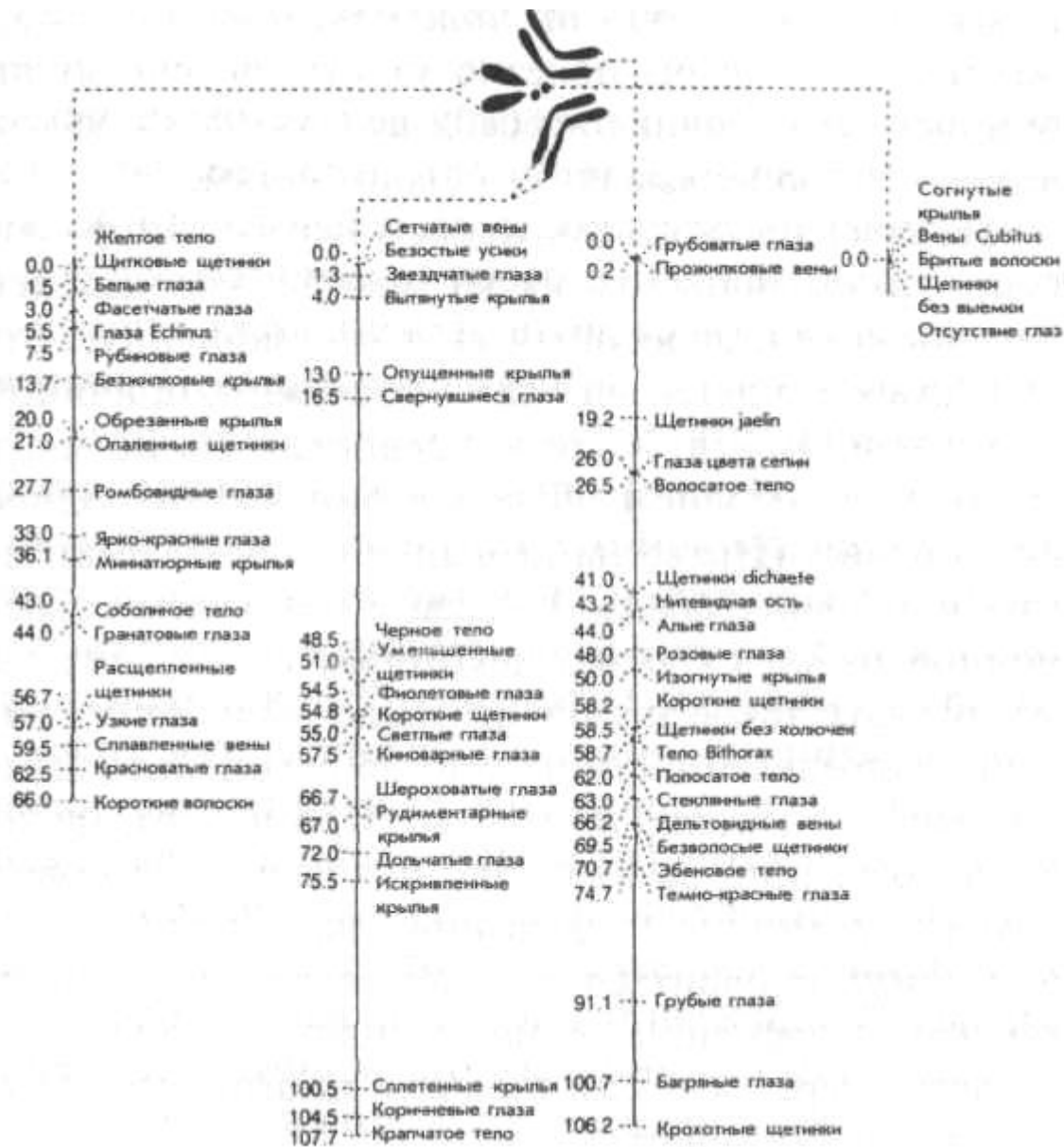


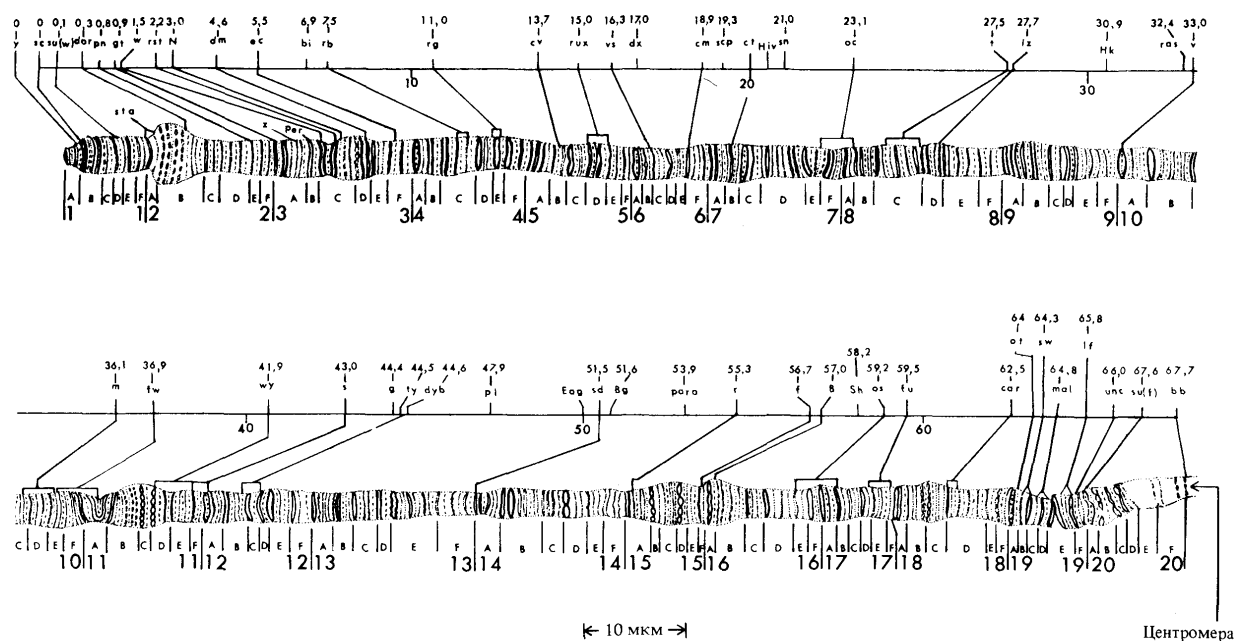
Рис. 2.5. - Генетичні карти груп зчеплення дрозофілі

Один кінець хромосоми (місце розміщення центромери) приймається за нульовий і від нього відраховується відстань в морганідах (одиницях кросинговеру) до кожного гена даної групи зчеплення. Генетична карта однієї хромосоми складає одну групу зчеплення. Одна умовна одиниця відстані між генами на карті дорівнює 1% кросинговеру (морганіда або сантиморган (сМ)). На карті вказують: номер хромосоми (групи зчеплення), місце центромери, положення кожного гена із зазначенням відстані до нього від нульової точки (початок хромосоми), повні або скорочені назви генів. Наприклад, у дрозофілі група зчеплення X- хромосоми позначена, як перша (I); дві групи зчеплення, що відповідають двом довгим метацентричним хромосомам – II і III; найменша – IV, куди належить також У-хромосома (рис 1). Для складання генетичних карт необхідно дослідити закономірності спадкування великої кількості генів. У дрозофілі вивчено близько 500 генів (Морган), у кукурудзи – 400; це колосальна праця багатьох вчених. Тому карти складені поки що лише для деяких найбільш генетично вивчених (модельних) об'єктів: дрозофілі, кукурудзи, томатів (~800 генів), миші, кишкової палички, пшениці, гороху, рису та інших.

**Цитологічні карти** хромосом складають для організмів, для яких вже існують генетичні карти; це хромосомні карти, де локалізація генів визначена на основі даних цитологічних досліджень особин із хромосомними мутаціями. Отже, цитологічне картування – це визначення фізичного місцезнаходження окремих генів у хромосомі та вимірювання фізичної відстані між ними. В якості генетичних маркерів при побудові цитологічних карт використовуються хромосомні мутації (делеції, дуплікації, транслокації) у місцях розміщення активно функціонуючих генів (пуфах) політенних хромосом і хромосом типу лампових щіток. Зіставляючи зміни морфологічних ознак хромосом при цих перебудовах із змінами генетичних властивостей організму, встановлюють місце того чи іншого гена в хромосомі. Кожне місце розміщення гена (локус) на генетичній карті організму, встановлене на основі кросинговеру, на цитологічній карті прив'язане до певної, реально існуючої ділянки хромосоми, що служить одним із основних доказів хромосомної теорії спадковості. Зіставлення цитологічних карт із генетичними показало, що фізична відстань між генами в хромосомах не відповідає генетичній (частота кросинговеру неоднакова в різних ділянках хромосом), тому щільність розподілення генів на цитологічних і генетичних картах хромосом різна. Так було встановлено важливе генетичне явище — нерівномірність частот перехреста за довжиною хромосоми. Лінійне розміщення генів і їхня послідовність, встановлена генетичними методами, підтверджується цитологічною картою хромосом.

Такі цитологічні зіставлення були проведені для багатьох генів, локалізованих в різних хромосомах дрозофіли, і вони переконливо продемонстрували, що генетична карта кожної хромосоми, отримана на основі даних по рекомбінації, добре відповідає реальній фізичній структурі хромосом (**рис. 2.6**).

Для побудови ділянки генетичної карти методом триангуляції необхідно виконати представлені нижче завдання.



**Рис. 2.6.** – Генетична карта деяких мутацій, виявлених в X-хромосомі *D. melanogaster*. Вказані зв'язки генетичної карти з цитологічною структурою політенних хромосом слинних залоз

**Завдання 2.** Побудувати ділянку генетичної карти для трьох генів дрозофіли: забарвлення очей (**cn**), забарвлення тіла (**b**), довжина крил (**vg**), що знаходяться в II-й групі зчеплення (**рис. 2.4**). Для цього проаналізувати розщеплення пар ознак: очі червоні ( $cn^+$ ) – очі яскраво-червоні (кіноварні) ( $cn$ ); тіло сіре ( $b^+$ ) – тіло чорне ( $b$ ); крила нормальні (довші за черевце) ( $vg^+$ ) – крила вкорочені ( $vg$ ) в потомстві аналізуючого схрещування тригетерозиготних самок з нормальним фенотипом і мутантних самців (з кіноварними очима, чорним тілом, зачатковими крилами ( $cn\ bvg\ cn\ b\ vg$ ):



$F_1: \text{♀ } cn^+ b^+ vg^+ cnbvg \times \text{♂ } cnbvg\ cnbvg$

**Хід виконання завдання 2:**

1. Враховуючи, що в самців кросинговер в хромосомах не відбувається, та вони продукують лише два типи некросоверних гамет, записати схему реципрокного схрещування тригетерозиготного самця з рецесивною за всіма трьома генами самкою. Визначити характер розщеплення та кількість фенотипових класів.

2. Записати схему аналізуючого схрещування гібридної самки  $F_1$  (тригетерозиготи) з рецесивним за зазначеними трьома генами самцем:

$F_1: \text{♀ } cn^+ b^+ vg^+ cn\ b\ vg \times \text{♂ } cn\ b\ vg\ cn\ b\ vg$

3. Проаналізувати генотипи та фенотипи особин  $F_a$ . Визначити, скільки типів гамет продукує тригетерозиготна самка; скільки генотипних і фенотипних класів розщеплення з'являється в результаті аналізуючого схрещування.

4. Встановити тип успадкування ознак (незалежне, повне зчеплення, неповне зчеплення) за результатами розщеплення в аналізуючому схрещуванні.

В потомстві аналізуючого схрещування одержані наступні фенотипні класи з різною кількістю нащадків:

	Потомство $F_a$ :							
	з червоними очима				з кіноварними очима			
	сірим тілом		чорним тілом		сірим тілом		чорним тілом	
	норм.кр.	зачат.кр.	норм.кр.	зачат.кр.	норм.кр.	зачат.кр.	норм.кр.	зачат.кр.
генотип								
кількість мух	631	91	68	1	2	56	80	575
Вибірка: 1504 особини								

5. Довести, що гени, спадкування яких аналізується, є зчепленими. Для цього перевірити спадкування кожних двох пар ознак в аналізуючому схрещуванні (теоретично очікувані співвідношення фенотипів за відсутності зчеплення складають 1:1:1:1). Самостійно перевірити за прикладом, наведеним нижче,

успадкування пар ознак: забарвлення очей – форма крил ( $cn - vg$ ) та забарвлення тіла – форма крил ( $b - vg$ ).

**Приклад:** перевіряємо спадкування пари ознак забарвлення очей – забарвлення тіла ( $cn - b$ ). Якщо б гени успадковувалися незалежно (за відсутності зчеплення між ними), в потомстві  $F_a$  за фенотипом утворилося б чотири фенотипових класи в рівному співвідношенні: червоні очі, сіре тіло (25%); червоні очі, чорне тіло (25%); кіноварні очі, сіре тіло (25%); кіноварні очі, чорне тіло (25%):

$F_1: cn^+ cn b^+ b \times cn cn b b$

$G_{\text{♀}}: \frac{1}{4} cn^+ b^+; \frac{1}{4} cn^+ b; \frac{1}{4} cn b^+; \frac{1}{4} cn b \quad G_{\text{♂}}: cn b$

$F_a: cn^+ cn b^+ b; cn^+ cn b b; cn cn b^+ b; cn cn b b$   
           25%          25%          25%          25%

У нашому ж досліді одержано: червоні очі, сіре тіло (631+91=722); червоні очі, чорне тіло (68+1=69); кіноварні очі, сіре тіло (2+56=58); кіноварні очі, чорне тіло (80+575=655). Зрозуміло, що кількість некросоверів (червоні очі, сіре тіло - кіноварні очі, чорне тіло: 722 + 655=1 377) є значно більшою, ніж рекомбінантів (кіноварні очі, сіре тіло та червоні очі, чорне тіло: 58 + 69=127), що свідчить про зчеплення цих генів в одній хромосомі.

б. За результатами аналізуючого схрещування визначити, скільки рекомбінантів і некросоверних особин налічується в потомстві  $F_a$ . Для цього потомство такого схрещування розподілити за чотирма класами пар ознак (некросоверні форми та рекомбінанти окремо), визначити частоту зустрічальності кожного класу (див. таблицю):

Фенотипи $F_a$	Генотипи $F_a$	Номер класу	Кількість мух:	
			штук	%
черв. очі, сіре тіло, норм. кр.	$cn^+ b^+ vg^+ cn b vg$	1	631	80,2
кінов.очі,чорн. тіло, зачат.кр.	$cn b vg cn b vg$		575	
			<b>Всього: 1206</b>	
черв.очі, сіре тіло, зачат. кр.	$cn^+ b^+ vg cn b vg$	2	91	11,4
кінов.очі, чорн. тіло, норм. кр.	$cn b vg^+ cn b vg$		80	
			<b>Всього: 171</b>	
черв.очі, чорне тіло, норм. кр.	$cn^+ b vg^+ cn b vg$	3	68	8,2
кінов. очі, сіре тіло, зачат. кр.	$cn b^+ vg cn b vg$		56	
			<b>Всього: 124</b>	
черв. очі,чорне тіло, зачат. кр.	$cn^+ b vg cn b vg$	4	1	0,2
кінов. очі, сіре тіло, норм. кр.	$cn b^+ vg^+ cn b vg$		2	
			<b>Всього: 3</b>	
			<b>Разом: 1504</b>	<b>100,0</b>

7. Визначити відстань між генами в одиницях кросинговеру. Для цього:

1) проаналізувати розщеплення за генами  $cn - b$  (забарвлення очей – забарвлення тіла). Про наявність кросинговеру між цими генами свідчить поява в потомстві  $F_a$  мух з фенотипами: червоні очі – чорне тіло ( $cn^+ b$ ) та кіноварні очі – сіре тіло

( $cnb^+$ ). Це *третій* і *четвертий* клас (див. табл.). Визначаємо відстань між цими генами в одиницях кросинговеру:  $8,2\% + 0,2\% = 8,4\%$ .

2) аналогічно проаналізувати розщеплення за генами **b – vg**. Відстань між цими генами в одиницях кросинговеру дорівнює:  $b^+vg$  (11,4%) +  $bvg^+$  (8,2%) = 19,6% (*класи 2 і 3*).

3) аналогічно проаналізувати розщеплення між генами **cn – vg**. Відстань між цими генами в одиницях кросинговеру дорівнює:  $cn^+vg$  (11,4%) +  $cnvg^+$  (0,2%) = 11,6% (*класи 2 і 4*).

За розрахунками зрозуміло, що найвіддаленішими генами на хромосомі є гени **b – vg**, оскільки відсоток кросинговеру між ними найбільший – 19,6%.

Ген **cn** (cinnabar) знаходиться між генами **b** (black) і **vg** (vestigial). Отже, послідовність розміщення генів на хромосомі (групі зчеплення):  $b - cn - vg$ .

4) Визначити частоту подвійних кросоверів ( $bcn^+vg\ cnbvg$  та  $b^+cnvg^+cn\ bvg$ ). Вони трапляються з дуже малою частотою – 0,2% (*четвертий клас*, див. табл.). Оскільки розрив відбувся в двох точках хромосоми, частоту подвійних кросоверів слід подвоїти:  $0,2\% \times 2 = 0,4\%$ .

5) Визначити сумарну довжину ділянки генетичної карти, враховуючи відстань між генами та величину подвійного кросинговеру:

$$8,2\% + 11,4\% + 0,4\% = 20,0\%$$

6) Побудувати ділянку генетичної карти для трьох генів дрозофіли.

**Завдання 4.** Оволодіти принципами генетичного аналізу спадкування зчеплених генів, розв'язуючи задачі:

1) Гени *A*, *B* і *C* знаходяться в одній групі зчеплення. Між генами *A* і *B* кросинговер відбувається з частотою 7,4%, між генами *B* і *C* — з частотою 2,9%. Визначити взаємне розміщення генів *A*, *B* і *C*, якщо відстань між генами *A* і *C* дорівнює 4,5% кросинговеру.

2) Складіть карту хромосоми, що містить гени *A*, *B*, *C*, *D*, *E*, якщо частота кросинговеру між генами *B* і *C* дорівнює 2,5%, *C* і *A* — 3,7%, *A* і *E* — 6%, *E* і *D* — 2,8%, *A* і *B* — 6,2%, *B* і *D* - 15%, *A* і *D* — 8,8%.

3) Проведіть генетичний аналіз результатів аналізуючого схрещування три гетерозиготи  $AaBbCc$ :

<i>ABC</i> 71	<i>aBC</i> 18	<i>ABc</i> 3	<i>aBc</i> 11
<i>AbC</i> 14	<i>abC</i> 2	<i>Abc</i> 17	<i>abc</i> 64

Всього: 200.

Визначте генотип гетерозиготи. Якщо гени зчеплені, визначте відстань між ними і порядок їх положення в хромосомі.

4) У дрозофіли ген кіноварного забарвлення очей знаходиться в локусі 33, а ген розсіченого крила - в локусі 65 статевої хромосоми. Обидві ознаки - кіноварне забарвлення очей і розсічене крило - рецесивні. Гомозиготна самка з кіноварними очима і нормальними крилами схрещена з самцем з нормальним забарвленням очей і розсіченими крилами. Визначте генотипи та співвідношення фенотипів (за самками та самцями окремо) в  $F_1$  і  $F_2$ .

5) Визначте генотип тригетерозиготи із зазначенням порядку розташування генів у хромосомах за результатами її схрещування з гомозиготним рецесивом.

AaBbCc x aabbcc; Fa: ABC – 19; ABc – 40; AbC – 289; Abc – 150; aBC – 148; aBc – 291; abC – 37; abc – 21.

Для спрощення запис зигот Fa представлений без генів аналізатора, оскільки їх фенотип визначається типами і частотою гамет материнської форми.

**Приклади проведення генетичного аналізу спадкування зчеплених генів**

**Приклад 1:** Скласти карту хромосоми, що містить гени A, B, C, D, E, якщо частоти кросинговеру  $C|E = 10\%$ ,  $C|A = 1\%$ ,  $A|E = 9\%$ ,  $B|E = 6\%$ ,  $A|B = 3\%$ ,  $B|D = 2\%$ ,  $E|D = 4\%$ ,  $A|D = 5\%$ ,  $C|D = 6\%$ ,  $C|B = 4\%$ .

**Хід аналізу:**

Зобразимо ці дані для більшої наочності стовбцем:

$$C|E = 10\% \quad A|D = 5\%$$

$$C|A = 1\% \quad C|D = 6\%$$

$$A|E = 9\% \quad C|B = 4\%$$

$$B|E = 6\%$$

$$A|B = 3\%$$

$$A|B|D = 2\%$$

$$E|D = 4\%$$

1. Визначаємо крайні гени і наносимо їх на карту. Оскільки частота кросинговеру відображає відносну відстань між генами, то на більш дальній відстані один від одного розташовані гени C і E.
2. Ген A помістимо на відстані 1% від гена C. Це узгоджується з частотою його кросинговеру з геном E, що дорівнює 9%.
3. Ген B локалізуємо в точці, що знаходиться на хромосомі на відстані 6% від гена E. Це узгоджується з частотою його перехреста з геном A (3%).



4. Ген D знаходиться на відстані 2% від гена B і 4% від гена E, так що помістимо його праворуч від B. Це відповідає  $rf A|D$  і  $rf C|D$ . Проведена локалізація підтверджується правилом лінійного розташування генів у хромосомі: частота кросинговеру між двома генами дорівнює сумі або різниці частот кросинговеру між двома іншими генами ( $A|B = A|C \pm B|C$ ).

**Висновок:** карта хромосоми



з указанням відстані між генами;



з указанням локусів

**Приклад 2.** Визначте генотип тригетерозиготи із зазначенням порядку розташування генів у хромосомах за результатами її схрещування з гомозиготним рецесивом:

F<sub>1</sub>: AaBbCc x aabbcc

Fa :

ABC – 19

ABc – 40

AbC – 289



Abc – 150  
 aBC – 148  
 aBc – 291  
 abC – 37  
 abc – 21.

Для спрощення запису зигот F<sub>2</sub> представлені без генів аналізатора, оскільки їхній фенотип визначається типами і частотою гамет материнської форми.

**Хід аналізу:** Якщо б гени А, В, С були в різних парах хромосом, то F<sub>2</sub> дало б однакову чисельність всіх фенотипів (по 12,5%). Тут явне відхилення. Мабуть, гени знаходяться в одній парі (перевірка по двох парах генів теж підтверджує зчеплення). Батьківську форму попередньо можна представити так: авс авс. Материнська форма в хромосомному вигляді встановлюється за фенотипом некросоверних нащадків F<sub>2</sub>; їх кількість найбільша (289 і 291). Це сполучення генів AbC і aBc. Отже, тригетерогізота AaBbCc мала такий набір генів у хромосомах (гени AC – в цис -, гени AB і BC – в транс-положенні): АвС аВс. Всі інші нащадки виникли за участю кросоверних гамет материнської форми. Визначимо в кожному конкретному фенотипному класі, між якими генами сталася рекомбінація, яка призвела до нового поєднання ознак. Порівнюємо їх з AbC або aBc. Рекомбінацію (кросинговер) між генами позначаємо вертикальною рискою.

фенотипи	кросинговер
1. ABC – 19	A B, B C
2. ABc – 40	A B, A C
3. AbC – 289	некросоверні
4. Abc – 150	A C, B C
5. aBC – 148	A C, B C
6. aBc – 291	некросоверні
7. abC – 37	A B, A C
8. abc – 21	A B, B C

Оскільки кросинговер є реципрокним обміном, то однакові обміни дають приблизно однакові чисельності фенотипів, що виникли в аналізуючому схрещуванні;

A|B, B|C (1, 8 типи) – 19 та 21 нащадок;

A|B, A|C (2, 7 типи) – 40, 37 нащадків;

A|C, B|C – (4 і 5 типи) – 150, 148 нащадків.

Перевіривши правильність запису рекомбінацій, приступаємо до розрахунку rf між кожною парою генів. Це необхідно зробити, щоб визначити порядок розташування генів у хромосомі. Використовуючи rf як відстань між генами, ми зможемо їх розмістити в хромосомі, керуючись формулою A|C = A|B ± B|C. Розрахунок rf частоти кросинговеру проводимо за формулою:

$$rf = \frac{\text{кількість кросоверів}}{\text{загальна кількість особин у вибірці}} \times 100\%$$

загальна кількість особин у вибірці

$$rf A|B = 19 + 40 + 37 + 21 = 117 : 995 \times 100\% = 11,75\%$$

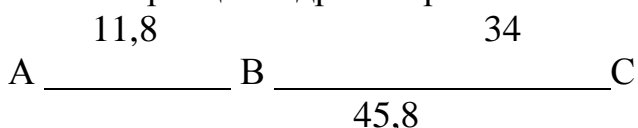
$$rf B|C = 19 + 150 + 148 + 21 = 338 : 995 \times 100\% = 33,97\%$$

$$rf A|C = 40 + 150 + 148 + 37 = 375 : 995 \times 100\% = 37,69\%$$

Найбільше значення rf виявлено між генами А і С, отже на ділянці генетичної карти вони розташовуються на кінцях, а ген В – всередині. Отже, попередній

запис вихідних форм в хромосомному вигляді виявився правильним:  $AbC \ aBc \times abc \ abc$ .

На генкарті цей відрізок хромосоми із зазначенням відстані виглядає так:



Відстань  $AC = 45,8\%$ , тобто більше, ніж розрахункове значення  $rf \ A|C$  ( $37,69\%$ ). При розрахунку  $rf \ A|C$  не враховувався подвійний кросинговер. Він не помітний внаслідок того, що хромосома за крайніми генами відновлює свій стан і фенотип за ним той самий, як і в некросоверів. Справжня відстань між крайніми генами дорівнює сумі  $rf$  між проміжними.

Фактичний подвійний кросинговер дорівнює сумі найменших фенотипових класів, поділеної на загальну кількість нащадків, тобто  $rf = 19 + 21 : 995 \times 100\% = 4,02\% \times 2 = 8,04\%$ .

$$37,7\% + 8,04\% = 45,74\%$$

Генотип вихідних форм:  $\text{♀ } AbC \ aBc \times \text{♂ } abc \ abc$ .

Додаткове питання до задачі: чи є інтерференція?

$$I = 1 - C, \text{ де } C = rf \text{ факт.} : rf \text{ теоретич.}$$

Фактичний подвійний кросинговер, як ми вже вияснили, дорівнює  $4,02\%$ .

Теоретичний подвійний перехрест – це добуток кросинговерів  $A|B \times B|C$ , тобто  $11,8\% \times 34\% = 4,01\%$ .

$$C = 4,02 : 4,01 = 1;$$

$$I = 1 - 1 = 0.$$

**Висновок:** інтерференція при виникненні подвійних перехрестів в даному досліді відсутня (тобто, пригнічення немає). Визначити частоту кросинговеру при зчепленні трьох генів у гібридів  $F_2$  можна, лише аналізуючи розщеплення окремо за кожною парою неалельних генів.

**Приклад 3.** У дрозофіли червоні очі, сіре тіло, довгі крила – домінантні ознаки. В результаті схрещування мух дрозофіли одержано потомство:

$\text{♂}$	$\text{♀}$
1) 75 – червоноокі з сірим тілом, нормальними крилами	1) 92 – червоноокі, сіре тіло, нормальні крила
2) 70 – білоокі з жовтим тілом, нормальними крилами	2) 75 – білоокі, жовте тіло, нормальні крила
3) 21 – білоокі, з жовтим тілом, короткими крилами	3) 20 – червоноокі, сіре тіло, короткі крила
4) 27 – червоноокі, з сірим тілом, короткими крилами	4) 28 – білоокі, жовте тіло, короткі крила
5) 2 – червоноокі, з жовтим тілом, нормальними крилами	
6) 1 – білоокі, з сірим тілом, короткими крилами	
$\Sigma = 196$	$\Sigma = 215$

Визначити: 1) як успадковуються ознаки: аутосомно чи зчеплено зі статтю?; 2) генотипи вихідних мух; 3) розрахувати частоту рекомбінації, якщо гени зчеплені.

**Хід аналізу:**

Позначимо гени, що контролюють ці ознаки:

A - червоні очі, a - білі

B - сіре тіло, b - жовте.

C - нормальні крила, c - короткі.

Це видно з умови задачі, а домінантність нормальних довгих крил підтверджується також розщепленням 3:1. Оскільки розщеплення за геном C дорівнює 3:1, можна зробити припущення, що у кожній статі обидва батьки за цим геном були гетерозиготними, ця ознака є аутосомною. Ознаки забарвлення очей і забарвлення тіла, мабуть, зчеплені зі статтю, оскільки розщеплення за ними в самців і самок різне: в самців – 6 фенотипів, у самок – 4. Зобразимо потомство за допомогою буквенної символіки (ген C знаходиться в аутосомі, так що в самця він теж буде в подвійній дозі):

♂	♀
1. 75 – ABC-Y	92 – A-B-C-
2. 70 – abC-Y	75 – aabbC-
3. 21 – abccY	20 – A-B-cc
4. 27 – ABccY	28 – aabbcc
5. 2 – AbC-Y	
6. 1 – aBccY	
$\Sigma = 215$	$\Sigma = 196$

Фенотип самців відображають гамети матері, тому що вони містять X-хромосому матері та Y-хромосому батька. Частота різних типів зигот самців визначається частотою кросоверних і некросоверних гамет материнської форми. Роль аналізатора тут відіграє Y-хромосома. Некросоверні хромосоми є у фенотипів №№ 1, 2, 3, 4 (їх більше). Це X-хромосоми з генами AB і ab. Відповідно кросоверні - Ab і aB - у 5 і 6 фенотипів. Визначаємо частоту перехреста  $rf (A|B) = 3:196 \times 100\% = 1,5\%$ .

Генотип вихідної материнської форми:  $\underline{AB} \quad \underline{C}$ , тобто гени A і B ввійшли в схрещування в цис-положенні.  $\underline{ab} \quad \underline{c}$

Генотип батьківської форми можна визначити за генотипом їх дочок. Серед них є рецесивні гомозиготи (aa bb), один алель «a» надійшов від матері, інший – від батька. Те ж саме за геном «b». Отже, батько за цими генами був рецесивною гемізиготою.

Його генотип  $X^{ab}YCc$ .

**Висновок:** 1) ознаки забарвлення очей і тіла зчеплені зі статтю, форма крил успадковується як аутосомна ознака; 2) генотипи батьків  $\text{♀ } X^{AB}X^{ab}Cc$   $\text{♂ } X^{ab}Y$ ; 3)  $rf = 1,5\%$ . На генетичній карті дрозофіли гени забарвлення тіла та забарвлення очей знаходяться в I (X) хромосомі в локусах 0 і 1,5 і позначені символами у (yellow) та w (white), ген коротких крил розміщений у II групі зчеплення в локусі 67 та позначений символом vg (vestigial).

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке група зчеплення?
2. У чому сутність явища зчеплення генів і в чому його причини?
3. Навести кількість груп зчеплення у різних видів рослин і тварин.
4. Як успадковуються ознаки при повному та неповному зчепленні?
5. Від чого залежить частота кросинговеру?

6. Чи завжди перехрест хромосом призводить до генетичної рекомбінації?
7. Як виникла теорія лінійного розміщення генів на хромосомі? Як визначити відстань між генами?
8. Що таке генетична карта хромосом еукаріотів? Чим вона відрізняється від цитологічної? Як її можна використовувати?
9. Як була цитологічно доведена правильність карти хромосом, складеної на основі визначення частоти кросинговеру між зчепленими генами?
10. У чому сутність хромосомної теорії спадковості?

### РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ

Генетична інформація всіх клітинних організмів закодована в послідовності нуклеотидів дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК). Фенотипічні ознаки будь-якого організму проявляються в різноманітності та кількості білків і рибонуклеїнової кислоти (РНК), що кодуються ДНК. На відміну від ДНК, РНК одониткові, лише у деяких РНК-містких вірусів молекули РНК – двониткові. Реалізація генетичної інформації, закодованої в молекулі ДНК, починається переписуванням послідовності нуклеотидів певної ділянки ДНК гена в послідовність нуклеотидів молекули РНК. Цей процес називають *транскрипцією*. Надалі ця молекула РНК або бере участь у синтезі певного білка (*трансляції*), або сама виконує певні фізіологічні функції.

У 1956 р. Френсіс Крик, один з авторів моделі вторинної структури ДНК, сформулював процес реалізації генетичної інформації як «центральну догму» молекулярної біології:

#### Реплікація



**Центральна догма молекулярної біології** – встановлене в результаті фундаментальних біохімічних досліджень основне положення теорії спадковості, згідно з яким потік генетичної інформації (з урахуванням зворотної транскрипції) відбувається в напрямку ДНК → РНК → білок (реакція матричного синтезу). Стрілкою показаний напрямок переносу генетичної інформації. Стрілка між ДНК і РНК показує, що всі молекули РНК в клітині сформовані на ДНК-матриці. Відповідно синтез усіх білків визначений молекулами РНК. У деяких випадках РНК може служити матрицею для синтезу ДНК. Цей процес називається *зворотною транскрипцією*. Білок не використовується для синтезу нуклеїнових кислот.

ДНК, виділені з різних організмів, відрізняються за сумарним нуклеотидним складом. Але Чаргафф показав, що існують певні загальні закономірності в сумарному нуклеотидному складі. Ці кількісні правила, підтверджені величезним фактичним матеріалом, одержали назву **правила Чаргаффа**:

1) в будь-яких молекулах ДНК сума пуринових основ дорівнює сумі піримідинових основ:  $A + G$  (пурини) =  $T + C$  (піримідини);

2) внаслідок комплементарності азотистих основ в молекулі ДНК молярна маса аденіну дорівнює молярній масі тиміну:  $A = T$  або  $A:T = 1$ . Так само молярна маса цитозину дорівнює молярній масі гуаніну:  $C = G$ , або  $C:G = 1$ . Отже, нуклеотидний склад ДНК різних видів організмів може варіювати тільки по відношенню до сум комплементарних азотистих основ.

3) кожний біологічний вид характеризується специфічним нуклеотидним складом ДНК, тобто співвідношенням  $A+T:G+C$ , що називається **коефіцієнтом видової специфічності**. В деяких ДНК сумарна кількість аденіну та тиміну перевищує сумарний вміст гуаніну та цитозину, тобто коефіцієнт видової специфічності більше одиниці. Це так звані **A-T-тип** ДНК, він переважає в усіх хребетних і безхребетних тварин, у вищих рослин. Коефіцієнт специфічності, що відображає коливання нуклеотидного складу ДНК різного походження, у вищих рослин змінюється в межах від 1,1 до 1,7, у тварин – від 1,2 до 1,85.

В інших ДНК навпаки, вміст гуаніну та цитозину більше суми аденіну та тиміну, тобто коефіцієнт специфічності менше одиниці - **G-C-тип**. Крім того, існують ДНК, що містять приблизно рівні кількості чотирьох азотистих основ (наприклад, ДНК *E.coli*). У мікроорганізмів можливі як AT-, так і GC – типи ДНК. У мікроорганізмів сумарний нуклеотидний склад коливається значно сильніше, коефіцієнт специфічності варіює від 0,45 до 2,8.

Індивідуальні ДНК того ж самого організму також гетерогенні за нуклеотидним складом. Так, коефіцієнт специфічності різних молекул ДНК із зобної залози теля варіює в межах від 0,9 до 2,0.

За функціями гени поділяють на **структурні, регуляторні, промотори** та **оператори**. Структурні гени обумовлюють синтез ферментів, які беруть участь у біохімічних реакціях і формуванні клітинних структур. Гени-регулятори відповідальні за синтез білків, що регулюють обмін речовин. Ці гени можуть впливати на діяльність структурних генів. Гени-промотори детермінують початок транскрипції. Вони являють собою ділянку ДНК, що розпізнає ДНК-залежну РНК-полімеразу. Гени-оператори є посередниками між структурними генами, промоторною областю і генами-регуляторами.

При виконанні розрахунків слід пам'ятати такі константні величини:

$M_r$  (середня) нуклеотиду = 300 або 345 а.о.м. (за різними даними).

$M_r$  (середня) амінокислоти = 100 а.о.м.

Відстань між двома сусідніми нуклеотидами ( $\Delta l$ ) = 0,34 нм; 1 нанометр (нм) =  $10^{-9}$  м.

Відстань між амінокислотами  $\Delta R$  (АК) = 0,35 нм.

Довжина гена ( $L$ ) =  $\Delta l_{\text{нукл.}} \times (N_{\text{нукл.}} - 1)$ , де  $N$  – загальна кількість нуклеотидів.

Час однієї операції трансляції =  $1/5$  або  $1/6$  сек = 0,2 секунди.

Швидкість елонгації (ріст ланцюгу і-РНК) = 50 нуклеотидів за секунду.

Екзони – кодуючі ділянки гена, інтрони – некодуючі ділянки.

Транскрипція (переписування інформації з гена на і-РНК) завжди йде тільки на одному (матричному) ланцюзі ДНК у напрямку від 5' до 3' через пентози розміщених поруч нуклеотидів.

Редуплікація (реплікація) ДНК відбувається в напрямку від 3' до 5' положення цукру в дезоксирибозі.

## Лабораторна робота № 11

### Особливості організації геномів вірусів, прокариотів, еукаріотів. Код ДНК та РНК, його реалізація під час трансляції

**Мета роботи:** ознайомитися з особливостями структурно-функціональної організації геному вірусів, прокариот, еукаріот; особливостями генетичного коду та закономірностями його реалізації під час трансляції, екзонно-інтронною організацією геному еукаріот; навчитися розв'язувати типові задачі з молекулярної генетики.

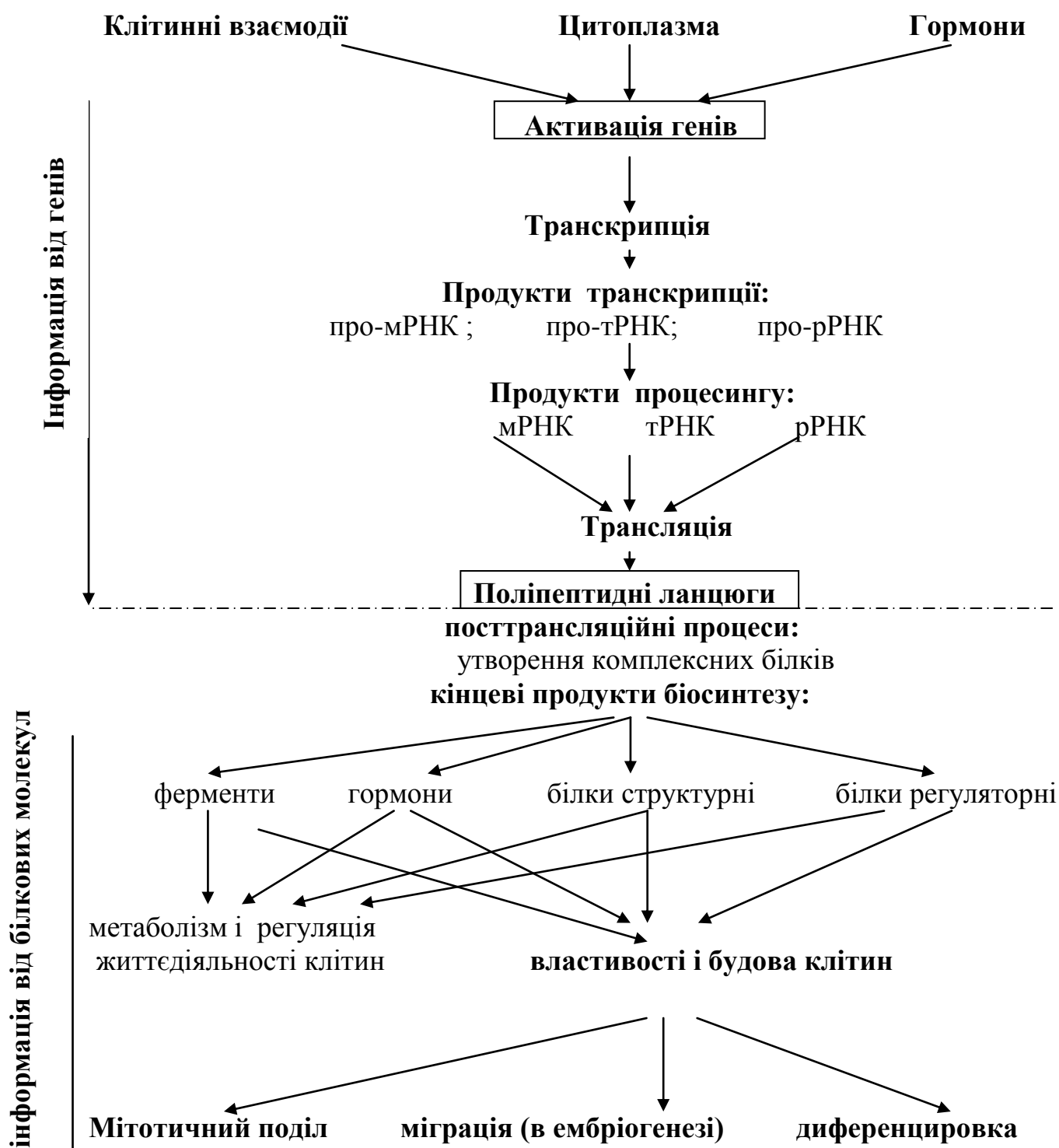
**Завдання 1.** Навести порівняльну характеристику геному вірусів, прокариот, еукаріот, заповнивши таблицю:

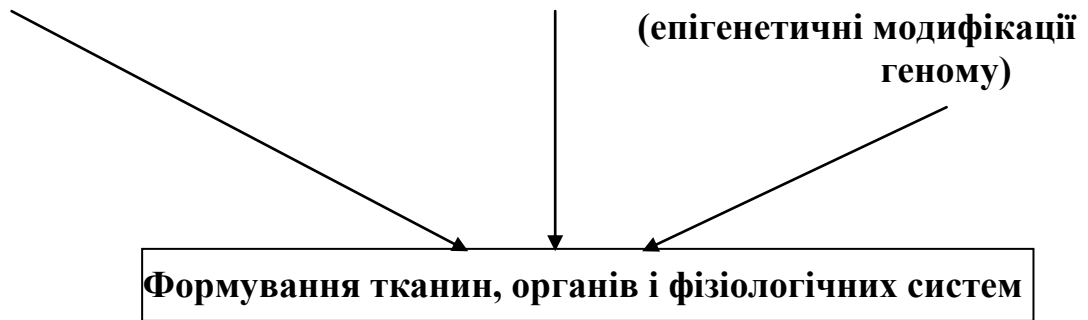
Особливості геному:	віруси	Прокариоти	Еукаріоти
розміри			
види нуклеїнових кислот			
наявність оперонів			
надлишковість			
структура оперону			
наявність інтронів і екзонів			
наявність процесингу			
тип і спосіб реплікації			
економічність			
спосіб регуляції транскрипції			

**Завдання 2.** Розглянути та замалювати в зошит структурно-логічні схеми, що ілюструють етапи реалізації спадкової інформації у клітині (рис. 3.1) і шлях передачі спадкової інформації від ДНК до формування ознак організму людини (рис. 3.2).

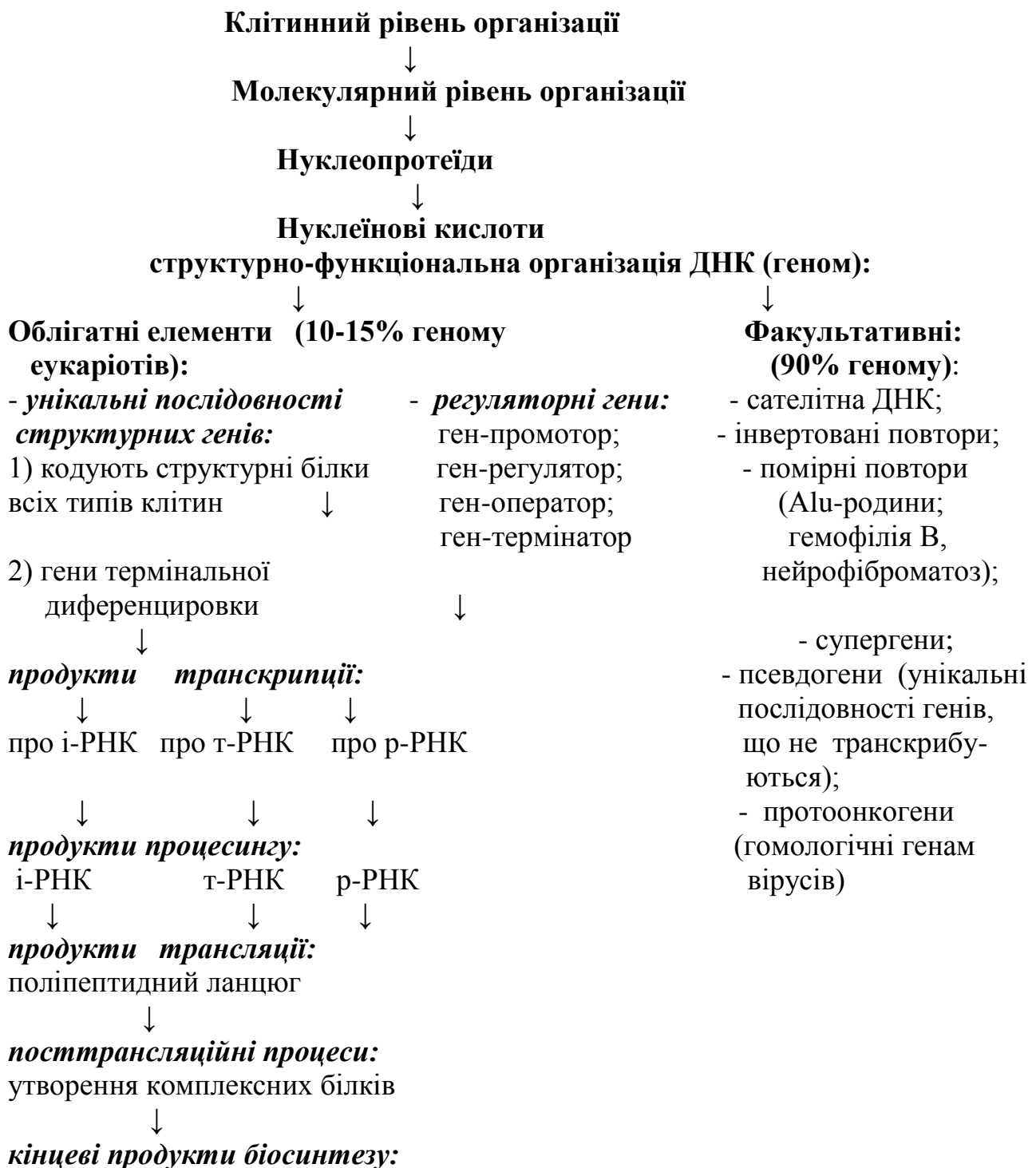
**Завдання 3.** Дати порівняльну характеристику нуклеїновим кислотам, заповнивши таблицю:

	ДНК	м-РНК	т-РНК	р-РНК
Пуринові азотисті основи (назви, символи)				
Пиримідинові азотисті основи (назви, символи)				
Пентози				
Основна локалізація в клітині				
Головна функція				





**Рис. 3.1.** - Етапи реалізації спадкової інформації у клітині





↓            ↓            ↓            ↓  
ферменти    гормони    білки структурні    білки регуляторні

↓  
**Функція продуктів біосинтезу:**

метаболізм, регуляція життєдіяльності клітин

↓  
**Зовнішній прояв функцій продуктів біосинтезу:**

- утворення клітин з різними ознаками;
- формування різних типів тканин;
- формування різних органів та фізіологічних систем організму
- 

**Рис. 3.2.** - Шлях передачі спадкової інформації від ДНК до формування ознак організму людини

**Завдання 4.** 1) Навести особливості генетичного коду та закономірності його реалізації під час трансляції. Розв'язати задачу:

1. За даними біохімічного аналізу, 22% загальної кількості нуклеотидів і-РНК припадає на аденілові, 12% - на уридиллові, 26% - на гуанілові азотисті основи. Визначити нуклеотидний склад ДНК, з якої транскрибована ця і-РНК.

2. Первинна структура більшості білків еукаріотів починається з метіоніну, який пізніше, як правило, відокремлюється. Як називається кодон, що стоїть на початку структурного гена і кодує метіонін? Яка послідовність азотистих основ у ньому? Укажіть напрямок транскрипції і трансляції цих триплетів. Визначити нуклеотидний склад антикодону Met т-РНК.

3. Фрагмент молекули адренкортикотропного гормону передньої частки гіпофізу має будову: сер – тир – сер – мет. Визначити черговість антикодонів т-РНК, які беруть участь у біосинтезі цього фрагмента.

4. Молекулярна маса одного з ланцюгів ДНК – 119 025 а.о.м. Визначити кількість мономерів білка, закодованого в ланцюзі ДНК. Скільки часу потрібно для трансляції?

5. Відносна молекулярна маса білка – 100 000, молекулярна маса однієї амінокислоти (АК) – 100. Визначити довжину відповідного гена, що кодує поліпептидний ланцюг (відстань між двома нуклеотидами - 0,34 нм).

6. Фрагмент молекули ДНК містить 440 гуанілових нуклеотидів, що становить 22% загальної кількості. Визначити масу цього фрагмента ДНК, якщо молекулярна маса одного нуклеотиду становить 345 а.о.м. Визначити довжину та молекулярну масу м-РНК, яка є транскрипційною копією цього фрагмента.

7. Молекула білка має 280 амінокислотних залишків. Визначити довжину і масу гена, що кодує білкову молекулу. Скільки часу триватиме біосинтез цієї білкової молекули?

8. Скільки амінокислотних залишків (у середньому) містить білкова молекула, якщо у фрагменті ДНК розміром 10 200 нм закодовано 20 білкових молекул?

9. Скільки нуклеотидів містить ген, в якому закодовано первинну структуру білка, що складається з 145 амінокислотних залишків? Яка молекулярна маса і довжина цього гена?

10. У вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) носієм генетичної інформації є одноланцюгова молекула РНК, що виконує функцію ДНК і складається з 6500

нуклеотидів. Одна білкова молекула ВТМ складається з 158 амінокислотних залишків. Визначити:

- а) довжину гена, що кодує первинну структуру цієї білкової молекули;
- б) що має більшу масу і в скільки разів: молекула білка ВТМ чи відповідний ген? (відносна молекулярна маса одного нуклеотиду – 345, амінокислоти – 100);
- в) скільки видів білкових молекул (якщо кожний складається з 200 мономерів) закодовано в РНК ВТМ?
- г) який білок – тютюновий чи вірусний – синтезується в рибосомі тютюну, зараженого РНК вірусом?

11. Бактерія кишкова паличка (*E.coli*) містить одну молекулу ДНК з молекулярною масою  $2 \times 10^9$ , а бактеріофаг, що паразитує у кишковій паличці, містить одну молекулу ДНК з масою  $3 \times 10^7$ .

- а) скільки видів білкових молекул може бути закодовано в ДНК бактерії, якщо припустити, що типова білкова молекула складається з 200 мономерів? Скільки видів білкових молекул закодовано в ДНК фага?
- б) що має більшу масу і в скільки разів – одна молекула білка (складається з 200 мономерів) бактерії чи ген, що її кодує?
- в) чому ДНК бактерії довше за ДНК фага? У скільки разів?
- г) порівняти довжину молекули ДНК бактерії з довжиною всієї бактеріальної клітини (1 мкм). У скільки разів ДНК довше за саму клітину? Як така ДНК може вміститися у клітині?

12. Визначити співвідношення (А+Т/Г+Ц), довжину і масу фрагмента молекули ДНК, який кодує поліпептид лей – іле – мет – ала – сер – три – гіс – глі – тир. Скільки часу триватиме синтез поліпептиду на рибосомі?

13. Збудник СНІДу – ВІЛ – ретровірус, спадкова інформація якого міститься в РНК, що складається з 9 213 нуклеотидів. Ця РНК містить 7 генів: 3 структурних і 4 – регуляторних. 1) Перелічити основні етапи реалізації спадкової інформації, закодованої в РНК ВІЛ. 2) Укажіть основні ферменти, які каталізують ці етапи. 3) Визначте молекулярну масу регуляторних генів, якщо на структурні гени ВІЛ припадає 4 000 нуклеотидів. 4) Визначте сумарну молекулярну масу білкових молекул, закодованих у геномі вірусу.

2) Оволодіти логікою молекулярно-генетичного аналізу на основі наведених нижче прикладів:

**Приклад 1.** У фрагменті ланцюга молекули ДНК нуклеотиди розміщені у такій послідовності: ТТГ АГЦ АЦГ ГТА ААТ ЦГА. Якою буде послідовність нуклеотидів у протилежному ланцюзі цієї ж ДНК? Визначте довжину фрагмента та його масу (Відстань між нуклеотидами – 0,34 нм, молекулярна маса нуклеотида – 345 а.о.м.).

**Хід аналізу:** 1) Визначаємо за принципом комплементарності послідовність розміщення нуклеотидів у протилежному ланцюзі фрагмента ДНК:

ТТГ АГЦ АЦГ ГТА ААТ ЦГА  
ААЦ ТЦГ ТГЦ ЦАТ ТТА ГЦТ

2) Визначаємо довжину фрагмента ДНК. Оскільки довжина дволанцюгового фрагмента дорівнює довжині одноланцюгового (останній містить 18 нуклеотидів:

6 триплетів x 3 нуклеотиди), то довжина фрагмента дорівнює  $0,34 \text{ нм} \times 18 = 6,12 \text{ нм}$ .

3) Молекулярна маса фрагмента ДНК визначається з урахуванням кількості нуклеотидів в обох ланцюгах молекули. Тому вона становить:  $345 \text{ а.о.м.} \times (18 \times 2) = 12\,420 \text{ а.о.м.}$

**Висновок:** послідовність нуклеотидів у протилежному ланцюзі цієї ж ДНК: ААЦ ТЦГ ТГЦ ЦАТ ТТА ГЦТ. Довжина фрагмента ДНК – 6,12 нм, його маса – 12 420 а.о.м.

**Приклад 2.** Визначте молекулярну масу і довжину гена, якщо у ньому закодована молекула поліпептиду з молекулярною масою 28 000 а.о.м. Що має більшу масу і в скільки разів – білок чи ген, який його кодує? (Молекулярна маса однієї амінокислоти дорівнює 100 а.о.м., одного нуклеотиду – 345 а.о.м., відстань між сусідніми нуклеотидами – 0,34 нм).

**Хід аналізу:** 1) Визначаємо кількість амінокислот, що входить до складу молекули поліпептида:  $N(\text{АК}) = 28\,000 \text{ а.о.м.} : 100 \text{ а.о.м.} = 280$ .

2) Ця молекула поліпептиду кодується одним з ланцюгів фрагмента ДНК (тобто гена), який служить транскрипційною матрицею. Визначаємо, скільки нуклеотидів містить цей фрагмент, при цьому враховуємо, що одну амінокислоту кодує один триплет (три нуклеотиди). Отже, кількість нуклеотидів, що кодує цей поліпептид, складає:  $N(\text{нукл.}) = 280 \times 3 = 840$ .

3) Ген – дволанцюговий фрагмент ДНК. Визначаємо молекулярну масу гена, що кодує цей поліпептидний ланцюг:  $M_r(\text{гена}) = 345 \text{ а.о.м.} \times 840 \times 2 = 579\,600 \text{ а.о.м.}$

4) Довжина гена завжди дорівнює довжині одного з ланцюгів фрагмента ДНК. Визначаємо довжину гена:  $L(\text{гена}) = 0,34 \text{ нм} \times (840 - 1) = 285,26 \text{ нм}$ .

5) Порівнюємо масу гена і масу поліпептиду:  $M_r(\text{гена}) : M_r(\text{поліпептиду}) = 579\,600 \text{ а.о.м.} : 28\,000 \text{ а.о.м.} = 20,7$  (разів). Отже, ген у 20,7 разів важчий за білок, який він кодує.

**Висновок:** молекулярна маса гена становить 579 600 а.о.м.; його довжина – 285,26 нм; ген у 20,7 разів важчий за поліпептид, який він кодує.

**Пояснення до завдання 4.** Правила перекладу послідовності нуклеотидів в амінокислотну послідовність - **генетичний код** - розшифровані в кінці 60-х років минулого століття (**рис. 3.3**). Триплет нуклеотидів (кодон) визначає включення однієї певної амінокислоти в поліпептидний ланцюг під час біосинтезу білка.

*Особливості генетичного коду:*

- всі амінокислоти, крім двох - метіоніну (AUG) та триптофану(UGG), кодуються більш ніж одним кодоном;
- сигналом зупинки синтезу білка служать 3 кодони: **UAA, UAG, UGA** (стоп-кодони);
- кодон **AUG** є стартовим кодоном і кодує амінокислоту метіонін;
- при заміні нуклеотидів у кодоні в білок включається споріднена амінокислота;
- в кодонах, які кодують ту ж саму амінокислоту, найчастіше варіює третій нуклеотид.

**Завдання 5.** 1) Визначити особливості функціонування оперону прокаріот. 2) Навести особливості екзонно-інтронної організації геному еукаріот. 3) Зіставити особливості функціонування оперону прокаріот і еукаріот, визначити риси

відмінності. 4) Оволодіти принципами молекулярно-генетичного аналізу функціонування мозаїчної структури генів еукаріот на конкретному прикладі (див. Приклад). 5) Закріпити знання під час розв'язання задач:

1. Оперон (сукупність структурних генів і гена-оператора) містить 10 800 нуклеотидів. У ньому закодовано три поліпептидних ланцюги, кожен з яких складається з 560 амінокислотних залишків. Визначте молекулярну масу та довжину гена-оператора.

2. Структурний ген містить 384 цитидилових нуклеотиди, що становить 20% їхньої загальної кількості. В екзонних ділянках цього гена закодований білок, який складається з 120 амінокислотних залишків. Визначити нуклеотидний склад гена. Яка молекулярна маса інтронних ділянок гена? Наскільки зріла і-РНК коротша за проі-РНК?

	U	C	A	G	
U	UUU } Феніл-аланін F UUC } UUA } Лейцин L UUG }	UCU } Серин S UCC } UCA } UCG }	UAU } Тирозин Y UAC } UAA } Стоп-кодон UAG } Стоп-кодон	UGU } Цистеїн C UGC } UGA } Стоп-кодон UGG } Триптофан W	U C A G
C	CUU } Лейцин L CUC } CUA } CUG }	CCU } Пролін P CCC } CCA } CCG }	CAU } Гистидин H CAC } CAA } Глутамін Q CAG }	CGU } Аргинін R CGC } CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ізолейцин I AUC } AUA } AUG } Метионін старт-кодон M	ACU } Треонін T ACC } ACA } ACG }	AAU } Аспарагін N AAC } AAA } Лизин K AAG }	AGU } Серин S AGC } AGA } Аргинін R AGG }	U C A G
G	GUU } Валин V GUC } GUA } GUG }	GCU } Аланін A GCC } GCA } GCG }	GAU } Аспараги- новая кислота D GAC } GAA } Глутами- новая кислота E GAG }	GGU } Глицин G GGC } GGA } GGG }	U C A G

Рис. 3.3. – Генетичний код ДНК

3. Як відомо, ІХ фактор зсідання крові – антигемофільний білок, що складається з 415 амінокислотних залишків. Локус гена, який кодує цей білок, міститься в одній з аутосом. Скільки нуклеотидів міститься в інтронах цього гена, якщо маса гена дорівнює 1 431 750 а.о.м.? Як називається хвороба, спричинена мутацією даного гена?

4. Молекула про-мРНК складається з 900 нуклеотидів, причому на інтронні ділянки припадає 300 нуклеотидів. Яку кількість амінокислотних залишків містить поліпептид, закодований відповідною мРНК? Визначте довжину і масу молекули мРНК, яка братиме участь у трансляції.

5. У молекулі про-мРНК на інтронні ділянки припадає 800 нуклеотидів. Визначити молекулярну масу і довжину структурного гена, якщо в ньому закодовано поліпептид, маса якого становить 20 000 а.о.м.

6. Оперон містить 10 800 нуклеотидів. У ньому закодовано три поліпептидні ланцюги, кожен з яких складається з 360 амінокислотних залишків. На інтронні ділянки структурних генів припадає 3 600 нуклеотидів. Визначити лінійні розміри та молекулярну масу гена-оператора.

7. Оперон містить 9300 нуклеотидів. У ньому закодовано три поліпептидні ланцюги, кожен з яких складається з 250 амінокислотних залишків. Молекулярна маса інтронних фрагментів така ж сама, як і екзонних. Визначити лінійні розміри гена-оператора.

8. Ген курячого овальбуміну містить 7 екзонних ділянок, приблизна довжина яких: 185-189, 45-53, 129-134, 116-119, 140-144, 152-158, 1030-1034 нуклеотидних пар. Скільки амінокислотних залишків входить до складу курячого овальбуміну?

**Приклад.** Структурний ген містить 384 цитидилових нуклеотиди, що становить 20% їхньої загальної кількості. В екзонних ділянках цього гена закодовано білок, який складається з 120 амінокислотних залишків. 1) Визначте нуклеотидний склад гена. 2) Яка молекулярна маса інтронних ділянок гена? 3) Наскільки зріла і-РНК коротша за про-і-РНК?

**Хід аналізу:** 1) Визначаємо загальну кількість нуклеотидів у складі фрагменту ДНК (гена):

$$384 - 20 \%$$

$$x - 100 \%$$

$$x = 38400 : 20 = 1920 \text{ (нуклеотидів).}$$

2) Визначаємо нуклеотидний склад гена. За принципом комплементарності, кількість гуанілових нуклеотидів дорівнює кількості цитидилових; їх сума становить:  $384 + 384 = 768$ . Тоді кількість аденілових нуклеотидів дорівнюватиме кількості тимідилових і складатиме:  $n(A) = n(T) = 1920 - 768 = 1152 : 2 = 576$  (нукл.)

3) Знаходимо кількість нуклеотидів у екзонних ділянках гена:

$$N(\text{екзонів}) = n(АК) \times 3 \text{ (нукл.)} \times 2 \text{ (ланцюги)} = 120 \times 3 \times 2 = 720 \text{ (нуклеотидів)}$$

4) Знаходимо кількість нуклеотидів в інтронних ділянках гена:

$$N(\text{інтронів}) = 1920 - 720 = 1200 \text{ (нуклеотидів)}$$

5) Визначаємо молекулярну масу інтронних ділянок:  $M_r(\text{інтронів}) = 345 \times 1200 = 414\,000$  (а.о.м.)

6) Визначаємо довжину про-мРНК. Вона дорівнює довжині структурного гена. Загальна кількість нуклеотидів у складі структурного гена в обох ланцюгах ДНК складає 1920. Тоді в одному ланцюзі –  $1920 : 2 = 960$  (нукл.)

$$L(\text{про-мРНК}) = 0,34 \times 960 = 326,4 \text{ (нм)}$$

7) Визначаємо довжину зрілої мРНК. Остання складається лише з екзонів, отже, в одному ланцюзі міститься  $720 : 2 = 360$  нуклеотидів.

$$L(\text{і-РНК}) = 0,34 \text{ нм} \times 360 = 122,4 \text{ нм}$$

8) Визначаємо різницю в довжині про-мРНК та мРНК:  $326,4 - 122,4 = 204$  (нм)

**Висновок:** а)  $n(G) = n(C) = 384$ ;  $n(A) = n(T) = 576$ ;  $M_r(\text{інтронів}) = 414\,000$  (а.о.м.); зріла мРНК коротша за про-мРНК на 204 нм.

## ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке «центральна догма» біології? Як відбувається процес реалізації генетичної інформації?

2. In vitro вдається синтезувати білок, використовуючи для цього готові, вилучені з клітин організмів компоненти (м-РНК, рибосоми, амінокислоти, АТФ, ферменти). Який – овечий чи кролячий – білок буде синтезуватися, якщо для штучного синтезу взяті рибосоми кроля, а і-РНК – з клітин вівці? Чому?

3. Опишіть будову та властивості молекули ДНК.
4. Вкажіть відмінності будови молекул РНК і ДНК.
5. Опишіть процес транскрипції у прокариот. Наведіть ферменти транскрипції.
6. Навести етапи транскрипції. Опишіть структуру промотору в прокариот.
7. Вміст гуаніну в дволанцюжковій молекулі ДНК становить 28%. Визначте процентний вміст всіх нуклеотидів. Дайте відповідь на те ж саме запитання, але для дволанцюгової РНК.
8. П'ять молекул ДНК мають такі температури плавлення: 73°C, 69°C, 84°C, 78°C, 82°C. Розставте ці молекули по мірі збільшення вмісту пар G-C.
9. Зробіть висновок про будову наступних нуклеїнових кислот: ДНК чи РНК, дволанцюгова чи одноланцюгова:

молекула	азотисті основи (%)				
	аденін (A)	гуанін (G)	тимін (T)	цитозин (C)	урацил (U)
1	33	17	33	17	0
2	33	33	17	17	0
3	26	24	0	24	26
4	21	40	21	18	0
5	15	40	0	30	15
6	30	20	15	20	15

## Лабораторна робота № 12

### Методи молекулярно-генетичного аналізу ДНК

**Мета роботи:** оволодіти принципами та сучасними методами геномного аналізу ДНК.

**Молекулярно-генетичні методи** - це різноманітна група методів, призначених для виявлення варіацій (мутацій) в структурі гена або в ділянці хромосоми. У практику ввійшли з 70-80-х років ХХ століття. Молекулярно-генетичні методи використовуються для вивчення генома, структури та функції генів, послідовності нуклеотидів в гені, генних мутацій. За допомогою аналізу ДНК можна виявити патологічні гени, діагностувати хвороби, визначити захворювання пренатально, виявити гетерозиготне носійство. Вихідним етапом всіх молекулярно-генетичних досліджень є отримання ДНК. Хромосомну ДНК можна виділити з будь-яких ядерних клітин. У людини найчастіше з цією метою використовують лейкоцити крові. Отримання ДНК включає декілька етапів: швидкий лізис клітин, видалення фрагментів клітинних органел, ферментативне руйнування і екстрагування білків, осадження молекул ДНК в етанолі з подальшою їх концентрацією в буферному розчині. До найважливіших методів молекулярної генетики, що лежать в основі геномних технологій і ДНК-діагностики, відносяться: **рестрикція ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гібридизація з ДНК-зондами, клонування, секвенування.**

**Завдання 1.** Розглянути методи аналізу геномної ДНК, можливості кожного методу. Переписати в зошит таблицю:

Метод аналізу ДНК	Мета та можливості методу
Хімічний синтез ДНК	Одержання ДНК за допомогою ДНК-синтезаторів. Результат – олігонуклеотиди (одноланцюгові)

	молекули), що використовуються як ДНК-зонди, праймери для ампліфікації нуклеотидних послідовностей, фрагментів для синтезу генів
Рестрикція	Одержання фрагментів ДНК за допомогою рестиктаз. Побудова рестрикційних карт хромосом
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	Створення численних копій фрагменту ДНК, вивчення фрагменту з метою виявлення мутацій
Гібридизація з ДНК-зондами	Визначення за допомогою ДНК-зондів специфічних нуклеотидних послідовностей ДНК, виявлення положення гена, діагностика генних хвороб

## Завдання 2.

1) Охарактеризувати класи рестриктаз і принцип їх дії. Занотувати в зошит найпоширеніші рестриктази, що використовуються в генно-інженерних роботах, сайти розпізнавання рестриктазами та місце розрізання молекули ДНК:

№ п\п	Рестиктаза	Сайти розпізнавання та місце розрізання молекули ДНК
1.	Hae III	5'GG ↓ CC3' 3'CC ↑ GG5'
2.	Bam HI	5'G↓GATCC3' 3'CCTAG↑C5'
3.	EcoRI	5'G↓AATTC3' 3'CTTAA↑G5'
4.	Hind III	5'A↓AGCTT3' 3'TTCGA↑A5'
5.	Sma I	5'CCC↓GGG3' 3'GGG↑CCC5'
6.	Hpa II	5'C↓CGG3' 3'GGC↑C5'

2) Провести рестрикцію продуктів ПЛР.

### *Протокол рестрикції:*

1. Змішати в пробірці наступні компоненти:

- продукт полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (8 мкл);
- буфер для рестрикції (10X) (1,5 мкл);
- дистильована вода (5,5 мкл).

2. Перемішати компоненти та додати 5 од. рестриктази (0,5 мкл).

3. Покрити суміш мінеральною олією з метою запобігання випаровуванню.

4. Пипетирувати суміш та інкубувати пробірку в термостаті при **65<sup>0</sup>С** протягом **чотирьох** годин.



5. Провести електрофорез продуктів рестрикції, для чого додати до суміші для рестрикції 3 мкл барвника для електрофорезу та внести зразки в гель.

3) Користуючись даними таблиці, де вказані сайти розпізнавання рестриктазами, розв'язати задачі:

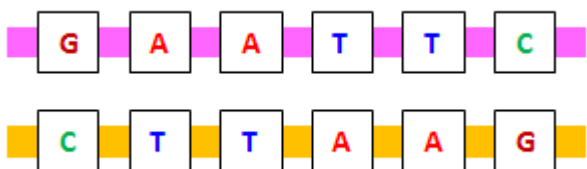
1. Рестриктаза *Hind* III розрізає ДНК по послідовності AAGCTT. Визначити середню довжину фрагментів розрізаної ДНК.
2. Гаплоїдний геном людини містить  $3 \times 10^9$  пар нуклеотидів (п.н.) ДНК. Якщо розрізати ДНК рестриктазою *Eco*RI, яка впізнає гексамер GAATTC, то скільки різних рестрикційних фрагментів буде одержано?
3. Якщо нуклеотидна послідовність у ДНК розподілена випадково, то якою буде середня довжина фрагмента при розрізанні рестриктазами, які «впізнають» послідовність з 8 нуклеотидів?

**Пояснення до завдання 2. Рестриктази (рестрикуючі ендонуклеази, ендонуклеази рестрикції)** – бактеріальні ферменти, які впізнають певні послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК (сайти рестрикції) і розрізають її всередині цієї послідовності. Рестрикцію фрагментів ДНК проводять у пробірці в спеціальному сольовому буфері, специфічному для кожної рестриктази. Рестриктази розщеплюють фосфодиефірні зв'язки між нуклеотидами.

Ще в 1953 році було виявлено, що ДНК певного штаму *E. coli*, введена в клітини іншого штаму не виявляє генетичної активності, оскільки швидко розщеплюється на дрібні фрагменти. У 1966 році було показано, що це явище пов'язане зі специфічною модифікацією хазяйської ДНК - вона містить декілька метильованих азотистих основ, відсутніх у немодифікованій ДНК, причому метилювання (додавання до основи метильної групи) відбувається вже після завершення реплікації. Рестриктаза здатна відрізнити свою власну ДНК від будь-якої «чужорідної» саме за типом її модифікації. За «мітку» відповідають метилюючі ферменти модифікації - *ДНК-метиلاзи*. Відмінність в модифікації робить чужорідну ДНК чутливою до дії рестрикуючих ферментів, які впізнають відсутність метильних груп у відповідних сайтах. Унікальні сайти рестрикції характеризуються великою різноманітністю первинної структури (**рис. 3.4**).

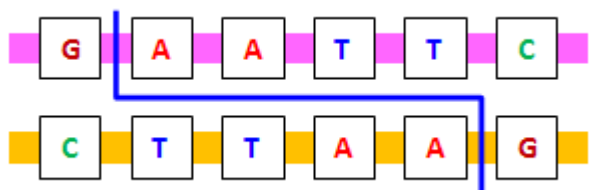
Системи рестрикції і модифікації відіграють важливу роль в захисті резидентної ДНК від забруднення послідовностями чужорідного походження. Оскільки різні бактерії по-різному мітять свою ДНК, то і рестриктази повинні впізнавати різні послідовності. Нині вже виділені рестриктази, які впізнають більше 150 сайтів рестрикції. Рестриктази, що «впізнають» ті ж самі сайти рестрикції, називають *ізошизомерами*.

В якості мішеней – сайтів рестрикції - виступають паліндроми з 4-6 пар основ. Точки впізнавання рестриктазами симетричні щодо повороту на  $180^\circ$ , тобто послідовність нуклеотидів зліва направо в одній нитці така ж, як справа наліво в іншій. Наприклад, фермент *Eco*RI впізнає послідовність із гексануклеотидів:





Подібно багатьом іншим ферментам рестрикції, *EcoRI* вносить розрив не точно по вісі симетрії, а в точках двох ланцюгів ДНК, які стоять один від одного на 4 нуклеотиди:



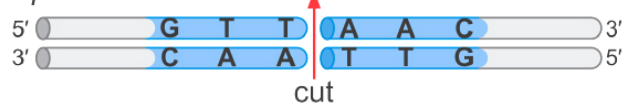
У результаті такого розриву утворюються фрагменти ДНК з виступаючими липкими 5'-кінцями:



У 1973 році Сміт і Натанс запропонували номенклатуру рестриктаз, що включає наступні пункти:

1. Аббревіатура назви кожного ферменту є похідною від бінарної назви мікроорганізму, що містить цю метилазно-рестриктазну систему. Назву рестриктази складають за правилом: до першої прописної букви назви роду додають дві перші малі літери виду: *Streptomyces albus* - Sal, *Escherichia coli* – Eco.
2. У разі потреби додають позначення серотипу або штаму, наприклад, Eco B.
3. Різні системи рестрикції - модифікації, що кодуються однією бактеріальною клітиною, позначають римськими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).
4. Рестриктази позначають буквою R (R Hind III), метилази - M (M Hind III). Відкриття нових рестриктаз змусило Робертса в 1978 році внести доповнення в систему раціональних позначень ферментів: якщо скорочена назва збігається для декількох ферментів, то 2 перші літери аббревіатури залишаються незмінними, а третя береться з наступних букв видової назви: *Haemophilus parainfluenzae* - Hpa I, *Haemophilus parahaemolyticus* - Hph I.

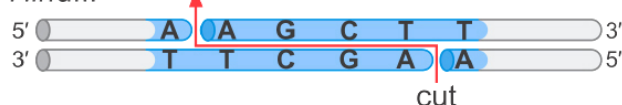
*HpaI*



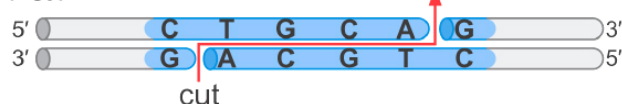
*EcoRI*



*HindIII*



*PstI*

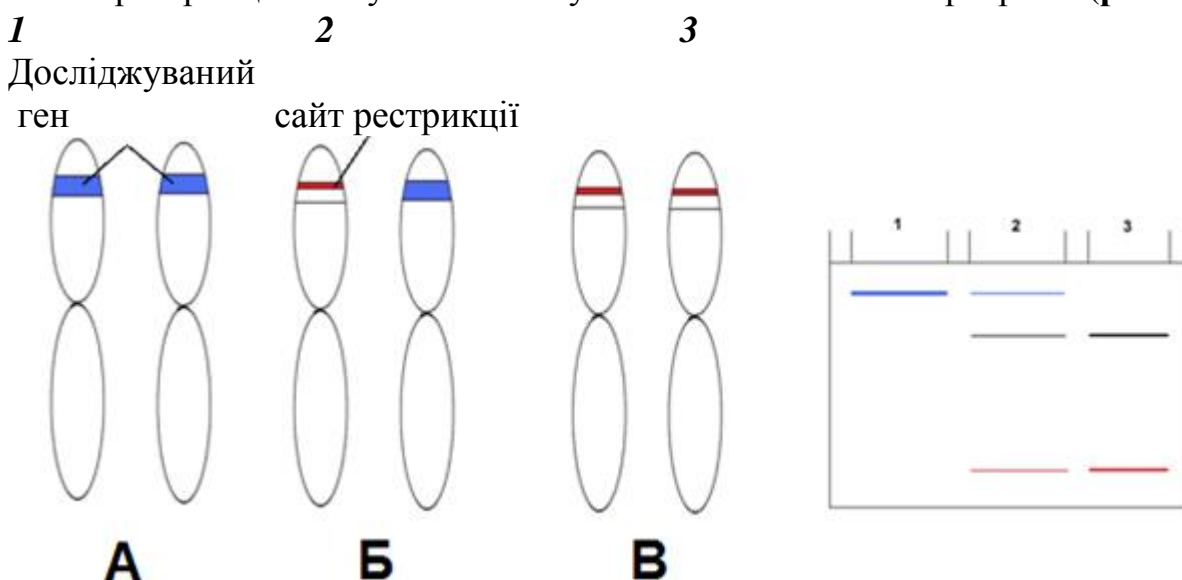


**Рис. 3.4.** - Ілюстрація сайтів рестрикції для ферментів з липкими 3' і 5' та тупими кінцями

Для проведення рестриктного аналізу необхідні наступні **матеріали та оснащення**: 1. Вектор (наприклад, pBluescript). 2. Рестриктази (наприклад, EcoRI, BamHI, XbaI). 3. Буфер для рестрикції. 4. Настільна центрифуга (Еппендорф). 5. Стерильні пробірки.

При роботі з чистими препаратами рестриктаз необхідно дотримуватися обережності, оскільки, як і багато інших ферментів, вони втрачають активність при кімнатній температурі. Тому їх необхідно зберігати в морозильнику при температурі не вище  $-18^{\circ}\text{C}$ , транспортувати та використовувати в лабораторних умовах тільки під льодом. Але навіть при дотриманні всіх заходів обережності термін життя (збереження активності і специфічності гідролізу) більшості ферментів не перевищує одного року. Тому використовувати їх після закінчення гарантійного терміну, що вказується виробником на упаковці, не рекомендується. Необхідно пам'ятати, що в розчиненому вигляді більшість ферментів погано зберігаються та швидко втрачають свою активність.

Сайти рестрикції можуть також служити генетичними маркерами (**рис. 3.5**):



**Рис. 3.5.** - Сайти рестрикції як генетичні маркери: А - відсутність сайту рестрикції в результаті мутації; Б - гетерозигота по сайту рестрикції; В - гомозигота по сайту рестрикції. 1 - пара гомологічних хромосом батька; 2 - пара гомологічних хромосом дитини; 3 - пара гомологічних хромосом матері.

**Завдання 3.** Провести електрофоретичне розділення фрагментів ДНК.

**Хід виконання завдання 3:**

1. Зважити необхідну кількість агарози і додати до відміряної кількості електрофорезного буфера. Наприклад, для приготування 100 мл 1,5%-ного агарозного гелю необхідно розчинити 1,5 г агарози в 100 мл буфера. Для розчинення агарози довести розчин до кипіння.
2. Підготувати ванночку для електрофорезу – вставити гребінку, заклеїти торці липкою стрічкою. Гребінка необхідна для того, щоб після застигання гелю в ньому утворилися лунки для внесення зразка (**рис. 3.6**).
3. Охолодити агарозу до  $50-60^{\circ}\text{C}$ , додати бромистий етидій до концентрації 0,5 мг/мл.

4. Залити агарозу в ванночку для електрофорезу. Дати гелю застигнути протягом 15-20 хвилин.
5. Залити в форезну камеру буфер для електрофорезу та вставити ванночку з гелем. Буфер повинен повністю вкривати гель.
6. Витягнути гребінку і внести зразки в лунки гелю.
7. Для підготовки зразків необхідно змішати розчин ДНК зі спеціальним буфером для внесення. Він містить барвник для електрофорезу та гліцерин. Барвник полегшує внесення зразка і дозволяє відстежувати процес електрофорезу. Найпоширенішими барвниками є бромфеноловий синій, крезоловий червоний, ксиленціанол. Гліцерин необхідний для підвищення щільності зразка з тим, щоб при внесенні в лунки ДНК не розчинялася в оточуючому розчині. Зазвичай, буфер для внесення має наступний склад: 0.25% бромфеноловий синій, 50% гліцерин, 60 mM EDTA.
8. Після внесення зразків підключити електричний струм і провести електрофорез.
9. Після проведення електрофорезу викласти гель на транслюмінатор і візуалізувати фрагменти. Обробка гелю флуоресцентним барвником етидія броміду-МЗС, який вбудовується в малу борозенку ДНК, дозволяє при УФ-опроміненні поверхні гелю в приладі транслюмінаторі бачити смуги, що містять ДНК, які набувають характерного світіння.



**Рис. 3.6.** – Електрофорезна камера з гребінками (ліворуч), які після застигання гелю формують лунки

**Пояснення до завдання 3. Електрофорез** – досконалий аналітичний інструмент, який використовується для розділення макромолекул розміром від 20 до 2000 атомних одиниць маси (а.о.м.). 1 а.о.м. =  $1,66 \times 10^{-24}$  г. Електрофорез в агарозному гелі – стандартний метод розділення, ідентифікації та очищення фрагментів ДНК. Оскільки ДНК у розчині має негативний заряд, то під дією електричного поля вона рухається до полюсу з протилежним зарядом. Фрагменти ДНК, однакові за масою та зарядом, мігруватимуть з однаковою швидкістю та виділятимуться в окрему фракцію. Чим крупнішою є молекула, тим більшим є заряд, отже, більша сила діє на молекулу ДНК. Оскільки опір середовища зростає не пропорційно, то швидкість руху буде залежати від довжини молекули. На рух молекул ДНК впливають: концентрація геля, конформація молекули ДНК, розмір

молекули, величина електричного поля, концентрація та рН буфера, температура. Найпоширенішими гелями для електрофорезу є агароза та поліакриламід.

Агароза – високоочищений комплексний полісахарид із червоних водоростей. Розмір пор 1%-ного гелю становить приблизно 150 нм. Агароза зручна для аналізу фрагментів ДНК від декількох сотень нуклеотидних пар до 20 т. п. н. Розмір пор залежить від складу електрофорезного буфера, виду і концентрації використаної агарози. Агароза розчиняється у водному буфері та полімеризується при охолодженні. Електрофорез проводять в особливій камері із вміщеними туди електродами і наповненою особливим буфером (електрофорезний буфер) (рис. 3.6).

Швидкість міграції ДНК крізь агарозний гель визначається багатьма параметрами: 1) **концентрацією агарози**: від неї залежить розмір пор в агарозному гелі, отже, опір, який відчувають молекули ДНК під час руху в гелі. Для розділення фрагментів ДНК невеликого розміру використовують більш концентрований гель. Найчастіше використовують концентрацію 1-1,5 %;

2) **конформацією ДНК**: швидкість міграції ДНК крізь гель залежить від її форми. Кільцеві і лінійні молекули ДНК одного розміру рухаються з різною швидкістю: кільцева молекула рухається швидше крізь пори гелю, ніж лінійна;

3) **напруженістю електричного поля**: із зростанням цієї величини зростає швидкість руху молекул ДНК. Але, якщо напруженість електричного поля буде непропорційно високою, швидкість руху молекул ДНК різного розміру буде приблизно однаковою та поділ їх за розміром стане не ефективним. Для стандартного аналітичного електрофорезу оптимальним є напруженість 6В/см. 4) **розміром молекул ДНК**: чим довшою є молекула ДНК, тим повільніше вона рухається в гелі. Таким чином, після електрофорезу більш короткі фрагменти ДНК пройдуть більшу відстань в гелі.

Для фарбування молекул ДНК в агарозних гелях найчастіше застосовується флуоресцентний барвник – *бромистий етидій*. Цей барвник ефективно зв'язується з молекулою ДНК і світиться під дією ультрафіолету, причому зв'язаний з ДНК барвник флуоресцює в 10 разів сильніше, ніж той, що знаходиться в розчині.

Для аналізу результатів електрофорезу використовують особливий прилад – *трансліумінатор*, який дозволяє опромінювати гель ультрафіолетом, спричинюючи світіння бромистого етидію, зв'язаного з ДНК.

При електрофорезі в агарозному гелі використовується однорідна буферна система протягом усього часу розділення, щоб забезпечити постійне значення рН і певну іонну силу. Одним із найпоширеніших буферів для форезу є *трис-боратний буфер* (ТВЕ). Поряд із зразками ДНК, що аналізуються, додається суміш фрагментів ДНК із відомими розмірами. Під час аналізу цей маркер розмірів використовується для визначення довжини фрагментів у зразку, що аналізується (рис. 3.7). Гель на основі агарози використовується для аналізу молекул, діаметр яких більше 10 нм. Поліакриамід використовується для менших фрагментів ДНК.

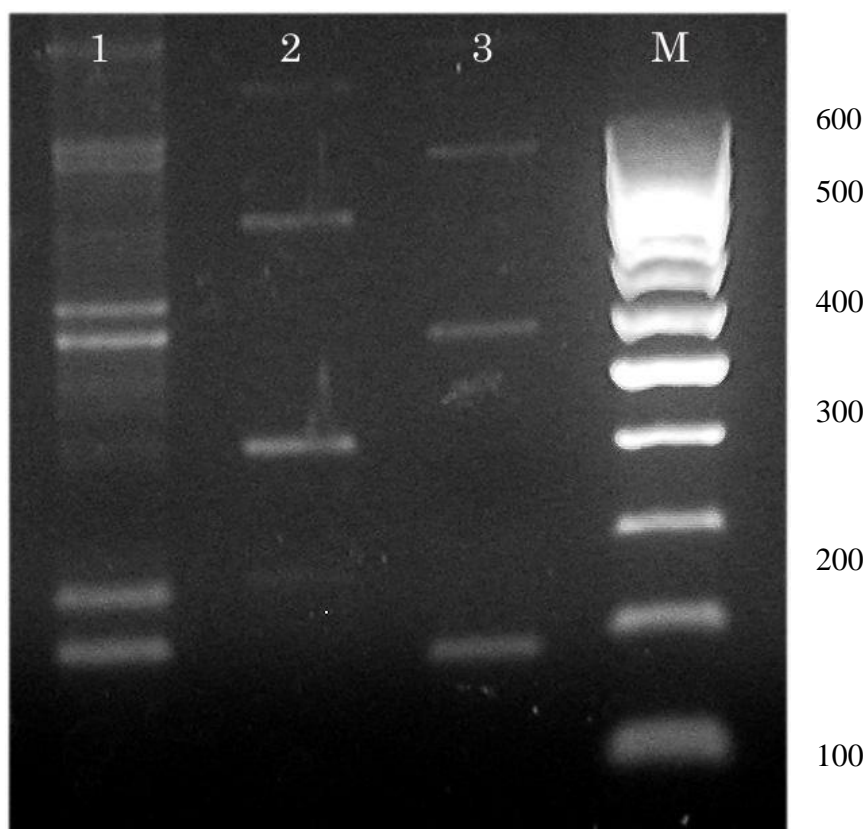
**Завдання 4.** Використовуючи термоциклер, ампліфікувати виділений рестрикуванням і очищений електрофорезом фрагмент молекули ДНК.

**Хід виконання завдання 4:**

1. У пробірку на льоду в наступному порядку вносять компоненти: а) бідистильована вода - 18 мкл; б) 10X розчин нуклеотидів (dNTP, 250 мкМ кожного) - 2,5 мкл; в) 10X буфер для проведення ПЛР - 2,5 мкл; г) два праймери

(50 pmol) по 0,5 мкл кожного; д) Taq-полімераза (2,5 од./мкл) - 0,5 мкл; е) ДНК-матриця (100-200 нг) - 0,5 мкл. Загальний об'єм: 25 мкл.

2. Після змішування всіх компонентів в пробірку додають мінеральну олію, що запобігає випаровуванню реакційної суміші в результаті нагрівання пробірки. Після додавання олії пробірку короткочасно прокручують на центрифугі (short-spin) для правильного розділення фаз. Після цього запускають програму в ампліфікаторі та встановлюють пробірку в прилад. Програму для ПЛР-реакції оптимізують в залежності від температури відпалу праймерів, нуклеотидного складу матриці, типу матриці, що використовується в реакції.



**Рис. 3.7.** – Маркер розмірів фрагментів ДНК, що аналізуються, для визначення їх довжини. Довжина фрагментів маркера розмірів (М) вказана в парах нуклеотидів

Зазвичай для нормального ходу реакції подальша оптимізація призведе до погіршення виходу і специфічності продукту. Стандартна програма для проведення ПЛР виглядає так:

94<sup>0</sup> С - 2 хв. 0 сек - початкова денатурація

**35 циклів:** 95<sup>0</sup> С - 0 хв. 30 сек; 55<sup>0</sup> С - 0 хв. 45 сек; 72<sup>0</sup> С - 0 хв. 45 сек.

72<sup>0</sup> С - 7 хв. 00 сек - кінцева елонгація; 4<sup>0</sup> С – зберігання.

**Пояснення до завдання 4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)** - швидкий ефективний метод ампліфікації (копіювання) в пробірці невеликих ділянок ДНК. Полімеразна ланцюгова реакція, відкрита в середині 80-х років американським біохіміком *Керрі Муллісом*, мала революційне значення для молекулярної біології, медичної діагностики, судової експертизи, еволюційної біології, і дала нові підходи для вивчення та аналізу генів. ПЛР дає можливість отримувати величезну кількість копій специфічних послідовностей ДНК без клонування їх у біологічних об'єктах. У ПЛР використовуються особливості реплікації ДНК: копіювання ДНК в пробірці здійснює фермент *ДНК-полімераза*, скопійовані

ділянки визначають за допомогою штучно синтезованих затравок (*праймерів*). Обидві нитки ДНК можуть служити в якості матриці для синтезу, якщо олігонуклеотидні праймери підібрані для кожної нитки. Праймери для ПЛР вибираються так, щоб фланкувати район, який необхідно ампліфікувати.

Одноланцюгову ДНК-субстрат для ДНК-полімерази отримують шляхом нагрівання реакційної суміші до 95°C. ПЛР-реакція включає 3 етапи: *денатурація* – при температурі 95°C дволанцюгова ДНК-матриця роз'єднується на дві одноланцюгові нитки; *відпал праймерів* – праймери гібридизуються з матричною ДНК, створюючи затравки; *елонгація* – при температурі 72°C ДНК-полімераза добудовує новий ланцюг. Температура відпалу праймерів, а також час, за який триває кожен з етапів, підбираються емпірично, в залежності від багатьох факторів, наприклад, нуклеотидного складу праймерів і довжини ампліфікованого фрагмента.

ПЛР проводиться автоматично в спеціальному приладі, який називається *ампліфікатор (термоциклер) (рис. 3.8)*. Повторювані цикли денатурації, відпалу праймерів, елонгації призводять до швидкої специфічної ампліфікації ділянки ДНК. Після 22 циклів від однієї молекули ДНК-матриці одержують більше мільйона її копій.



**Рис. 3.8.** - Ампліфікатор – прилад, що забезпечує періодичне охолодження та нагрівання пробірок, необхідне для проведення ПЛР

Суттєвий вплив на специфічність реакції ПЛР мають праймери. Підбір праймерів здійснюють вручну або за допомогою комп'ютерних програм. У будь-якому випадку треба керуватися рядом правил: довжина праймерів має бути від 17 до 30 нуклеотидів (чим менше, тим нижче специфічність); вміст GC-пар праймерів має бути близько 50%; праймери не повинні мати вторинну структуру; праймери не повинні бути комплементарними один одному. Крім того, специфічність отриманого продукту ПЛР в значній мірі визначається температурою відпалу праймерів, при якій вони гібридизуються з комплементарними ділянками ДНК-матриці, утворюючи затравки. Температура відпалу визначається довжиною праймера та вмістом GC-пар і приблизно розраховується за наступною формулою:  $T(\text{відпалу}) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) - 5$ .

Підбір праймерів, що задовольняють зазначеним вище умовам, зручно проводити за допомогою комп'ютерних програм. Однією з простих і доступних програм є Oligo. Фірми, які постачають ДНК-полімерази, докладають і відповідний буфер, оптимальний для роботи даного ферменту. Тому для постановки ПЛР доцільно використовувати буфер, що входить до комплексу Taq-полімерази. Крім оптимізації стандартних компонентів, що входять до реакції ПЛР, для підвищення специфічності, виходу продукту або при використанні складних ДНК-матриць можна використовувати певні речовини, що впливають на



стабільність ДНК-полімерази, температури плавлення ДНК і ряд інших факторів. Найбільш поширені з них: DMSO (5%) покращує ампліфікацію GC - багатих матриць; формамід (1-5%) поліпшує специфічність реакції; гліцерин (10-15%) стабілізує фермент; бетаїн Na (0,5-2М) покращує ампліфікацію GC - багатих матриць. У будь-якому випадку їх застосування доцільно лише у випадку очевидних проблем з проходженням ПЛР. Спроба «покращення» нормально триваючої реакції призведе до зворотних результатів.

### Лабораторна робота № 13

#### Рестриктний аналіз ДНК. Побудова рестрикційної карти

**Мета роботи:** засвоїти теоретичні основи рестрикційного аналізу ДНК як основного етапу клонування генів; оволодіти методикою побудови рестрикційної карти ДНК.

**Завдання 1.** Провести рестрикційний аналіз і побудувати рестрикційну карту фрагмента ДНК на основі наступних вихідних даних: після ампліфікації (самокопіювання) методом ПЛР лінійні фрагменти ДНК довжиною 1500 пар нуклеотидів розділили на три частини: одну частину обробили рестриктазою А, другу – рестриктазою В, третю – обома рестриктазами. Фрагменти розділили електрофорезом. Фермент А розрізав ДНК на 4 фрагменти розміром 2100, 1400, 1000 і 500 п. н. Обробка рестриктазою В дала 3 фрагменти: 2500, 1300 і 1200 п. н. Обробка досліджуваного фрагмента одночасно двома рестриктазами дала шість фрагментів: 1900, 1000, 800, 600, 500, 200 п. н.

**Пояснення до завдання 1. Рестрикційний аналіз** – встановлення місць розщеплення ДНК рестрикційними ендонуклеазами. Рестрикційний аналіз широко використовується у молекулярно-біологічних дослідженнях та прикладних роботах; він є одним із найважливіших методів дослідження нуклеїнових кислот. Зазвичай продукти розщеплення ДНК рестриктазами – *рестрикти* – аналізуються за допомогою гель-електрофорезу в агарозному чи в поліакриламідному гелі. Результати рестрикційного аналізу (порівняння розмірів фрагментів ДНК, отриманих після обробки певної ділянки геному набором рестрикуючих нуклеаз) дозволяє побудувати *рестрикційну карту* – схему молекули ДНК, на якій вказано сайти розрізання її ендонуклеазами рестрикції і положення кожного сайту рестрикції відносно інших ділянок.

Фермент А розрізав ДНК на 4 фрагменти розміром 2100, 1400, 1000 і 500 п. н. Обробка рестриктазою В дала 3 фрагменти: 2500, 1300 і 1200 п. н. (**рис. 3.9**). Обробка досліджуваного фрагмента одночасно двома рестриктазами дала шість фрагментів: 1900, 1000, 800, 600, 500, 200 п. н.

Зіставляючи результати рестрикції фрагмента ДНК двома рестриктазами, помітно, що обробка кожного з 4-х А-фрагментів рестриктазою В дала наступні результати:

2 100 - 1900 и 200,

1 400 - 800 и 600,

1 000 - 1000 (змін немає)

500 - 500 (змін немає)

Обробка кожного з 3-х В-фрагментів рестриктазою А:

2 500 - 1900 и 600  
 1 300 - 800 и 500  
 1 200 - 1000 и 200.

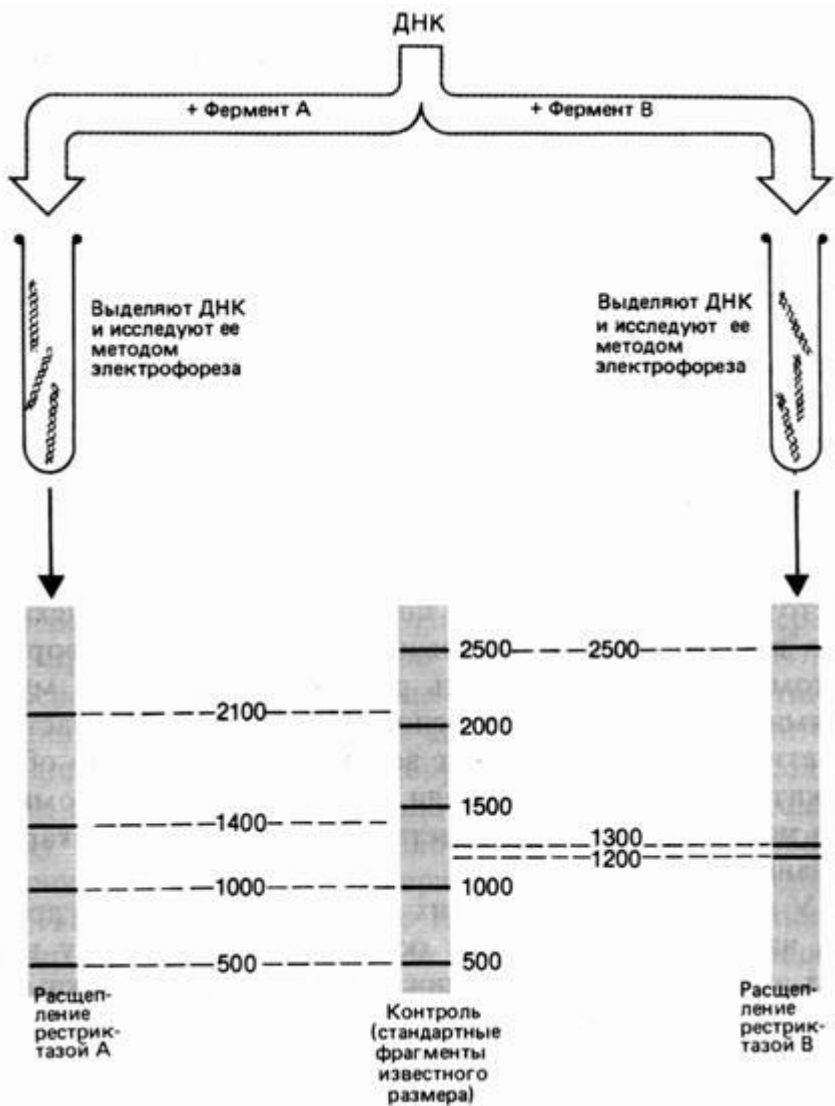


Рис. 3.9. - Результаты электрофорезу після обробки фрагмента ДНК різними рестриктазами

Аналіз отриманих результатів показує, що кожний із фрагментів, отриманий при розщепленні А-фрагментів рестриктазою В, можна виявити в зразках, отриманих при розщепленні В-фрагментів рестриктазою А. Ключем до рестрикційного картування є фрагменти, що перекриваються. Такими в даному прикладі є В-фрагмент 2100 і А-фрагмент 2500. При обробці іншою рестриктазою вони дають фрагмент 1900.

З даних про розщеплення цих фрагментів припустимо, що з одного боку на відстані 200 п. н. від фрагмента 1900 знаходиться наступний А-сайт, а з іншого кінця, на відстані 600 п. н. – В-сайт (рис. 3.10). При обробці двома ендонуклеазами фрагмент 200 п. н. утворюється один раз при обробці рестриктазою А з В-фрагменту 1200, тобто фрагмент 1200 лежить ліворуч. Залишається визначити, як продовжується карта праворуч. Очевидно, це А-фрагмент 1400, оскільки він поділений рестриктазою на фрагменти 600 і 800. Праворуч від фрагмента 2500 слід відкласти, очевидно, фрагмент 1300. Тоді логічна наявність А-фрагменту 500 і ділення В-фрагменту 1300 рестриктазою А на 800 і 500.





**Рис. 3.10.** - Аналіз фрагментів рестрикції і карта фрагмента ДНК

При побудові рестрикційних карт зазвичай використовують декілька рестриктаз, тому доводиться аналізувати складні співвідношення між фрагментами, отриманими при дії різних ферментів. Для спрощення процедури картування можна застосовувати неповне розщеплення. В певних умовах рестриктаза дізнається і розщеплює не всі сайти в молекулі ДНК. Наприклад, при частковому розщепленні ДНК ферментом А можуть утворюватися фрагменти 3100 п. н., 1400 п. н. і 500 п. н. Зіставивши їх з даними повного розщеплення (2100, 1400, 1000 і 500), можна відразу поставити поруч 2100 і 1000 (фрагмент 3100). А отримавши фрагмент 3500 – розташувати поруч 2100 п. н. і 1400 п. н.

**Завдання 3.** Самостійно побудувати рестрикційну карту лінійного фрагмента ДНК на основі наступних вихідних даних:

Після ампліфікації (самокопіювання) методом ПЛР лінійні фрагменти ДНК довжиною 1500 пар нуклеотидів розділили на три частини, після чого одну частину обробили рестриктазою I, другу – рестриктазою II, третю – обома рестриктазами. Продукти розщеплення розділили гелі-електрофорезом в агарозному гелі. Рестриктаза I розділила 1500 п.н. на три фрагменти: 700, 600, 200, рестриктаза II – на три фрагменти – 550, 500, 450, рестриктази I + II – на п'ять фрагментів – 450, 400, 300, 200, 150.

**Завдання 4.** Відповісти на запитання:

1. Рестриктаза *Hind* III розрізає ДНК по послідовності AAGCTT. Якою буде середня довжина фрагментів розрізаної ДНК?
2. Гаплоїдний геном людини містить  $3 \times 10^9$  нуклеотидних пар. Скільки різних фрагментів ДНК буде одержано при розрізанні її рестриктазою *EcoRI*?
3. Якщо послідовності нуклеотидів у ДНК розміщені випадково, то яка середня довжина фрагменту при розрізанні рестриктазами, які впізнають послідовність з 8 нуклеотидів?
4. Яким чином і на скільки частин можна розрізати фрагмент ДНК із 24 п.н.:  
 5' TCAGAATGCTGGCCAAGTACTTAG3`  
 3` AGTCTTACGACCGGTTTCATGAATC 5`

## ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Яку функцію виконує ендонуклеаза рестрикції?
2. Для чого використовуються рестрикційні карти?
3. Геном *E.coli* містить  $4,7 \times 10^6$  п.н. Скільки рестрикційних фрагментів буде одержано після розрізання ДНК рестриктазою *NotI*?
4. Наявні три послідовності одно ланцюгових молекул ДНК. Яку з них у дволанцюговій формі можуть розрізати відомі вам рестриктази?
  - a) 5' TAGGCTAAGCTTACCGAT3'
  - b) 5' CGAATATTTCCGGATGAA3'
  - c) 5' AGGTCCTTATCCGATAAT3'
5. Наведіть і коротко охарактеризуйте відомі вам методи молекулярно-генетичного аналізу ДНК.

### Лабораторна робота № 14

#### Методи діагностики генної і хромосомної патології людини

**Мета роботи:** ознайомитися із сучасними методами діагностики генної і хромосомної патології, що використовуються в медичній практиці.

**Завдання 1.** Ознайомитися із сучасними методами ДНК-дігностики; навести її прямі та непрямі методи. Скласти таблицю:

Назва методу	Хвороби, що діагностуються цим методом	Тип мутацій, що спричинюють генне захворювання	Послідовні етапи методу діагностики

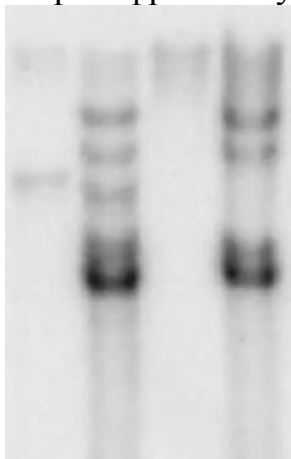
**Пояснення до завдання 1.** Використання методів молекулярної діагностики

стало можливим з початку 70х років минулого століття завдяки відкриттям моноклональних антитіл і методу гібридизації на фільтрах.

Для ідентифікації гена молекулу ДНК розщеплюють рестриктазами на ділянки розміром приблизно по 15-20 тисяч пар нуклеотидів, піддають електрофоретичному фракціонуванню в агарозному гелі. Після цього фракції

ДНК денатурують нагріванням і переносять з агарозного гелю на нитроцелюлозний фільтр, де їх іммобілізують.

Процес перенесення ДНК нагадує промокання (англ. – *блоттинг*) і називається методом *блоттингу за Саузерном*. Сутність блоттингу заключається в тому, що агарозний гель поміщають на фільтрувальний папір, змочений у концентрованому сольовому розчині; потім на гель накладають нитроцелюлозний фільтр і зверху поміщають сухий фільтрувальний папір. Сольовий розчин всмоктується в сухий папір; щоб це відбулося, він повинен пройти крізь агарозний гель і потім через нитроцелюлозний фільтр. ДНК переноситься разом із розчином, але затримується нитроцелюлозою. Іммобілізовану таким чином ДНК можна гібридизувати на місці разом із флюоресцуючим зондом. ДНК-зонд є одноланцюговою ДНК з відомою послідовністю нуклеотидів довжиною до 30 нуклеотидів. Зонд використовується для пошуку комплементарних послідовностей в молекулі більшого розміру. Зі специфічним зондом будуть гібридизуватися тільки комплементарні йому фрагменти. Кожна комплементарна послідовність проявляється в вигляді флюоресцуючої смуги, місце розміщення якої визначається розміром фрагменту ДНК (**рис. 3.11**).



**Рис. 3.11.** – Саузерн-блоттинг

Гібридизацію з ДНК-зондами проводять і на хромосомних препаратах - *гібридизація in situ*. Мічений флюорохромами ДНК-зонд наносять на препарати диференційно забарвлених і приготованих для гібридизації (денатурованих) метафазних хромосом. Після специфічної обробки препарату місця хромосомної локалізації послідовностей ДНК, комплементарних ДНК-зондам, виявляються у вигляді характерних флюоресцуючих ділянок.

Методи гібридизації з ДНК-зондами і ампліфікація (ПЛР) з подальшим аналізом зразків ДНК лежать в основі *ДНК-діагностики спадкових захворювань людини*. Основне завдання ДНК-діагностики - дослідження генів з метою виявлення мутацій. Мутації виявляють після проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим вивченням ампліфікованих фрагментів ДНК шляхом електрофорезу в агарозному або акриламідному гелі. Якщо відбувається мутація, пов'язана із зміною довжини фрагмента ДНК - делеція або інсерція, то на

електрофореграмі виявляється зміна положення фрагмента порівняно з нормою (рис. 3.12):

Молекулярна маса фрагментів

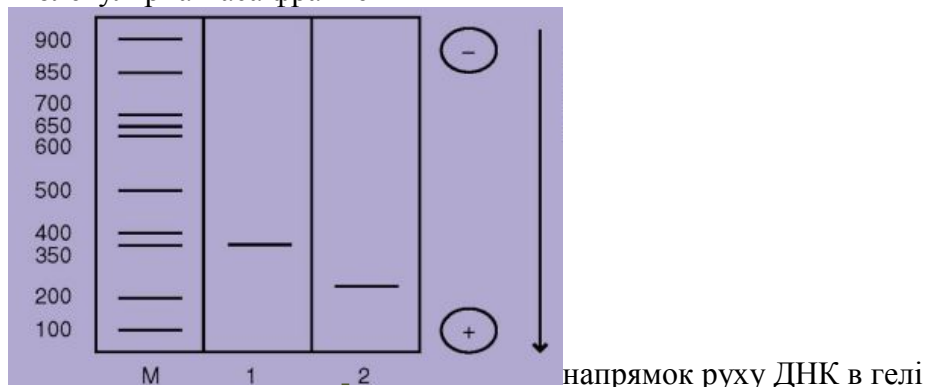


Рис. 3.12. - Схема аналізу фрагментів ДНК: М - маркер молекулярної маси фрагментів ДНК; 1 - нормальний зразок ДНК; 2 - мутантний зразок ДНК, що вивчається

Для масового сканування поширених мутацій використовується метод ДНК-чипів. В основі методу лежить принцип комплементарної гібридизації. Комплементарна гібридизація умовно складається з чотирьох кроків:

1. Визначення хімічної структури фрагмента ДНК.
2. Видалення фрагмента ДНК, який розміщується в рідинному субстраті у відповідному довідковому сегменті.
3. Вивчення невідомого матеріалу. Дослідний зразок ДНК вноситься в довідковий сегмент, який містить відомий фрагмент ДНК і при збігові структури здійснюється гібридизація.
4. Ідентифікація результату з допомогою різноманітних світлочувливих хімічних речовин.

ДНК-чип являє собою пластинку площею близько  $1 \text{ см}^2$ , на якій в чітко визначеному порядку розміщені комірчини, кожна з яких містить одноланцюгові полінуклеотиди однієї визначеної послідовності азотистих основ. При цьому розроблені методики, коли олігонуклеотиди синтезуються безпосередньо на поверхні чипа. З'явилася можливість розмістити на  $1 \text{ см}^2$  їх кілька мільйонів.

У ДНК-діагностиці спадкових хвороб виділяють **прямі** та **непрямі методи**.

При **прямій ДНК-діагностиці** об'єктом дослідження є мутації певного гена. Метод використовується при діагностиці муковісцидозу, фенілкетонурії, гемофілії А, міодистрофії Дюшенна, адреногенітального синдрому, таласемії, нейрофіброматозу, синдрому FRA X, недостатності альфа1-антитрипсину, недостатності 21-гідроксилази, хореї Гентингтона. Точність методу сягає 100%.

Прямий метод діагностики генних мутацій включає:

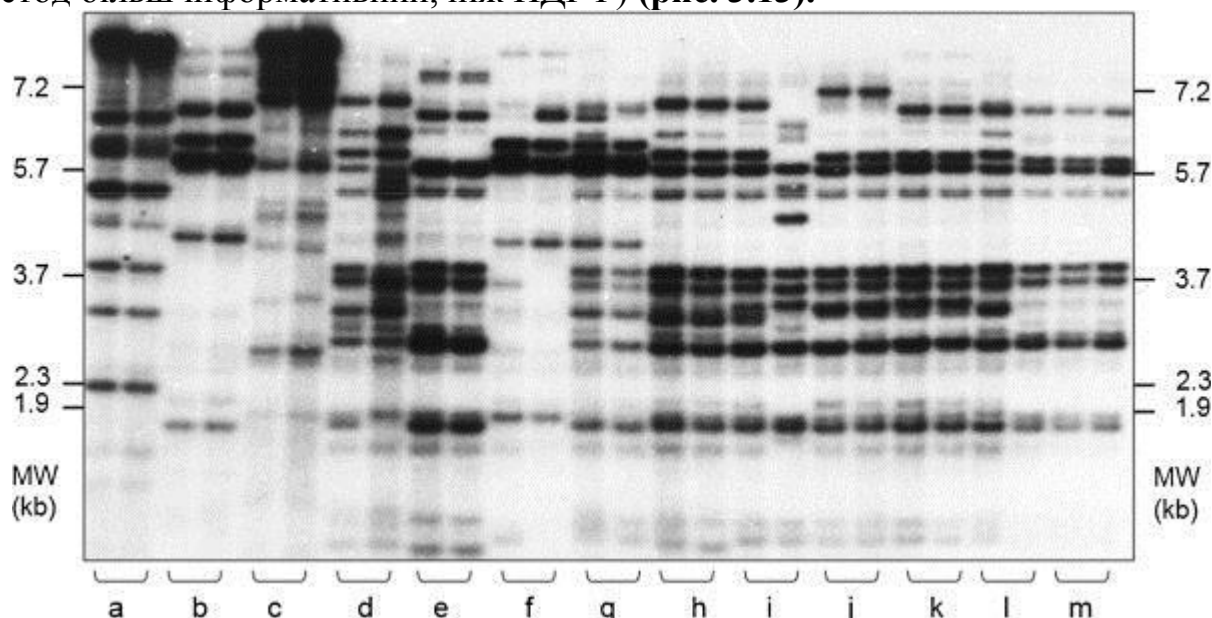
- визначення нуклеотидної послідовності (секвенування), що дає можливість виявити заміни азотистих основ, делеції, вставки у фрагменті, який вивчається;
- визначення порушень місця рестрикції за допомогою блот-гібридизації за Саузерном;
- проведення алелоспецифічної гібридизації із синтетичними зондами (виявлення мутацій у геномній ДНК);
- хімічне та ферментативне розщеплення ДНК у місцях неправильної зшивки основ дозволяє виявити велику групу мутацій, які призводять до нестабільності ДНК;

- виявлення змін електрофоретичної рухливості мутантних молекул ДНК.

**Непрямі методи ДНК-діагностики** базуються на аналізі зчеплення з досліджуваним геном певного поліморфного локуса (маркера), за допомогою якого можна проводити маркування як мутантного, так і нормальних алелей та проаналізувати їх передачу в поколіннях (серед родичів особи, яка обстежується).

Непрямі методи аналізу ДНК більш універсальні, оскільки їх можна застосовувати і тоді, коли ген не ідентифікований, а лише картований на певній хромосомі, і тоді, коли методи прямої діагностики не дають результату (внаслідок великої протяжності гена чи великого спектра мутаційних змін), при складній екзонно-інтронній організації гена. Найчастіше використовується **метод аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ-аналіз)**. Цей метод складається із етапів: виділення геномної ДНК; рестрикція за допомогою специфічних ендонуклеаз; розділення фрагментів електрофорезом; ідентифікація фрагментів за допомогою блот-гібридизації за Саузерном.

Для непрямой діагностики також використовуються гіперваріабельні сателітні повтори: 1-, 2-, 3-, тетрануклеарні тандемні послідовності ДНК, що повторюються (метод більш інформативний, ніж ПДРФ) (**рис. 3.13**).



**Рис. 3.13** – Міні (VNTR)- та мікро (STR) сателітні послідовності ДНК, що використовуються при ДНК-діагностиці в якості маркерів

Наприклад, у випадку хореї Гентингтона багаторазово повторюється послідовність CAG (цитозин-аденин-гуанін) геномної ДНК, тобто мутація гена складається з експансії (багаторазове збільшення числа копій). Подібне явище характерне і для міотонічної дистрофії, синдрому ламкої Х-хромосоми. Використання цих повторів використовується для діагностики більшості моногенних захворювань.

**Завдання 2.** Ознайомитися з найпоширенішими методами, що використовуються для ідентифікації моногенних хвороб людини: аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ-аналіз), метод визначення мутацій за допомогою аллельспецифічних проб.

**Пояснення до завдання 2.** Мутації, що виникають у ділянках впізнавання певних рестриктаз, роблять ці ділянки ДНК нечутливими до дії ферментів. Це

може бути легко виявлено за зміною довжини рестрикційних фрагментів ДНК. **ПДРФ-аналіз** включає наступні етапи: виділення геномної ДНК, її рестрикцію специфічною ендонуклеазою, електрофоретичне розділення утворених фрагментів ДНК, ідентифікацію цих фрагментів шляхом блот-гібридації за Саузерном. На електрофореграмах при відсутності рестрикції в досліджуваній ДНК виявляють один великий фрагмент, відповідний за довжиною послідовності ДНК між двома сусідніми ділянками рестрикції для тієї ж ендонуклеази. Якщо ділянка впізнавання не змінена, обробка ферментом призведе до утворення 2 маленьких фрагментів з тією ж сумарною довжиною, що і вихідний фрагмент.

При обстеженні пацієнтів і членів їх сімей на носійство патологічних генів широко використовують цей метод, за допомогою якого:

- ідентифікують делеції в гені дистрофіну, на частку яких припадає близько 60% усіх мутацій, що спричинюють міодистрофію Дюшенна;
- діагностують гемофілію А, деякі таласемії, ретинобластому та гранулематоз;
- виявляють хворих дітей в сім'ях, в яких батьки є гетерозиготами за геном серповидно-клітинної анемії та іншими дефектними генами.

#### **Визначення мутацій за допомогою алельспецифічних проб**

використовується, якщо мутація, що спричинює генне захворювання, не потрапляє до ділянки, відповідальної за впізнавання ферментів рестрикції. У цьому випадку, якщо послідовність азотистих основ в області мутації відома, її виявляють за допомогою алельспецифічних олігонуклеотидів. Для цього синтезують короткі олігонуклеотидні зонди, що містять зазвичай близько 19 нуклеотидів, комплементарні ділянці нормального і мутантного алелю в ДНК. Область геному, що містить досліджуваний ген, ампліфікують за допомогою ПЛР, зразки отриманої ДНК переносять на нітроцелюлозні фільтри (**dot - або slot-блоттинг**). Проби гібридизують з міченими зондами для виявлення нормальної або мутантної послідовності.

У гомозигот за досліджуваною мутацією ДНК буде гібридизуватися тільки із зондом, комплементарним мутантній послідовності. ДНК нормального гомозиготного індивідуума зв'яжеться з зондом, що відповідає незміненій нуклеотидній послідовності, тоді як з ДНК гетерозигот будуть гібридизуватися обидва зонди. На малюнку **3.14** представлені результати генного зондування 7 пацієнтів на носійство найпоширенішої делеції трьох нуклеотидів ( $\Delta F508$ ) в гені, відповідальному за розвиток муковісцидозу.



**Рис. 3.14** - Генне зондування на носійство муковісцидозу. За допомогою ПЛР ампліфікують геномну ДНК, продукт переносять на 2 нейлонових фільтри, один з яких гібридизують з міченим зондом на нормальний алель, інший - з міченим зондом на мутантний алель. Утворення гібридів виявляють за міткою, що світиться при гібридації завдяки броміду етидію. Проби 1-3 служать контролями: перша містить продукти ПЛР ДНК від гомозигот за нормальним геном; друга - від гетерозиготного носія мутації  $\Delta F 508$ ; третя - від хворого на муковісцидоз, гомозиготного за мутацією  $\Delta F 508$ . Проби 4-10 отримані при обстеженні 7 пацієнтів на

носіїство мутації ΔF 508: 4, 5, 6 і 9 опинилися гомозиготами за нормальним геном, а 7, 8 і 10 - гетерозиготними носіями мутантного гена.

Олігонуклеотиди, аллельспецифічні з певних мутацій, можна використовувати в якості праймерів в ПЛР при клінічному тестуванні населення на наявність патологічного гена. Якщо ДНК, отримана від пацієнта, ампліфікується з мутантним олігонуклеотидом, то пацієнт є носієм мутації. Якщо нуклеотидна послідовність у досліджуваному гені не змінена, то олігонуклеотид, що містить мутацію, не зв'яжеться з ДНК-матрицею, і ПЛР не відбудеться. Для вирішення питання ДНК-діагностики пацієнти направляються в Інститут медичної генетики (Харків).

**Завдання 3.** Розглянути цитогенетичний препарат лімфоцитів крові людини, які зазнали *in vitro* мутагенного впливу (рис. 3.15). Знайдіть метафази з хромосомними порушеннями. Замалювати в зошит аберантні хромосоми, визначити тип мутації.

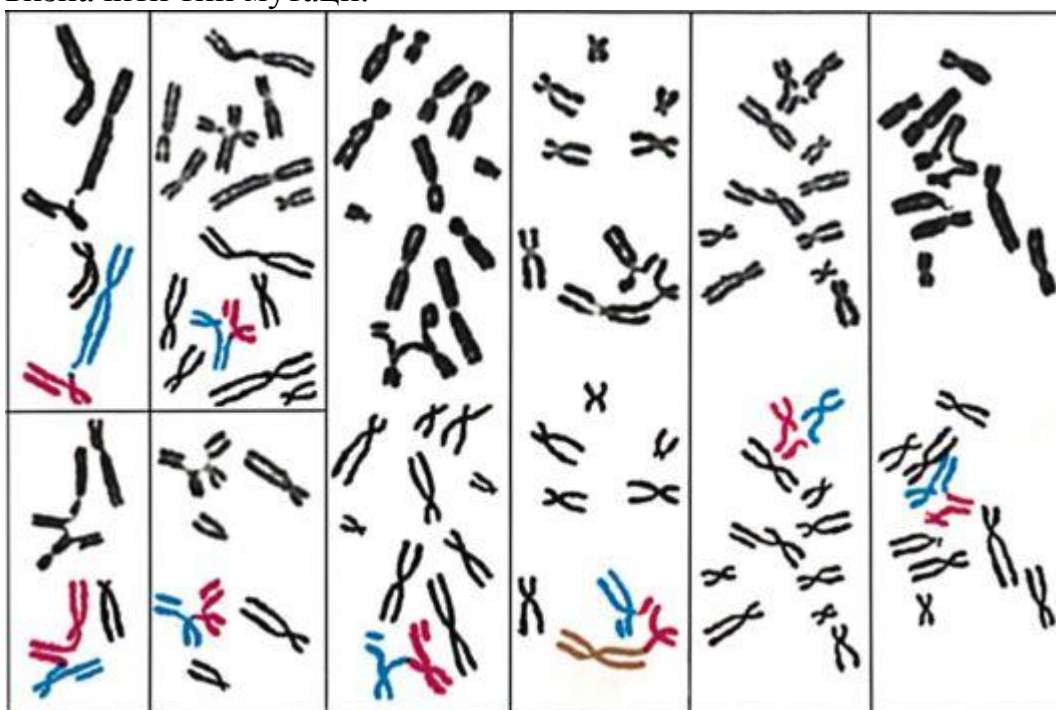


Рис. 3.15. - Деталі метафазних пластинок із хромосомними абераціями

**Пояснення до завдання 3.** Одним з основних методів визначення мутацій у людини є аналіз метафазних пластинок на цитогенетичних препаратах та виявлення на них порушень (аберацій) хромосом. Метод дозволяє визначити ступінь мутагенного впливу на людину, наприклад, при роботі на шкідливому виробництві або після аварій, що ведуть до забруднення навколишнього середовища. Використання лімфоцитів крові, культивованих на поживному середовищі (метод *in vitro*), дає можливість проводити експериментальні дослідження і визначати мутагенну небезпеку ліків, харчових добавок, пестицидів та інших факторів, що дозволяє запобігти їх впливу на людину та уникнути виникнення спадкових патологій.

## ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке медико-генетичне консультування? Які цілі та задачі вирішує МГК?
2. В яких випадках медико-генетичне консультування необхідне? Які категорії населення перш за все мають стати на облік і повинні обстежитися в МГК?
3. Назвіть прямі та непрямі методи ДНК-діагностики.
4. Охарактеризувати послідовні етапи діагностики генних захворювань людини.
5. Охарактеризувати методи та послідовні етапи діагностики хромосомних аберацій людини.

#### РОЗДІЛ 4. МІНЛИВІСТЬ ТА ЇЇ ГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

**Мінливість** – властивість усіх живих організмів змінюватися під впливом спадкових і середовищних факторів. Мінливість визначає відмінності за ознаками в особин одного виду, а також між спорідненими особинами одного або декількох поколінь, між батьківськими особинами і нащадками. Мінливість забезпечує появу нових ознак і властивостей організмів, завдяки чому утворюються нові види та відбувається історичний розвиток біосфери.

Розрізняють декілька форм мінливості:

- спадкову (генетичну) і неспадкову (модифікаційну);
- індивідуальну (відмінність між окремими особинами) та групову (між групами особин, наприклад, різними популяціями даного виду). Групова мінливість є похідною від індивідуальної;
- якісну та кількісну;
- спрямовану та неспрямовану.

Характерні особливості спадкової і неспадкової мінливості представлені в таблиці:

Форми мінливості	Причини появи	Значення	Приклади
<b>Неспадкова модифікаційна (фенотипна)</b>	Зміна умов середовища, в результаті чого організм змінюється в межах норми реакції, заданої генотипом	Адаптація – пристосування до конкретних умов середовища, виживання, збереження потомства	Породи коней, корів у горах стають низькорослими, зміна морфологічних ознак тієї ж самої рослини кульбаби в горах і на рівнині
<b>Спадкова (генотипна)</b>			
мутаційна	Вплив зовнішніх і внутрішніх мутагенних факторів, у результаті чого відбуваються зміни в генах і хромосомах	Матеріал для природного та штучного добору, оскільки мутації можуть опинитися корисними, шкідливими, нейтральними	Поява поліплоїдних форм у популяції рослин і деяких тварин (комах, риб) призводить до репродуктивної ізоляції і утворенню нових видів, родів - мікроеволюції
комбінативна	Виникає при схрещуванні (гібридизації) батьківських форм; в нащадків з'являються	Поширення в популяції нових спадкових змін, які служать матеріалом для добору	схрещування білого і сірого кроля дає чорне потомство



	нові комбінації генів		
співвідносна (корелятивна, плейотропна)	Виникає в результаті здатності генів впливати на формування декількох ознак	цілісність ознак і властивостей організму як системи, взаємопов'язаність ознак	У столових сортів буряка одночасно змінюється забарвлення коренеплоду, черешків і жилок листка

**Спадкова мінливість** характеризується зміною генотипу внаслідок мутацій або перекомбінації генів під час злиття гамет, при заплідненні тощо. Зміни, спричинені спадковою мінливістю, успадковуються. Спадкова мінливість приймається синтетичною теорією еволюції як основа природного добору. Розрізняють спадкову мінливість комбінативну та мутаційну.

**Комбінативна спадкова мінливість** є результатом перекомбінації генів, хромосом та їх ділянок, що призводить до появи нових комбінацій алелей у нащадків (порівняно з батьками). Комбінативна мінливість ознак виникає внаслідок рекомбінації генів під час:

- незалежного розходження хромосом в анафазі I мейозу;
- випадкового сполучення материнських і батьківських хромосом при заплідненні;
- кросинговеру.

**Мутаційна спадкова мінливість** зумовлює зміну структури або кількості спадкового матеріалу клітин (генів, хромосом) та успадкування цих змін. Мутаційна мінливість виникає внаслідок мутацій: 1) *геномних*, обумовлених зміною кількості хромосом (поліплоїдія, гетероплоїдія); 2) *хромосомних* (делеція, дуплікація, інверсія, транслокація, транспозиція); 3) *генних* (зміна структури гена). При виникненні спонтанної або індукованої мутації у межах структурного гена – *цистрона* – амінокислотний склад білка, що синтезується, може змінитися; іноді така зміна зачіпає лише один амінокислотний залишок. В цьому випадку одиниці генної мутації – *мутону* - відповідає триплет ДНК із трьох нуклеотидів (кодон). Якщо ж мутація спричинила зміну не одного, а декількох амінокислотних залишків у молекулі білка, тоді мутону – одиниці генної мутації – відповідатиме не один, а декілька триплетів, що входять до складу цистрону, який контролює біосинтез даного білка.

**Неспадкова (модифікаційна) мінливість** – зміна ознак і властивостей, які в особин або в групі особин спричинені впливом зовнішніх факторів. Такі неспадкові ознаки не передаються в спадок і розвиваються в нащадків особини-носія цих ознак лише за наявності умов, в яких вони виникли.

Порівняльна характеристика форм мінливості представлена в таблиці:

Властивість	Неспадкова (модифікаційна) мінливість	Спадкова мінливість
Об'єкт змін	Фенотип у межах норми реакції	Генотип
Фактор виникнення	Зміна умов середовища	Рекомбінація генетичного матеріалу
Успадкування ознак	Не успадковуються (зберігається лише норма реакції)	Успадковуються

Значення для організму	Адаптація до умов середовища	Диференційне виживання носіїв корисних спадкових змін
Значення для виду	Сприяє виживанню та пристосуванню	Призводить до появи нових популяцій, видів
Роль в еволюції	Адаптація організмів	Матеріал для природного добору
Форма мінливості	Групова	Індивідуальна, комбінована
Закономірність	Статистична (варіаційний ряд)	Закон гомологічних рядів спадкової мінливості

#### 4.1. Модифікаційна мінливість

Мінливість є однією з основних властивостей біологічних систем, яка забезпечує пристосування організмів до умов середовища, еволюцію та різноманітність форм.

**Модифікаційна мінливість** – варіювання ступеню проявлення ознаки у генетично однорідних форм під впливом різноманітних умов середовища. Кожна ознака організму в різних умовах середовища може варіювати в вузьких або широких межах, які контролюються незмінним генотипом.

**Норма реакції генотипу** – діапазон варіювання ознаки за відсутності спадкових змін у генотипі. Норма реакції генетично детермінована, отже, якщо під дією навколишнього середовища вона розширюється, зміни в межах норми реакції успадковуються. Але самі зміни у фенотипі зазвичай не закріплюються в наступних поколіннях. Норма реакції визначається неповним домінуванням алелей в онтогенезі та можливим спектром експресії цих алелей у залежності від умов навколишнього середовища. Кожен вид має певні межі норми реакції. Наприклад, особину певного виду не можна вигодувати до маси, яка в багато разів перевищує середньостатистичну масу, властиву особинам даного виду. Для селекції найбільшу цінність представляють генотипи з широкою нормою реакції, яка забезпечує широку пристосувальну реакцію до мінливих умов середовища.

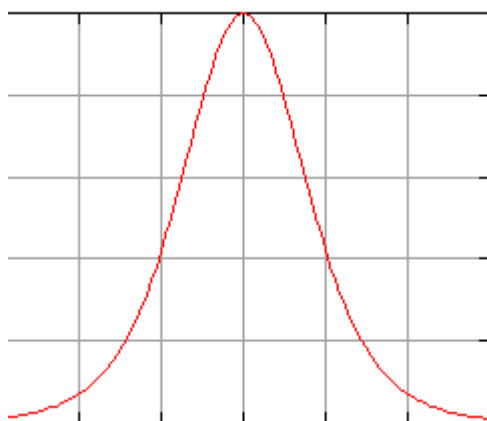
Модифікаційні зміни - **модифікації** - це реакції організмів на зміну інтенсивності дії певних чинників довкілля. Вони однакові для всіх генетично однорідних організмів. Істотним компонентом варіабельності ступеню проявлення ознаки є стадія онтогенезу (онтогенетична мінливість)

Кожний організм має індивідуальну мінливість, яка може бути двох типів: **кількісна** (визначається метричними мірами: вага, маса, зріст тощо) та **якісна** (забарвлення, форма насіння).

Іноді в нового фенотипу відбувається генокопіювання модифікацій - епігенетичне ремоделювання ділянок хроматину, що призводить до успадковування змін у фенотипі. Якщо такі зміни сприяють посиленню пристосованості до умов навколишнього середовища, то особина залишає потомство, і таким чином поступово всередині виду формується угруповання з певними адаптаціями. Модифікаційною мінливістю зумовлені індивідуальні особливості особин виду, що виникають у процесі їх постембріонального розвитку.

Особливістю модифікаційної мінливості є статистична закономірність варіаційних рядів — ранжированого відображення прояву неспадкової мінливості, яке складається з окремих значень ознаки, розміщених у порядку збільшення або зменшення її кількісного вираження.

Для вивчення мінливості певної ознаки складають **варіаційний ряд** (від лат. варіаціо — зміна) — послідовність кількісних показників проявлення станів певної ознаки (варіантів), розташованих у порядку їхнього зростання чи зменшення. Розподіл варіант усередині варіаційного ряду можна графічно зобразити у вигляді варіаційної кривої:



**Варіаційна крива** — це графічне зображення кількісних показників мінливості певної ознаки, яке ілюструє межі модифікаційної мінливості та частоту зустрічальності окремих варіант. За допомогою варіаційної кривої можна встановити середні показники і норму реакції певної ознаки. Довжина варіаційного ряду зумовлена генотипом організмів, але залежить від умов середовища: чим менш вони мінливі, тим коротший варіаційний ряд, і навпаки. Якщо простежити розподіл окремих варіант усередині варіаційного ряду, то можна помітити, що найбільша їхня кількість розташована в середній його частині. Наприклад, більшість людей має середній зріст, і лише незначна частина серед них — велетні або карлики.

Для вивчення ступеню та характеру модифікаційної мінливості використовують статистичний аналіз. Модифікаційну мінливість вивчають на підставі аналізу проявлення ознаки в групі особин. Вся група рослин або тварин, в яких дану ознаку вивчають, називається **генеральною сукупністю** ( $N$ ). На практиці мінливість ознаки вивчають не у всіх особин генеральної сукупності, а у частини їх — **вибірковій сукупності** ( $n$ ) або вибірки. Основними показниками, що характеризують ступінь мінливості даної ознаки, є стандартне відхилення ( $\sigma$ ), дисперсія ( $\sigma^2$ ), коефіцієнт варіації ( $V$ ).

### Лабораторна робота № 15 Біометричний аналіз модифікаційної мінливості

**Мета:** засвоїти сутність варіаційно-статистичного методу вивчення модифікаційної мінливості; навчитися визначати норму реакції варіюючої ознаки та можливі варіаційні відхилення; навчитися будувати варіаційний ряд та варіаційну криву.

**Обладнання та матеріали:** насіння різних видів (квасолі, кукурудзи, соняшника) листки (дуба, клена) або хвоїнки (сосни, ялини), лінійки, папір.

**Завдання 1.** Провести статистичний аналіз дискретного варіювання кількісної ознаки - кількості колосків у колосі пшениці.

**Хід виконання завдання 1:**

1. Кожним двом студентам методом випадкової вибірки взяти з снопа пшениці 100 рослин.

2. Підрахувати кількість колосків у колосі цих рослин, результати систематизувати в варіаційний ряд. Наприклад, у результаті підрахунку кількості колосків у 100 колоссях пшениці (одна вибірка) одержані такі первинні дані:

18	17	20	15	19	16	18	17	15	16
17	15	16	14	18	17	19	18	18	17
16	19	17	18	17	15	16	17	17	18
18	17	15	19	16	18	18	17	19	16
17	14	18	17	17	16	19	16	15	18
17	16	14	16	18	17	18	17	18	15
20	16	17	16	15	18	15	18	17	17
18	15	17	14	18	17	17	16	18	16
17	16	19	17	19	16	18	17	15	18
16	18	17	15	18	17	16	18	15	17

3. Скласти дискретний варіаційний ряд. Для цього окремі значення ознаки – варіанти – ранжирують і записують відповідні до них частоти. Первинні дані записують за прийнятим у біометрії шифром частот за методом квадратів.

Заповнити таблицю:

Варіації (x)	Запис результатів підрахунку методом квадратів	Частота (f)
20		
19		
18		
17		
16		
15		
14		

4. Накреслити криву варіаційного ряду (полігон розподілення ознаки). Для цього на горизонтальній вісі (осі абсцис) відкладають у певному масштабі одержані значення варіюючої ознаки (x) у вигляді точок. З цих точок ставлять пунктиром перпендикуляри (ординати), довжина яких виражає частоти варіюючої ознаки (f). Верхні вільні кінці ординат з'єднують лінією (рис.4.1).

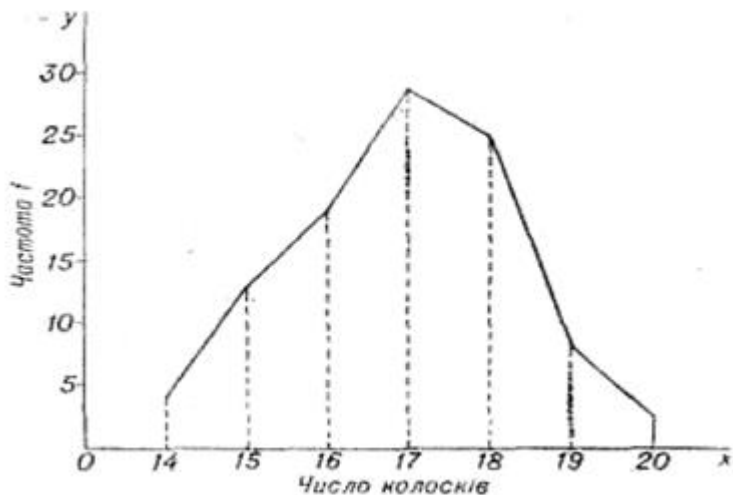


Рис. 4.1. - Крива дискретного варіювання ознаки кількість колосків у колосі пшениці (приклад)

5. Обчислити середнє арифметичне за формулою :  $x_{\text{середнє}} = (\sum x) : n$ ; де  $x$  – окреме значення варіюючої ознаки (варіація);  $n$  – сума всіх частот;  $\sum$  - знак суми. Середня арифметична ( $x$ ) характеризує середню величину ознаки вибіркової сукупності рослин, що вивчається. Просте середнє арифметичне – це частка від ділення суми всіх варіацій на їх число. Середнє, розраховане для значень ознаки з неоднаковими частотами, називається *зваженим середнім*. У цій роботі число колосків (частоти) неоднакове для кожної варіації, тому слід обчислити не просте, а зважене середнє арифметичне за формулою:  $x_{\text{середнє}} = (\sum fx) : n$ , де  $f$  – частота варіацій. Середнє арифметичне виражається в тих самих одиницях вимірювання, що й варіююча ознака.

6. Обчислити стандартне відхилення за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{(\sum f(x - x_{\text{середнє}})^2) : n};$$

де  $\sigma$  - стандартне відхилення;

$x - x_{\text{середнє}}$  – відхилення варіації від середнього арифметичного;

$(x - x_{\text{середнє}})^2$  – квадрат відхилення;

$\sum f(x - x_{\text{середнє}})^2$  – сума добутків частот на квадрати відхилень;

$n$  – вибірка.

У тих варіаційних рядах, де частоти варіацій однакові, стандартне відхилення обчислюють, не враховуючи частоту варіації ( $f$ ).

7. Заповнити таблицю:

Кількість колосків у колосі (x)	Частота (f)	Відхилення від середнього арифметичного ( $x - x_{\text{середнє}}$ )	Квадрат відхилення ( $(x - x_{\text{середнє}})^2$ )	Добуток частоти на квадрат відхилення $f(x - x_{\text{середнє}})^2$
20				
19				
18				
17				
16				
15				

14				
$x_{\text{середнє}}$			$\Sigma =$	

**Примітка.** Стандартне відхилення має ту ж саму розмірність, що й варіююча ознака та середнє арифметичне. Будь-яка ознака при варіюванні практично відхиляється від середнього арифметичного не більше, ніж на  $\pm 3 \sigma$ . Тому потрійне значення стандартного відхилення прийнято вважати крайньою помилкою окремого спостереження. Шестикратне значення сигми (від  $-3\sigma$  до  $+3\sigma$ ) є амплітудою коливання варіюючої ознаки. Наприклад, середня кількість колосків у колосі пшениці певного сорту становить 16,9 (із 100 колосся); стандартне відхилення  $\sigma = +1,35$  колоска. Межі, в яких можливе варіювання кількості колосків, такі:  $x_{\text{середнє}} + 3 \sigma$  ( $3\sigma = 3 \times 1,35 = 4,05$ ), тобто в цьому прикладі  $16,9 + 4,05 = 20,95$  колоска. Це – максимальна кількість колосків. Мінімальна –  $x - 3\sigma = 16,9 - 4,05 = 12,85$  колоска.

Якщо б у вибірці зі 100 колосів були такі, в яких колосків 11 або 23, то це б означало, що в вибірку потрапили рослини іншого сорту пшениці або ті, які виростили в інших умовах. У селекційній роботі завжди враховують ступінь мінливості ознак у рослин, стосовно яких ведуть селекцію. Попереднє вивчення вихідного матеріалу дає можливість виявити ознаки, які менше варіюють.

8. Визначити коефіцієнт варіації ( $V$ ) – відношення стандартного відхилення до середнього арифметичного, виражене в процентах:

$$V = \sigma : x_{\text{середнє}} \times 100\%$$

Мінливість є незначною, якщо  $V < 10\%$ ; середньою, якщо  $V > 10\%$ , але нижче  $20\%$ ; значною, якщо  $V > 20\%$ . Для порівняння різних варіюючих ознак коефіцієнт варіації визначається для кожної ознаки окремо.

9. Визначити похибку середнього арифметичного за формулою:

$$m = \sigma : \sqrt{n},$$

де  $m$  – похибка середнього арифметичного;

$\sigma$  - стандартне відхилення;

$n$  – кількість варіант (вибірка).

Середня похибка вимірюється в тих самих одиницях, що й середнє арифметичне. Вона приписується до відповідного середнього через знак  $\pm$ . Встановлено, що потрійна похибка є граничною похибкою середнього арифметичного.

При статистичному аналізі розподілення дискретної ознаки оцінку генеральної середньої можна записати в вигляді  $x_{\text{середнє}} \pm s_{x_{\text{середнє}}}$ . Це означає, що  $x_{\text{середнє}}$  – оцінка генеральної середньої з похибкою, що дорівнює  $s_{x_{\text{середнє}}}$ .

**Завдання 2.** Провести статистичний аналіз безперервного варіювання ознаки довжина колоса пшениці.

**Хід виконання завдання 2:**

1. Кожним двом студентам методом випадкової вибірки взяти з снопа пшениці 100 рослин.

2. Виміряти довжину колоса цих рослин (приклад):

11,0	7,0	7,2	7,5	10,0	10,1	10,2	9,4	9,9	9,5
10,3	9,6	9,9	9,8	9,5	9,7	9,6	9,4	9,7	9,9
10,4	9,5	9,8	9,4	9,7	9,6	8,8	9,0	9,3	9,2
10,5	8,9	9,1	10,3	9,2	9,3	9,0	8,8	9,2	8,9

8,8	9,0	9,2	9,1	9,3	9,0	8,9	9,1	8,8	9,3
8,2	7,6	8,1	8,0	7,9	7,5	8,0	8,1	7,7	7,7
8,7	8,4	8,6	8,5	8,2	8,3	8,7	8,3	8,5	8,3
8,5	8,2	8,7	8,2	8,7	8,5	7,6	8,6	8,3	8,8
8,2	8,7	9,0	9,2	8,8	9,1	9,3	8,9	8,2	8,7
8,8	9,0	9,2	8,8	9,3	9,2	8,8	9,3	9,1	9,0

3. Отримані дані згрупувати у варіаційний ряд. При безперервній кількісній мінливості варіанти слід групувати в класи. Кількість класів залежить від кількості спостережень та обсягу вибіркової сукупності ( $n$ ). При цьому керуються такими орієнтовними вказівками щодо кількості класів:

*кількість варіантів*

*кількість класів*

30-100

6-8

більше 100

8-12

Розбивати варіаційний ряд менше ніж на 6-8 класів недоцільно, оскільки при більшій кількості класів обчислення бувають точнішими. Розподілити значення (варіанти) ознаки за класами можливо таким чином: знайти різницю між найбільшим і найменшим значеннями ознаки та поділити одержану різницю на вибрану кількість класів. Частота від ділення є величиною *класового проміжку* ( $i$ ).

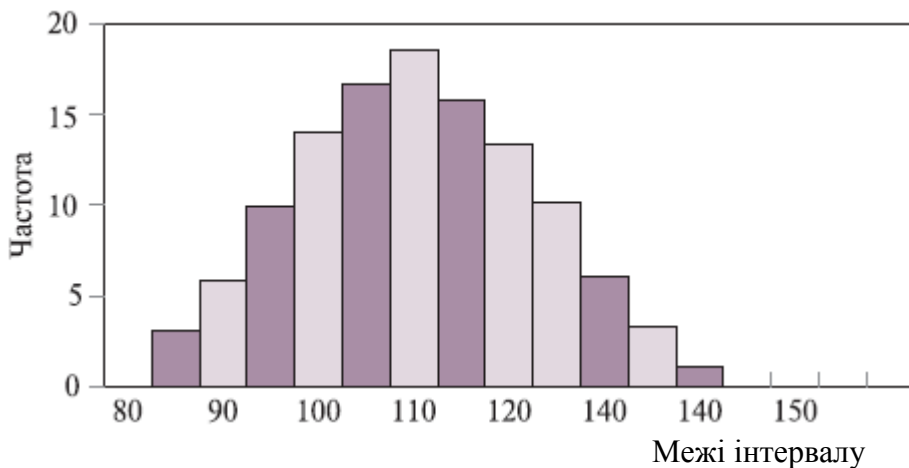
Середнє значення варіацій класів називається *класовою варіацією* ( $x_v$ ). Класова варіація – це середнє арифметичне початку даного та початку наступного, більшого, класу. Наприклад, при вимірюванні довжини 100 колосків пшениці отримали результати в межах 7,0-11,2 см. Найбільша варіація  $x_{\max} = 11,2$  см, найменша –  $x_{\min} = 7,0$  см.  $x_{\max} - x_{\min} = 11,2 \text{ см} - 7,0 \text{ см} = 4,2 \text{ см}$ . Знайдене число 4,2 см зручно поділити на 7 класів. Класовий проміжок ( $i$ ) у цьому прикладі дорівнюватиме 0,6 см.

Намічаємо межі класів. Нижня межа першого класу дорівнює найменшій величині (7,0 см), а всіх наступних класів – сумі величин нижньої межі попереднього класу і класового проміжку ( $7,0+0,6=7,6$ ;  $7,7+0,6=8,3$  і т.д). Після цього обчислюємо середину класів (класові варіації). Для першого класу  $x_v = (7,0 + 7,6) : 2 = 7,3$  см; для другого  $x_v = (7,6 + 8,2) : 2 = 7,9$  см тощо.

4. Записати всі варіації в таблицю:

Класи (см)	Класові варіації ( $x_v$ )	Запис результатів розрахунку методом квадратів	Частоти (f)
7,0 – 7,6			
7,7 – 8,3			
8,4 – 9,0			
9,1 – 9,7			
9,8 – 10,5			
10,6 – 11,2			

5. Накреслити криву створеного варіаційного ряду в вигляді гістограми (рис.4.2).



**Рис. 4.2.** - Крива безперервного варіювання ознаки довжина колосу пшениці (приклад)

При побудові кривої безперервного варіювання ознаки, як і при дискретній мінливості, на горизонтальну вісь (вісь абсцис) треба нанести значення класів (точки, рівновіддалені одна від одної) і проти кожного значення по вертикалі (осі ординат) вгору відкласти частоти. Дістаємо східчастий графік, у якому ширина стовпчиків дорівнює інтервалам класів. На відміну від кривої дискретної мінливості, яка сполучає верхні довільні кінці ординат, у цьому випадку крива проходить через середні значення класів.

6. Визначити середнє арифметичне. На відміну від обчислення середнього арифметичного при дискретній мінливості, в цьому випадку окремі значення варіюючої ознаки ( $x$ ) замінюються середніми значеннями варіації класу  $x_v$ :

$$X_{\text{середнє}} = \sum f x_v : n$$

7. Обчислити стандартне відхилення. Для безперервного варіаційного ряду стандартне відхилення визначають за формулою:

$$\sigma = \pm \sqrt{\sum f (x_v - x_{\text{середнє}})^2 : n - 1};$$

де  $\sigma$  - стандартне відхилення;  $f$  - частота варіації;  $\sum f (x_v - x_{\text{середнє}})^2$  - сума добутків частот на квадрати відхилень;  $n$  - кількість варіант у вибірці.

Крайнє відхилення визначається потрійними значеннями стандартного відхилення  $\pm 3\sigma$  (наприклад,  $3\sigma = 3 \times 0,72 = 2,16$  см). Звідси варіювання довжини колоса пшениці при середньому арифметичному, що дорівнює 9 см, знаходиться у межах  $9,0 - 2,16 = 6,84$  см і  $9,00 + 2,16 = 11,16$  см.

8. Обчислити коефіцієнт варіації. При безперервній мінливості, як і при дискретній, коефіцієнт варіації визначають за формулою:

$$V = \sigma : X_{\text{середнє}} \times 100\%,$$

де  $V$  - коефіцієнт варіації;  $\sigma$  - стандартне відхилення;  $X_{\text{середнє}}$  - середнє арифметичне.

9. Обчислити похибку середнього арифметичного за формулою:

$$m = \sigma : \sqrt{n},$$

де  $m$  - похибка середнього арифметичного;  $\sigma$  - стандартне відхилення;  $n$  - кількість варіант (об'єктів вибірки).

Середня похибка вимірюється в тих самих одиницях, що й середнє арифметичне. Вона приписується до відповідного середнього через знак  $\pm$ .



Встановлено, що потрібна похибка є граничною похибкою середнього арифметичного.

У випадку безперервної ознаки оцінку генеральної середньої можна записати в вигляді  $\bar{x} \pm t_{s_{\bar{x}}}$ . Такий інтервал називають *довірчим*. Довірчий інтервал із заданою ймовірністю покриває параметр, що оцінюється. Значення  $t_{s_{\bar{x}}}$  – це гранична похибка вибіркової середньої при даному числі ступенів свободи та прийнятому рівні значимості ( $t$ -критерій Ст'юдента, визначається за таблицею).

Про суттєвість чи несуттєвість відмінностей між середніми арифметичними двох сортів або варіантів дослідження також судять за критерієм суттєвості різниці ( $t$ -критерієм Ст'юдента) за результатами розрахунків по формулі:  $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s^2_{x1} + s^2_{x2}}} = d : s_d$ .

Якщо  $t_{\text{факт}} \geq t_{\text{теор}}$ , нульова гіпотеза про відсутність суттєвих відмінностей між середніми відкидається, якщо  $t_{\text{факт}} \leq t_{\text{теор}}$ , відмінності знаходяться в межах випадкових коливань для прийнятого рівня значущості.

**Завдання 3.** Розв'язати задачі:

1) Чим відрізняються два розподілення з наступними параметрами:

$x_1=3,5$  см;  $\sigma_1 = \pm 0,35$  см;  $x_2=3,5$  см;  $\sigma_2 = \pm 0,70$  см?

2) Відомо, що у відібраному зразку число колосків у головному колосі пшениці  $x = 17,5$ ,  $\sigma = \pm 1,5$ . Чи може належати цьому зразку колос, який має 28 колосків?

3) Яку висоту матиме найвища сосна, якщо  $x = 22,5$  м,  $\sigma = \pm 1,5$  м?

4) Визначити межі для середньої арифметичної генеральної сукупності, якщо в вибірці одержано  $x = 7,86$  см,  $\sigma = \pm 1,32$  см,  $n=500$ .

### ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке модифікаційна мінливість?
2. Чим характеризуються модифікаційні зміни?
3. Чим відрізняються модифікації від морфозів? Фенокопій?
3. Які типи мінливості ви знаєте?
4. Що таке норма реакції генотипу?
5. Які групи біометричних показників використовуються для аналізу модифікаційної мінливості?
6. Що таке середня арифметична? Що характеризує?
7. Що таке стандартне відхилення? Навести його значення.
8. Яке значення має коефіцієнт варіації для характеристики модифікаційної мінливості?
9. Що таке довірчий інтервал і як він використовується при оцінці генеральної середньої?
10. Як визначають достовірність відмінностей між середніми арифметичними двох сортів або варіантів дослідження?
11. Чому більшість модифікацій має адаптивне значення?
12. Що визначає норму реакції організмів?
13. Що таке варіаційний ряд і варіаційна крива?
14. Підрахувати частоту пульсу студента групи протягом дня з 7 до 22 годин 50 разів. Показання пульсу запишіть у таблицю. Визначте середнє значення цієї ознаки та побудуйте варіаційну криву.

## 4.2. Мутаційна мінливість

Для генетичного аналізу спадкування ознак у мутантів зручно користуватися класифікацією мутацій, що базується на методах біохімічного аналізу або спостереження. За цією класифікацією мутації поділяють на три групи:

- 1) ті, що виявляються біохімічними методами. Так аналізують природу генних мутацій, тобто встановлюють наявність заміни азотистих основ (трансверсій або транзицій), вставок чи втрат окремих нуклеотидів (зсув рамки зчитування);
- 2) ті, що визначаються цитологічними методами: хромосомні (транслокації, інверсії, дуплікації, делеції (цитологічно спостерігаються як фрагменти або мости) та геномні (поліплоїдія та анеуплоїдія).
- 3) ті, що досліджуються методами гібридологічного аналізу. Так вивчають практично всі типи мутацій: генні, хромосомні (транслокації, інверсії, дуплікації, делеції), геномні (поліплоїдії і анеуплоїдії).

### Лабораторна робота № 16

#### Генетичний аналіз успадкування множинних алелей гена. Функціональний критерій алелізму

**Мета заняття:** ознайомитися з явищем множинного алелізму, особливостями спадкування серії множинних алелей, сутністю функціонального критерію алелізму (цис-транс тест).

**Матеріали та обладнання:** рисунки та електронні мікрофотографії нормальних та мутантних форм дрозофіл; ілюстрована колекція ліній дрозофіли, які відрізняються забарвленням очей; ілюстрована колекція забарвлення листя конюшини білої; ілюстрована колекція кролів із різним забарвленням хутра; картки-фотографії «Мутантні форми дрозофіли», схема «Класифікація типів мутацій». Мікроскопи «Біолам», цитологічні мікропрепарати: «Дрозофіла – норма», «Мутація дрозофіли – чорне тіло», «Мутація дрозофіли – безкрила форма».

**Завдання 1.** За допомогою світлового мікроскопу розглянути постійні мікропрепарати дрозофіли (*Drosophila melanogaster* L.), порівняти нормальний фенотип мухи з мутантним за ознаками забарвлення тіла та форми крил. 2. Визначити тип мутацій за загальноприйнятою класифікацією. 3. Розглянути інші мутантні варіанти дрозофіл (рис.4.3 та рис. 4.5), порівняти з диким фенотипом - варіантом норми (рис. 4.4).

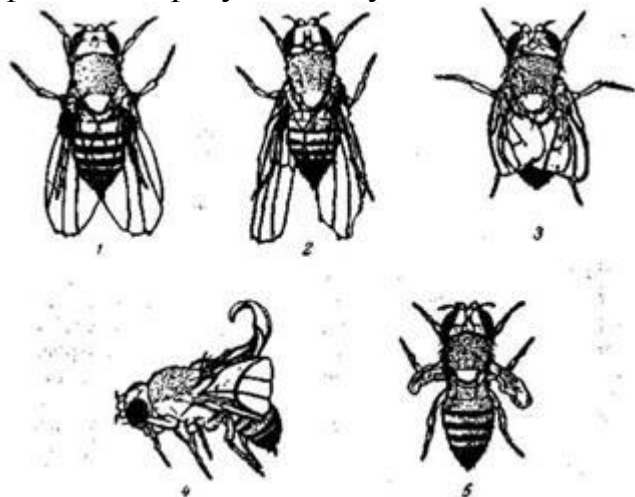
**Пояснення до завдання 1.** *Мутації* (від лат. мутатіо - зміна) – стійкі зміни генотипу, які виникають раптово і призводять до зміни тих чи інших спадкових ознак організму. Вчення про мутації сформулював голландський учений Г. де Фріз (1845 – 1935), який і запропонував сам термін. Подальші дослідження показали, що виникнення мутацій характерне для всіх живих організмів незалежно від рівня їх організації. Де Фріз посадив завезену з Америки рослину енотери (*Oenothera lamarckiana*) і протягом 10 років дослідив 53 000 нащадків цієї рослини, з яких приблизно 800 (тобто 1,5%) мали відхилення від вихідного типу. Ці відхилення були названі вченим *мутаціями*. В 1903 році він опублікував свою

наукову роботу «Мутаційна теорія», в якій прийшов до висновку, що нові фенотипи виникають не шляхом поступового накопичення безперервних невеликих змін (як вважали послідовники Чарльза Дарвіна), а шляхом раптової появи нової ознаки. Пізніше з'ясувалося, що в ході експерименту де Фріза рослини еотери не вищепляли мутації, а показували складну комбінативну мінливість, оскільки ці форми були складними гетерозиготами за транслокаціями.

Основні положення мутаційної теорії Де Фріза залишаються справедливими донині (з деякими сучасними уточненнями):

Положення мутаційної теорії	Сучасні уявлення
Мутації виникають раптово	виявлений особливий тип мутацій, які накопичуються протягом низки поколінь (прогресуюча ампліфікація в інтронах)
Частота виявлення мутацій залежить від кількості проаналізованих особин	без змін
Мутантні форми стійкі, зміни умов середовища не впливають на частоту їх проявлення	При умові 100%-ної пенетрантності (мутантному генотипу відповідає мутантний фенотип) і 100%-ної експресивності (та ж сама мутація проявляється в різних особин однаково)
Мутації характеризуються дискретністю; це якісні зміни, котрі, на відміну від неспадкових змін, не утворюють безперервних рядів, вони не групуються навколо середнього типа (моди)	існують лікові мутації (мутації, що розтікаються) – це форма місенс-мутацій, при якій мутантний фермент має знижену активність, або знижений рівень його синтезу; у регуляторних елементах генів зумовлюють неповне блокування їх експресії
Подібні мутації можуть виникати неодноразово	це стосується генних мутацій; хромосомні аберації унікальні та неповторні
Мутації виникають у різних напрямках, вони можуть бути шкідливими та корисними	самі мутації не носять адаптивний характер; тільки в ході еволюції, добору оцінюється «корисність», «нейтральність» чи «шкідливість» мутацій у певних умовах; при цьому «шкідливість» чи «корисність» мутацій залежить від генотипу

**Мутантом** називається організм, який набув якусь нову ознаку, змінив свій фенотип в результаті мутації.



**Рис. 4.3.** - Деякі мутації *Drosophila melanogaster*, що проявляються переважно в порушенні нормальної будови крил. Всі самки (за Т. Морганом, 1919). 1 — notch (ущільнені поздовжні

жилки крила), 2 — beaded (розрізані крила), 3 — rudimentary (вкорочені крила), 4 — curled (загнуті догори крила), 5 — vestigial (зачаткові крила)

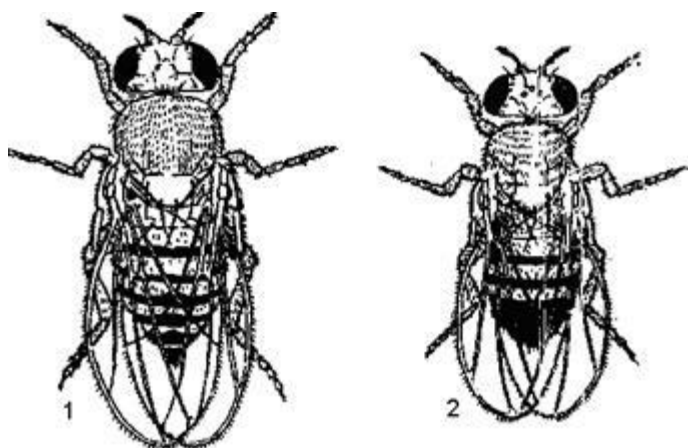


Рис. 4.4. - Дрозофіла (варіант норми): 1 - самка: 2 – самець

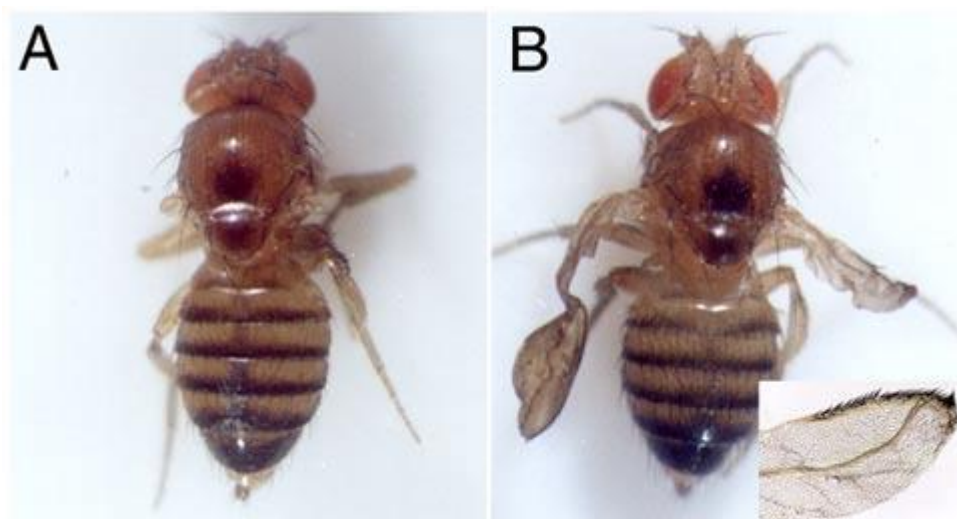
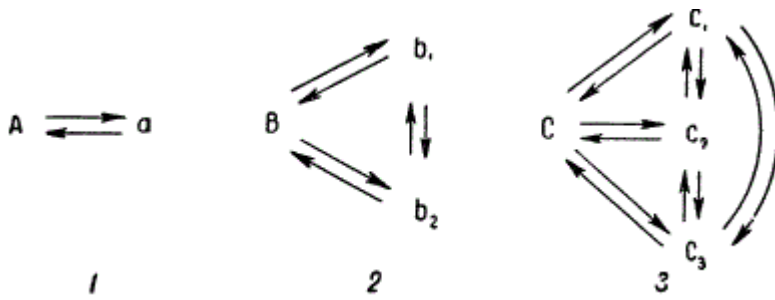


Рис. 4.5. - А – мутація apterous - безкрила форма дрозофіли; В – мутація cut - обрізані крила

**Завдання 2.** Визначити сутність явища множинного алелізму. Записати в зошит серії множинних алелей генів, що контролюють забарвлення очей дрозофіли, забарвлення шерсті в кролів, морських свинок, форму та розміри сивих плям на листках конюшини білої (дидактичні картки).

**Пояснення до завдання 2.** Донині при викладанні навчального матеріалу ми виходили з положення, що певний локус гомологічних хромосом представлений двома алелями, наприклад, А і а, В і в, С і с тощо. Ці два стани локусу виникають внаслідок прямих і зворотних мутацій. Але частіше той самий ген може змінюватися в декілька станів; іноді їх буває декілька десятків і навіть сотень. Ген А може мутувати з виникненням алелей  $a^1, a^2, a^3, \dots, a^n$ ; ген В в іншому локусі хромосоми - з утворенням алелей  $b^1, b^2, b^3, \dots, b^n$ . Мутації того ж самого локусу називають *серією множинних алелей*, а саме явище — *множинним алелізмом*. Виникнення серії множинних алелей схематично можна проілюструвати таким чином (рис. 4.6):



**Рис. 4. 6.** - Виникнення серії множинних алелей: 1 – два алелі одного гена (прямі  $A \rightarrow a$  та зворотні  $a \rightarrow A$  мутації); 2 – серія з трьох алелей; 3 – серія з чотирьох алелей (стрілками вказаний напрям мутування)

Вивчення мутацій серії множинних алелей показало, що:

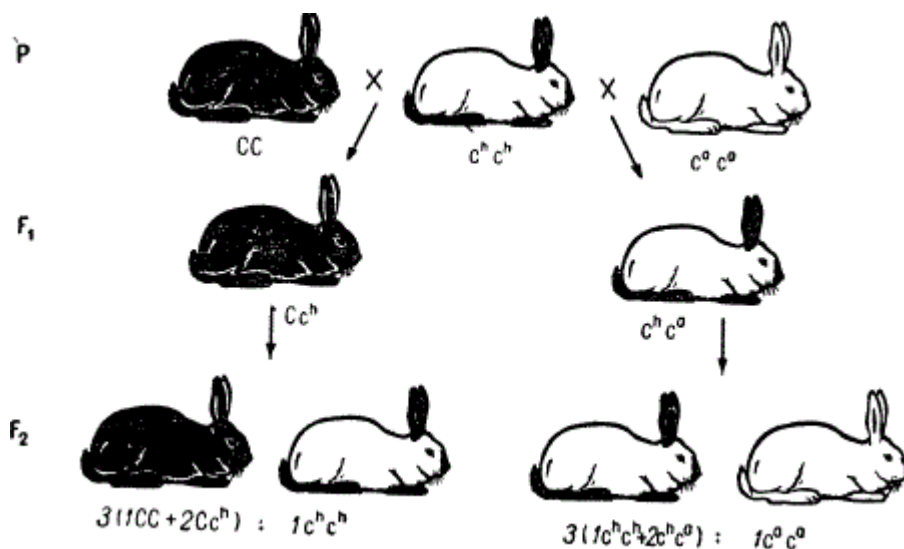
- 1) будь-який алель серії може виникати в результаті мутації безпосередньо від алеля дикого типу або будь-якого іншого члена цієї серії;
- 2) будь-який алель серії може мутувати в інший як в прямому, так і в зворотному напрямку;
- 3) кожен з членів серії множинних алелей має свою характерну частоту мутування;
- 4) серії множинних алелей в різних локусах можуть мати різну кількість членів.

Спадкування членів серії множинних алелей підпорядковується менделівським закономірностям. При цьому:

- 1) в генотипі серія множинних алелей у кожного диплоїдного організму може бути представлена лише двома будь-якими її членами, наприклад:  $Aa^1$ ,  $Aa^2$ ,  $a^1a^2$ ,  $a^1a^3$ ,  $a^2a^2$  і т.д.;
- 2) кожен із членів серії може повністю або не повністю домінувати над іншим її членом, наприклад:  $A > a^1 > a^2 > a^3$  і т. д.
- 3) члени однієї серії контролюють ту ж саму ознаку; одночасно вони можуть мати множинний ефект.

Розглянемо більш докладно спадкування серії алелей одного гена, а також наведемо факти множинного алелізму.

У гризунів, зокрема у кролів, існує серія множинних алелей за забарвленням шерсті: чорний, шиншила, гімалайський, горностаєвий, неповний альбінос і повний альбінос (білий кролик із червоними очима). При схрещуванні чорних кролів з гімалайськими, які мають на фоні загального білого забарвлення шерсті чорні кінчики вух, лап, хвоста і морди, в  $F_1$  все потомство виявляється чорним. У другому поколінні гібридів спостерігається розщеплення у співвідношенні 3/4 чорних до 1/4 гімалайських. Схрещування гімалайського кроля з альбіносом дає гібридів  $F_1$  з ознаками гімалайського кроля, а в  $F_2$  спостерігається розщеплення: 3/4 гімалайських та 1/4 альбіносів (рис. 4.7).



**Рис. 4.7.** - Спадкування ознаки, що контролюється генами серії множинних алелей у кролів:  $C$  – чорне забарвлення кроля;  $c^h$  – гімалайське забарвлення;  $c^a$  - альбінос

Отже, кожна пара членів даної серії веде себе при розщепленні як одна алельна пара. Якщо б члени серії були неалельними, то повинно було відбуватися розщеплення, відповідне до дигібридного або полігібридного схрещування. Однак цього не спостерігається. При перевірці інших мутацій у цій серії у всіх випадках має місце моногенне спадкування.

Зазвичай таку серію алелей позначають за назвою ознаки, вперше знайденої, або за загальним характером дії даного локусу, здатного мутувати в різні стани. Так, наприклад, серія множинних алелей гімалайського альбінізму у кролика позначається: літерою  $C$  — чорний, а члени ряду в гомозиготному стані  $c^h c^h$  — шиншилове забарвлення;  $c^h c^h$  — гімалайський альбінос,  $c^a c^a$  — повний альбінос.

На відміну від генів, для яких відомі тільки два алельних стани, поєднання двох різних членів серії множинних алелей в гетерозиготі, наприклад,  $c^h c^a$ , називають **компаундом**. Члени ряду серії алелей не тільки по-різному визначають розвиток ознак, але і вступають в різні домінантно-рецесивні відносини один з одним, про що було згадано вище. Часто домінування при цьому неповне. Так, наприклад, компаунд за шиншиловим забарвленням і гімалайським або за шиншиловим і альбіносом ( $c^h c^h$  або  $c^h c^a$ ) дає світло-сіре забарвлення, типове для шиншили, а компаунд  $c^h c^a$  — фенотип гімалайського кроля.

Американський генетик Меллер запропонував класифікувати мутації за характером зміни функціонування гена на **гіпоморфні** (змінені алелі діють в тому ж самому напрямку, що й алелі дикого типу, але синтезується менше білкового продукту), **аморфні** (мутація виглядає як повна втрата функції гена, наприклад, мутація white у дрозофіли), **антиморфні** (мутантна ознака змінюється, наприклад, забарвлення зерна кукурудзи змінюється з пурпурового на буре) і **неоморфні**. Альбінізм кроля виявляється рецесивним по відношенню до всіх членів даної серії. Алель альбінізму з раніше наведеної класифікації Меллера є аморфною мутацією, а алель гімалайського забарвлення — гіпоморфною мутацією.

Градуальний (проміжний) прояв членів серії множинних алелей в компаунді спостерігається в тих випадках, коли мутантні гени відносяться до різних типів дії: аморфний — гіпоморфний і т. д. У морської свинки, наприклад, так само, як і в

кроля, існує серія множинних алелей за забарвленням шерсті. Забарвлення шерсті виявляється різним у залежності від поєднання членів даної серії. С. Райт і його співробітники вивчили у морської свинки кількість основного пігменту, що обумовлює забарвлення шерсті. Серія алелей забарвлення складається з гена С та його мутантних алелей:  $c^k$ ,  $c^d$ ,  $c^r$  і  $c^a$ . Алель С домінує над усіма, а  $c^a$ , який зумовлює альбінізм, є рецесивним по відношенню до всіх інших членів даної серії, що визначають проміжну пігментацію шерсті. На підставі колориметричного дослідження екстрактів меланіну з шерсті морських свинок різних компаундів даної серії вдалося встановити градуальну дію мутацій.

Кількість мутантних алелей даного гена може бути досить великою. Так, наприклад, за геном забарвлення очей у дрозофіли відома серія алелей з 12 членів. Всі ці алелі в компаунді в певній послідовності дають проміжне забарвлення очей і домінують над аморфним геном  $w$  (білі очі). Нижче наводяться відомості про фенотипний прояв алелей (колір очей) цієї серії і їхні символи:

білий .....	$w$	абрикосовий .....	$w^a$
вишневий .....	$w^{ch}$	крававий .....	$w^{bl}$
еозиновий .....	$w^e$	червоний (дикий тип) .....	$w^+$
кораловий .....	$w^{co}$	колір слонової кістки .....	$w^i$
пурпурний .....	$w^p$	слабко забарвлений .....	$w^t$
темно-жовтий .....	$w^{bf}$		
медовий .....	$w^h$		

Серії множинних алелей того ж самого гена встановлені в великій рогатій худоби, кролів, мишей, морських свинок, дрозофіли, а також у кукурудзи, тютюну, гороху та ін. Поширеність цього явища серед тварин, рослин і мікроорганізмів обумовлена тим, що множинний алелізм збільшує резерв мутаційної мінливості в еволюції, тому він набув пристосувального значення.

У спадковому визначенні антигенів крові системи АВО в людини бере участь серія множинних алелей, що складається щонайменше з трьох членів:  $I^A$ ,  $I^B$ ,  $I^O$ . Нині генетичні дослідження груп крові, тобто встановлення генів, що визначають антигенні відмінності, вказують, що кожна група залежить від цілого ряду алелей однозначної дії ( $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$  або  $B^1$ ,  $B^2$ ,  $B^3$  і т. д.). Крім того, деякі автори вважають, що існують люди з генотипами  $i^0 i^0$  (група 0), еритроцити котрих мають антигенні властивості та відповідні антитіла. Групи крові у великій рогатій худоби також визначаються серіями множинних алелей. Вивчення спадкової детермінації груп крові становить предмет дослідження надзвичайно перспективної галузі генетики - **імуногенетики**. В генетично близьких видів зустрічаються подібні серії алелей (наприклад, в межах ряду гризунів та ін), що свідчить про гомологію спадкової мінливості ідентичних локусів хромосом у споріднених видів.

**Завдання 3.** Ознайомитися із сутністю функціонального критерію алелізму. Переписати в зошит рисунки з поясненням алельності-неалельності генів (цис-транс тест) (рис. 4.8).



**Пояснення до завдання 3.** Однакові ознаки (фенотипи) можуть контролюватися різними генами. Наприклад, яскраві очі в дрозофіли контролюють гени **v**, **cn**, **cd** та ін. Очі абрикосового забарвлення  $w^a$ , коралового  $w^{co}$ , вишневого  $w^{ch}$  детермінуються алелями одного локусу – white. Тому при аналізі гена в першу чергу слід в'ясувати, чи є мутантні ознаки результатом мутації одного гена або різних, тобто вирішити проблему алельності.

У 1929-1930 рр. у роботах А. С. Серебровського та його молодих співробітників (М. П. Дубініна, Б. М. Сидорова) було вперше поставлено питання про функціональну складність гена. Автори досліджували серію множинних алелей у локусі дрозофіли *scute*, локалізованого на нульовій морганіді статевої хромосоми. Мутації  $sc^1$ ,  $sc^2$ ,  $sc^3$ , інші мутації цього локусу обумовлюють редукцію різних щетинок на тілі мухи. Ними проведено ретельне вивчення фенотипних ефектів, спричинених мутаціями цього локусу при їхньому комбінуванні. При схрещуванні особин, гомозиготних за тим чи іншим мутантним алелем, наприклад  $sc^1//sc^1$  x  $sc^2//sc^2$  з'ясувалася цікава картина: у гетерозигот були відсутні лише ті щетинки, які були редуковані в обох гомозигот  $sc^1/sc^1$  і  $sc^2/sc^2$ . Так, наприклад, якщо одна мутація ( $sc^1$ ) викликала редукцію щетинок ABC, а інша ( $sc^2$ ) — редукцію щетинок BCD, то у гетерозиготи  $sc^1/sc^2$  відсутні щетинки B і C, а щетинки A і D були. Створювалося враження, що в даному випадку мова йде про часткову гетерозиготність, коли частини мутантних алелей, які обумовлюють фенотип, опиняються в гомозиготному стані. Всього було досліджено 13 різних мутацій в локусі, при їх поєднанні спостерігалася та ж сама закономірність. Якщо цю закономірність представити графічно, то утворюється немов би сходи, сходинками якої служать різні алелі  $sc$ :

$sc^1$  — ABC

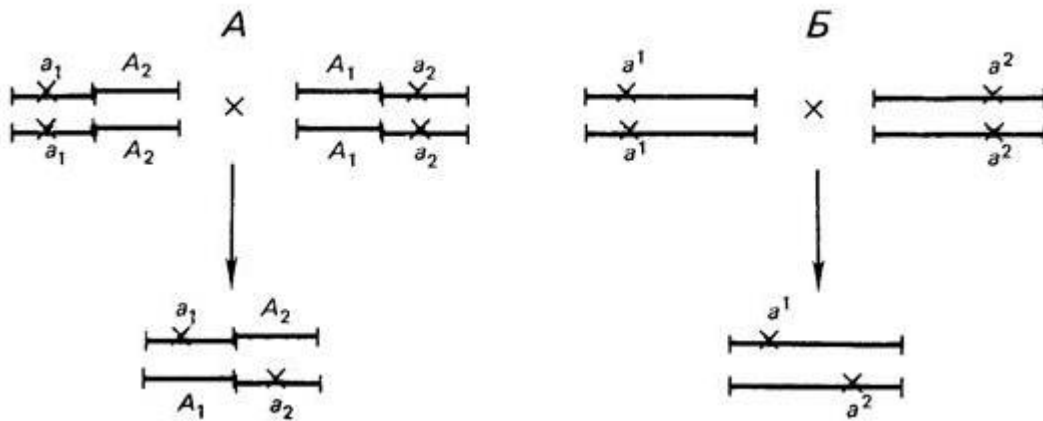
$sc^2$  — BCD

$sc^3$  — CDE

Тому описане явище отримало назву **ступінчастого алелізму**. Згідно з гіпотезою авторів, ген представлявся як основа **базигена** (базиген - весь комплекс функціональних ефектів гена), складений із частин — **трансгенів**. Природним є питання: як практично визначити, чи алельними є дві будь-які незалежно виниклі мутації? Який критерій алелізму?

Вперше на ці питання відповів Т. Морган. Він розглядав два критерії алелізму для рецесивних мутацій: функціональний і рекомбінаційний. Функціональний критерій ґрунтується на тому, що при схрещуванні двох мутантів, які несуть зміни різних генів, виникає гібрид першого покоління — дигетерозигота, яка має дикий фенотип в силу домінування нормальних алелей кожного з генів. При цьому досліджувані рецесивні мутації є комплементарними одна одній. Але якщо мутанти, що схрещуються, несуть в компаунді алельні мутації, то дикий тип не з'являється, оскільки обидва алелі того ж самого гена, що знаходяться в гомологічних хромосомах, несуть мутаційні зміни, отже, не є комплементарними. Пізніше Е. Льюїс запропонував так званий **цис-транс-тест на алелізм**. Сутність тесту в тому, що при схрещуванні двох особин з мутаціями в негомологічних ділянках хромосоми виникає зигота з транс-конфігурацією цих мутацій  $a^1/a^2$  (**рис. 4.8**).





дикий тип (гетерозигота)  
(мутації  $a_1$  та  $a_2$  неалельні)

мутант (гетероалельна комбінація,  
або компаунд) (мутації  $a_1$  та  $a_2$  алельні)

**Рис. 4.8.** – Функціональний критерій алелізму: А – мутації у різних генах; Б – мутації в одному гені (хрестиками позначені мутації)

Такі мутації є комплементарними та неалельними, оскільки з'являється гібрид дикого типу, отже, мутації відбулися в двох різних генах. Якщо ж гібрид має мутантний фенотип, це означає, що обидві мутації торкнулися того ж самого гена, тобто є алельними. Таким чином, цис-транс-тест зводиться фактично до транс-тесту, тобто до функціонального критерію алелізму, запропонованого ще Морганом.

**Завдання 4.** Експериментально одержати мутації із використанням фізичних мутагенів - ультрафіолетових променів кварцової лампи (завдання 4 виконується в позааудиторний час).

**Хід виконання завдання 4:** 1) Проростити насіння певного виду рослин у чашках Петрі (30-50 в чашці);

2) опромінити УФ-променями (кварцова лампа) набухлих насінин. Час впливу фактора необхідно збільшувати через кожний інтервал (5 хвилин) між варіантами до максимум 45 хвилин;

3) поставити насіння на пророщування;

4) простежити за появою корінців, сім'ядолей (або колеоптиле), виміряти довжину корінців (мм). Результати занести в таблицю:

Варіант	Час опромінення (хвилин)	Довжина корінця, мм						
		Діб після опромінення:						
		2	4	6	8	10	12	14
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

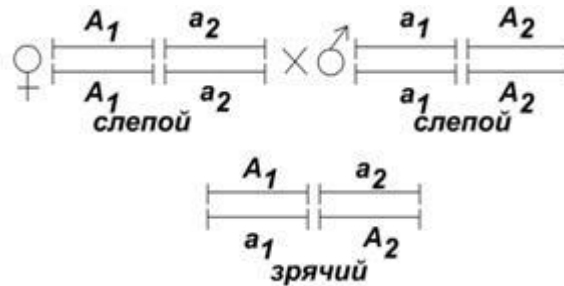
5) приготувати тимчасові цитологічні препарати, розглянути під мікроскопом, замалювати;

б) провести статистичну обробку даних, скласти висновки;

7) відповісти на запитання: чи буде відрізнятися реакція сухих, набухлих і пророслих насінин на дію фізичних мутагенів?

**Завдання 5.** Засвоїти принципи генетичного аналізу спадкування ознак, що контролюються множинними алелями.

**5.1.** Самостійно скласти та розв'язати задачу:



**5.2.** З використанням функціонального критерію алелізму провести генетичний аналіз успадкування множинних алелей, визначити алельність - неалельність генних мутацій у наступних завданнях:

**1.** У кролів в одній з хромосом є локус  $C$ , представлений серією множинних алелів, які визначаються забарвленням шерсті. Ці алелі розміщуються в певному порядку домінантності:  $C$  (агуті)  $>$   $C^{ch}$  (шиншила)  $>$   $C^h$  (гімалайський)  $>$   $C$  (альбінос). Різним фенотипам відповідають наступні генотипи:  $CC$ ,  $Cc^{ch}$ ,  $Cc^h$ ,  $Cc$  – дикий тип,  $c^{ch}c$  – шиншилове забарвлення,  $c^{ch}c^{ch}$ ,  $c^{ch}c^h$  – світло-сіре забарвлення,  $c^hc^h$ ,  $c^hc$  – гімалайське забарвлення,  $cc$  – альбінос. Самка дикого типу схрещена з самцем гімалайського забарвлення. У потомстві спостерігалось розщеплення: 41 дикого типу, 19 гімалайських та 21 альбінос. Вказати ймовірні генотипи обох батьківських форм і нащадків. Яким буде потомство від схрещування шиншили і альбіноса; особин дикого типу і альбіноса? Скільки може бути різних генотипів за участю цих алелей?

**2.** У кішок є серія множинних алелей за геном  $C$ , який визначає колір шерсті:  $C$  – дикий тип,  $C^s$  – сіамські кішки (кремові з чорними вухами і чорними лапками),  $c$  – білі кішки з червоними очами (альбіноси). Кожний з алелів повно домінує над наступним ( $C > C^s > c$ ). Від схрещування сірої кішки з сіамським котом народилося два кошеня: сіамський та альбінос. Які ще фенотипи могли б з'явитися в потомстві? Яке розщеплення слід очікувати в потомстві від схрещування даного сіамського кота з білою червоноокою кішкою?

**3.** У родині особи дідусь з боку матері має групу крові АВ, усі інші бабусі й дідусі – групу крові О. Яка ймовірність для цієї особи мати групу крові А, В, АВ, О?

**4.** У хлопчика група крові І (О), у його сестри – ІV (АВ). Що можна сказати про групи крові та генотипи їхніх батьків?

**5.** У пекарських дріжджів є ауксотрофні форми, нездатні синтезувати аденін або лізін. За схрещування двох таких форм диплоїдний гібрид буває прототрофом, тобто він здатний синтезувати обидві необхідні сполуки. Опишіть результати тетрадного аналізу такого гібрида.

**6.** У популяціях дрозофіли за локусом white ( $w$ ) відома серія множинних алелей, що визначає забарвлення очей від темно-червоного до білого, причому

кожний попередній алель по мірі зниження інтенсивності забарвлення повністю домінує над наступним. Частина цієї серії алелів має такий вигляд:  $w^+$  (червоний колір очей) >  $w^{bl}$  (коровий) >  $w^{co}$  (кораловий) >  $w^a$  (абрикосовий) >  $w^{bf}$  (рудий) >  $w$  (білий). Скільки різних генотипів і фенотипів утворяться за участю цих алелів? Запишіть їх.

**Пояснення до завдання 5.** Хід генетичного аналізу розглянемо на конкретному прикладі.

**Приклад.** Для того, щоб унеможливити інбридинг при розведенні кішок породи рекс, вирішили використовувати кішок, завезених з іншої країни. За допомогою якого типу схрещування можливо виявити генетичну ідентичність (або не ідентичність) двох типів рексоїдності в кішок? Якими будуть очікувані результати в першому та другому поколіннях схрещування, при зворотних схрещуваннях, якщо обидві мутації ідентичні? Якщо вони виникли в різних локусах?

**Хід аналізу:** Генетична ідентичність двох типів рексоїдності означає, що однаковий фенотип (рекс), який спостерігається в особин різного походження, визначається алелями одного гена. Отже, для перевірки цієї гіпотези необхідно провести тест на алелізм. Для цього треба схрестити кішок, однакових за фенотипом, але різних за походженням. Якщо мутації ідентичні, то слід очікувати наступних результатів (позначимо ген **a**):

P: a||a    x    a||a  
       рекс                рекс

F<sub>1</sub>: a||a    x    a||a  
       рекс        рекс

F<sub>2</sub>: a||a    x    a||a  
       рекс                рекс

F<sub>зв</sub>: a||a  
       рекс

Якщо б однаковий фенотип рекс визначали мутації в різних локусах, то слід очікувати наступних результатів:

P: a||a b<sup>+</sup>||b<sup>+</sup>    x    a<sup>+</sup>||a<sup>+</sup> b||b

F<sub>1</sub>: a||a<sup>+</sup> b || b<sup>+</sup>    x    a||a<sup>+</sup> b || b<sup>+</sup>  
 дикий тип (шерсть нормальної довжини)

F<sub>2</sub>: 9 a<sup>+</sup> - b<sup>+</sup> - :    3 aab<sup>+</sup> - :    3 a<sup>+</sup> - bb :    1 aabb  
       дикий тип                                        7/16 рекс

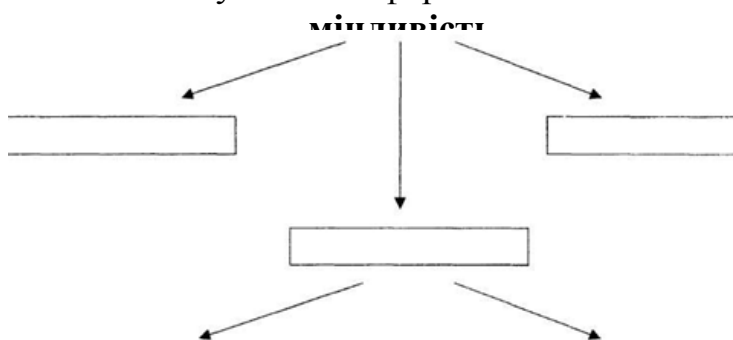
F<sub>зв</sub>: 1 рекс : 1 дикий тип

Очікувані результати значно відрізняються в обох випадках. Отже, вже результати, одержані в першому поколінні від схрещування, дозволяють встановити, чи алельні мутації, що визначають однаковий фенотип в особин різного походження.

### ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Що таке функціональний тест на алелізм?
2. Дайте визначення поняттям: алель, сайт, локус.
3. Ген **a** може знаходитися в трьох алельних формах:  $a^1$ ,  $a^2$ ,  $a^3$ . Напишіть генотипи та фенотипи можливих компаундів та результати схрещування їх між собою, якщо  $a^1 > a^2 > a^3$ .

4. Є два ауксотрофні мутанти дріжджів з однаковими фенотипами. Як визначити, чи алельні ці мутації?
5. У схему вписати форми мінливості:



6. Охарактеризуйте комбінативну мінливість.
7. Дайте визначення поняттям: мутаційна мінливість, мутація, мутагенез, мутагенний фактор.
8. Наведіть класифікацію хімічних і фізичних мутагенів.
9. Наведіть класифікацію мутацій.

### Лабораторна робота № 17

#### Генетичний аналіз успадкування ознак у хромосомних мутантів

**Мета роботи:** оволодіти принципами проведення генетичного аналізу спадкування ознак у хромосомних мутантів.

#### а) Генетичний аналіз інверсій

Хромосомні мутації (аберації), що супроводжуються зміною структури хромосом, призводять до зміни фенотипу. Але чи можна їх виявити, якщо вони не мають фенотипного проявлення, тобто є збалансованими перебудовами?

**Завдання 1.** Оволодіти логікою генетичного аналізу інверсій на прикладах. Самостійно провести генетичний аналіз інверсії (*задача 1*).

*Приклад.* При схрещуванні самки дрозофіли з генотипом  $y^+ ct^+ v^+ f^+ || yctvf$  із самцем дикого типу  $y^+ ct^+ v^+ f^+$ :

**P:** ♀  $\frac{y^+ ct^+ v^+ f^+}{yctvf}$  × ♂  $\frac{y^+ ct^+ v^+ f^+}{Y}$  (гени статевих хромосом)

в  $F_a$  одержано лише 8 класів самців замість очікуваних 16 класів:

№ п/п	Нормальне, теоретично очікуване розщеплення	Фактичне розщеплення в $F_a$
1.	$y ct v f$ некросовери	$y ct v f$
2.	$y^+ ct^+ v^+ f^+$ некросовери	$y^+ ct^+ v^+ f^+$
3.	$yctv^+ f^+$	0
4.	$y^+ ct v f$	0
5.	$yctv^+ f^+$	$y ct v^+ f^+$
6.	$y^+ ct^+ v f$	$y^+ ct^+ v f$
7.	$yct v f^+$	$y ct v f^+$
8.	$y^+ ct^+ v^+ f$	$y^+ ct^+ v^+ f$
9.	$y ct^+ v f$	0
10.	$y^+ ct v^+ f^+$	0
11.	$y ct v^+ f$	$y ct v^+ f$
12.	$y^+ ct^+ v f^+$	$y^+ ct^+ v f^+$
13.	$y ct^+ v^+ f$	0
14.	$y^+ ct v f^+$	0

15.	$y^+ ct v^+ f$	0
16.	$y ct^+ v f^+$	0

Проаналізувати відсутні класи нащадків і пояснити причину їх відсутності.

**Хід генетичного аналізу інверсій:**

1. Випишемо всі можливі генотипи самців у потомстві  $F_a$  і порівняємо з фактично одержаними (див. наведену вище таблицю).

2. Визначаємо відсутні класи нащадків, аналізуємо причину їх відсутності. Не з'явилися самці, в яких гени  $y - ct$  роз'єдналися в результаті кросинговеру. Відомо, що пригнічувачем кросинговеру може служити лише інверсія. Зменшення кількості класів у потомстві найчастіше є наслідком того, що один з батьків несе інверсію в гетерозиготному стані.

3. Визначаємо, які саме гени змінили своє положення в групі зчеплення при повороті ділянки на  $180^0$ . Якщо роз'єднання внаслідок кросинговеру  $y - ct$  не відбувається, то обмін іншої пари генів  $v - f$  триває нормально. Отже, припускаємо, що інвертувала ділянка  $y - ct$ . Тоді очевидно генотип матері буде:

$$\frac{ct^+ y^+ v^+ f^+}{ct y v f}$$

У цьому випадку продукти одинарних обмінів всередині інверсії дають нежиттєздатне потомство, тобто саме таке розщеплення, що фактично одержано в  $F_a$ . Ще одним переконливим свідченням наявності хромосомних перебудов у генотипі є зниження плодючості особин – вони стають напівстерильними.

**Задача 1.** Самостійно провести генетичний аналіз інверсії: у потомстві аналізуючого схрещування дрозофіли з генотипом ABC//abc було отримано лише 4 класи самців: ABC, abc, Abc, aBC. Пояснить отримані результати, якщо відомо, що гени A, B і C знаходяться в X-хромосомі.

*Пояснення до завдання 1.* Гетерозигота за інверсією – це організм, у якого в одній із пар гомологічних хромосом одна хромосома має нормальну структуру, інша – інверсію. Одинарний кросинговер у гетерозигот за інверсією спричинює появу нежиттєздатного потомства внаслідок утворення ацентричних і дицентричних хромосом у гаметах, якщо *інверсія парацентрична* (в одному плечі, не захоплює центромери). Цитологічний метод у цьому випадку дозволяє спостерігати у клітинах, що діляться, мости та фрагменти хромосом. Якщо *інверсія перичентрична* (захоплює ділянку по обидві боки від центромери), у хромосомах гамет з'являються дуплікації і делеції. В обох випадках зменшується кількість фенотипних класів нащадків, знижується плодючість, змінюється порядок розміщення генів у групі зчеплення. У разі виникнення перичентричних інверсій, коли кінці інверсії розташовуються асиметрично відносно центромери, може змінюватися конфігурація хромосоми, наприклад, метацентрична хромосома може перетворитися в акроцентричну та навпаки.

Для інверсій прийняті спеціальні позначення. Так, запис In (1)AC означає, що інверсія відбулася в першій хромосомі дрозофіли на ділянці AC, inv(3) (p12; q23) – інверсія хромосоми 3 з точками розриву в сегменті 12 короткого плеча та сегменті 23 довгого плеча. На цитологічних препаратах у гетерозигот з інверсії при кон'югації гомологічних хромосом утворюється петля в області інвертованої ділянки. Присутність інверсій можна виявити також за допомогою генетичного аналізу, оскільки в потомстві гетерозигот за інверсією не виникає життєздатних

рекомбінантів за генами, локалізованими в інвертованому районі. Численні інверсії, що перекриваються, використовують при створенні збалансованих ліній дрозофіли, які надалі застосовують у генетичному аналізі (Меллер-5, *CLB*).

### б) Генетичний аналіз делецій

**Завдання 2.** Оволодіти логікою генетичного аналізу делецій на прикладах. Самостійно провести генетичний аналіз делеції (*задача 2*).

*Приклад 1.* Виявити делецію в X-хромосомі дрозофіли за допомогою методу Меллер-5.

**Хід аналізу:**

1. Спочатку необхідно провести схрещування самок, гетерозиготних за делецією *Df(1) BD* із самцями з лінії Меллер:

$$P_1: \text{♀ } \underline{ABCD} \times \text{♂ } M-5$$

$$F_1: \text{♀ } \underline{ABCD}; \text{♂ } \underline{ABCD}; \text{♀ } A; \text{♂ } A$$

*M-5*                      *M-5*                      гинуть

2. Самок, гетерозиготних за маркерною хромосомою *M-5*, відібраних з першого покоління, схрестити із самцями –рецесивними гомозиготами за генами, які (як припускається) зачіпають область делеції. Якщо самка гетерозиготна за делецією *Df(1) BD*, то в  $F_1$  у половини самок будуть спостерігатися рецесивні мутації *b*, *c* і *d* (псевдодомінування):

$$P_2: \text{♀ } \underline{A} \times \text{♂ } \underline{abcd}$$

*M-5*

$$F_1: \text{♀ } \underline{A}; \text{♂ } \underline{A}; \text{♀ } \underline{M-5}; \text{♂ } \underline{M}$$

*abcd*                      *abcd*                      *abcd*                      *abcd*

фенотип *Abcd*    гинуть                      фенотип *M-5*                      фенотип *M-5*

**Приклад 2.** У першому поколінні від схрещування самки дрозофіли дикого типу (сірим тілом) із самцем з жовтим тілом одержано наступне розщеплення: 1/3 самок дикого типу, 1/3 самок з жовтим тілом, 1/3 самців дикого типу. Визначити можливі генотипи батьків.

**Хід генетичного аналізу:**

1. Висуваємо гіпотезу: відмінності між батьківськими формами контролюються алелями одного гена, зчепленого зі статтю, самка гетерозиготна за делецією в області гена, що контролює жовте забарвлення тіла (*Df*). Обґрунтуємо цю гіпотезу:

а) в  $F_1$  за ознакою «жовте тіло» одержано стандартне для моногібридного схрещування розщеплення 2:1, характерне для спадкування леталей;

б) саме делеції мають летальну дію на життєздатність гомо- і гемі зигот;

в) у потомстві відсутня одна частина особин тільки однієї статі – самців, що свідчить про те, що ознака, яка аналізується, зчеплена зі статтю, а ген, що її контролює, знаходиться в X-хромосомі.

2. Введемо позначення: *y* (*yellow*) – жовте тіло, *y+* – сіре тіло.

3. Пишемо схему схрещування у відповідності з нашою гіпотезою:

$$P_1: \text{♀ } \underline{y+} \times \text{♂ } y$$

*Df*

сіре тіло                      жовте тіло

$F_1$ : ♀  $\frac{y+}{y}$  ; ♂  $y+$ ; ♀  $\frac{y}{Df}$  ; ♂  $Df$   
 сіре тіло      сіре тіло      жовте тіло      гинуть

У гетерозиготній за делецією самки  $F_1$  ( $y//Df$ ) спостерігається стан гемізіготності за геном  $y$  та явище псевдодомінування.

**Результати аналізу:** можливі генотипи батьків: ♀ –  $y+//Df$ ; ♂ –  $X^yY$ . Остаточна відповідь на питання про наявність делеції  $Df$  у можна одержати при проведенні цитологічного аналізу або під час додаткових схрещувань.

**Задача 2. Самостійно** провести генетичний аналіз делеції:

при схрещуванні білоокої самки з вирізкою на крилах (*Notch*) із самцем дикого типу в першому поколінні одержано наступне розщеплення: 1/3 самок дикого типу (з червоними очима та нормальними крилами), 1/3 самок *Notch* із червоними очима, 1/3 самців із білими очима та нормальними крилами. Визначити генотипи батьків.

*Пояснення до завдання 2.* Делеції, або випадіння частини хромосоми, можуть бути кінцевими (ті, що захоплюють теломеру - дефішенсі) і внутрішні (інтерстиціальні). Наприклад, якщо нормальна хромосома має послідовність генів ABCDEF, то хромосома з дефішенсі за геном F має послідовність ABCDE, а хромосома з делецією внутрішньої (CD) ділянки – ABEF.

На практиці використовуються спеціальні позначення делецій, наприклад,  $Df$  (у дрозофіли), del (у людини). Символи  $Df$  (1) CD означають, що делеція відбулася у першій (X) хромосоми дрозофіли на ділянці CD, символи del (2), (q1.2-2.1) – делеція ділянки 1.2-2.1 довгого плеча хромосоми 2 у людини.

Оскільки протяжні делеції або делеції життєво важливих генів у гомо - і гемізіготному стані є зазвичай летальними, недоступними для дослідження, для генетичного аналізу використовують гетерозиготи за делеціями. У таких гетерозигот внаслідок відсутності ділянки хромосоми в одного з гомологів гени в області делеції в нормального гомологу знаходяться в гемізіготному стані, тому може спостерігатися ефект псевдодомінування. Отже, **псевдодомінування є одним із способів виявлення делецій**. Наприклад, при схрещуванні особини, яка має фенотип дикого типу та гетерозиготна за делецією  $ABC//A$  з рецесивною гомозиготою  $abc//abc$ , в першому поколінні з'являться гетерозиготи за делецією та алельним станом генів  $A//abc$ , в яких будуть активні рецесивні гени  $b$  і  $c$  і проявлятися відповідні рецесивні ознаки:

$P_1$ : ♀  $\frac{ABC}{A}$  × ♂  $\frac{abc}{abc}$   
 фенотип  $ABC$       фенотип  $abc$

$F_1$ :  $\frac{ABC}{abc}$        $\frac{A}{abc}$   
 фенотип  $ABC$       фенотип  $Abc$

На цьому ж принципі ґрунтуються методи обліку делецій з використанням рецесивних ліній-аналізаторів – double yellow, Меллер-5 у дрозофіли.

Отже, делеції (незалежно від того, де відбулася втрата – кінцевої чи серединної ділянки хромосоми) можна знайти при схрещуванні, коли організм, що аналізується, має домінантні алелі, а тестерна лінія – рецесивні. Тоді гібридне потомство матиме всі домінантні ознаки, за виключенням тих, гени яких втрачені

в результаті делеції (фенотипно будуть проявлятися рецесивні ознаки тестерної лінії, оскільки рецесивні алелі знаходяться в гемізиготному стані). Чіткими критеріями відмінності делецій від генних мутацій є відсутність реверсій до дикого типу та вкорочення генетичної карти. Картування нової делеції проводиться за результатами: 1) обліку мейотичних рекомбінантів у потомстві аналізуючого схрещування гетерозиготи за делецією та рецесивними мутантами; 2) схрещування нового мутанта за делецією з серією тестерів, в яких делеції перекриваються.

Наявність делецій може також виявити цитологічний аналіз. У гетерозигот за інтерстиціальною делецією при кон'югації гомологічних хромосом більш довга нормальна хромосома утворює петлю, у гетерозигот за дефішенсі – одна з хромосом коротша за іншу. Прикладом внутрішньої делеції є мутація Notch в X-хромосомі дрозофіли. Її проявлення спричинене появою невеликих вирізок на крилах мухи, причому в гомо- і гемізиготному стані ця мутація летальна. Фенотип Notch має більше 10 мутантів за делецією, яка зачіпає декілька генів (у тому числі ген white). У людини прикладом інтерстиціальної делеції може служити делеція в короткому плечі п'ятої хромосоми, що спричинює синдром «котячого крику». У гетерозигот за цією делецією спостерігаються мікроцефалія, значні порушення фізичного та розумового розвитку.

У генетичному аналізі делеції використовуються для картування генів за результатами рекомбінаційного аналізу. Так, якщо в потомстві аналізуючого схрещування гетерозиготи за делецією (наприклад,  $ABE//abcde$ ) відсутні рекомбінанти за генами  $c$  і  $d$ , то картовані гени лежать в області делеції:

$$\begin{array}{l}
 P_1: \text{♀ } \underline{ABE} \quad \times \quad \underline{abcde} \\
 \quad \underline{abcde} \quad \quad \underline{abcde} \\
 \text{фенотип } ABcdE \quad \text{фенотип } abcde \\
 F_1: \underline{ABE}; \quad \underline{abcde}; \quad \underline{Abcde}; \quad \underline{aBE}; \quad \underline{Abcde}; \\
 \quad \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \\
 \text{фенотип } ABcdE \quad \text{фенотип } abcde \quad \text{фенотип } Abcde \quad \text{фенотип } aBcdE \quad \text{фенотип } Abcde \\
 \\
 \underline{abE}; \quad \underline{AbE}; \quad \underline{aBcde}; \\
 \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \quad \underline{abcde} \\
 \text{фенотип } abcdE \quad \text{фенотип } AbcdE \quad \text{фенотип } aBcde
 \end{array}$$

### в) Генетичний аналіз дуплікацій

**Завдання 3.** Оволодіти логікою генетичного аналізу дуплікацій на прикладах. Самостійно провести генетичний аналіз дуплікації (задача 3).

*Приклад 1.* У генетичному аналізі дуплікації використовуються для «перекриття» леталей (летальних генів і делецій), оскільки леталі призводять до загибелі гемі- та гомозигот. Принцип методу заснований на отриманні дуплікацій ділянки з мутацією в аутомосомі або Y-хромосомі. Розглянемо в якості прикладу використання дуплікації  $l_2^+$  в Y-хромосомі для «перекриття» летальної делеції  $l_2$  в X-хромосомі дрозофіли. Самець з генотипом  $l_2/l_2^+$  буде життєздатним і може використовуватися для аналізу аallelності знов отриманої літали ( $l_1$ ) і тестерної ( $l_2$ ).

**Схема схрещування:**

$$P_1: \text{♀ } M-5 / l_1 \times \text{♂ } l_2 / l_2^+$$



Меллер-5                      дикий тип  
 $F_1$ : ♀ M-5 /  $l_2$ ; ♂ M-5 /  $l_2^+$ ; ♀  $l_1$  /  $l_2$ ; ♂  $l_1$  /  $l_2^+$ ;  
                  Меллер-5                      Меллер-5                      ?                      гине

Якщо літали алельні, то в потомстві від схрещування самки Меллер-5, гетерозиготної за летальною делецією ( $l_1$ ) в X-хромосомі, та самця, гетерозиготного одночасно за делецією  $l_2$  і дуплікацією  $l_2^+$ , самка з генотипом  $l_1/l_2$  гине, тому всі мухи будуть з фенотипом, характерним для лінії Меллер-5.

**Приклад 2.** У потомстві від схрещування самця дрозофіли, гетерозиготного за леталлю  $l_2$  в X-хромосомі та дуплікації цієї леталі в Y-хромосомі, із самкою Меллер-5, гетерозиготною за леталлю  $l_3$ , з'явилися мухи дикого типу. Що можна сказати про алельність леталей  $l_2$  та  $l_3$ ?

**Хід генетичного аналізу:**

1) визначаємо генотип самця, гетерозиготного за леталлю  $l_2$  в X-хромосомі та за дуплікацією цієї леталі в Y-хромосомі ( $X^{l_2}/Y^{l_2^+}$ ) і самки (M-5/ $X^{l_3}$ );

2) Запишемо схему схрещування:

$P_1$ : ♀  $\frac{M-5}{l_3} \times \frac{l_2}{l_2^+}$   
                  Меллер-5                      дикий тип  
 $F_1$ : ♀  $\frac{M-5}{l_2}$ ;                      ♂  $\frac{M-5}{l_2^+}$ ;                      ♀  $\frac{l_3}{l_2}$ ;                      ♂  $\frac{l_3}{l_2^+}$   
                  Меллер-5                      Меллер-5                      дикий тип                      гине

У потомстві від цього схрещування можуть з'явитися самки та самці Меллер-5, гемізіготні за леталлю  $l_3$  самці (гинуть) і гетерозиготні за леталлями  $l_2$  і  $l_3$  самки, котрі виживають тільки якщо леталі  $l_2$  і  $l_3$  були неалельні.

**Результати аналізу:** леталі  $l_2$  і  $l_3$  є неалельними.

**Задача 3. Самостійно** провести генетичний аналіз дуплікації: визначити можливі генотипи та фенотипи нащадків від схрещування самок і самців лінії *Bar*, що виникли в результаті нормального проходження мейозу та при нерівному кросинговері в області *Bar*.

**Пояснення до завдання 3.** Дуплікація – це подвоєння ділянки хромосоми. Дупліційовані ділянки часто бувають тандемними, тобто розташованими один за одним. Тандемні дуплікації можуть бути прямими та інвертованими. Наприклад, якщо в нормальній хромосомі послідовність генів має вигляд ABCDEF, то хромосома з дуплікацією ділянки BC – ABCDBCEF, прямою тандемною – ABCBCDEF, інвертованою – ABCCBDEF. У разі, коли дуплікована ділянка розташована на кінці хромосоми, дуплікація називається кінцевою або термінальною. Розрізняють також багаторазові повторення тієї ж ділянки хромосоми – мультиплікації або ампліфікації. Прикладом ампліфікованих генів можуть служити гени р-РНК, т-РНК і гістонів еукаріот. Позначення делецій: Dr (у дрозофіли), dup (у людини).

Дуплікації часто мають фенотипне проявлення. Так, мутація **Bar** (дуплікація сегмента 16A в X-хромосомі) дрозофіли зменшує кількість очних фасеток, тому мутантні мухи мають маленькі очі смугоподібної форми. Фенотип  $Bar^+//Bar^+ \approx 800$  фасеток,  $Bar//Bar^+ \approx 350$ ,  $Bar//Bar \approx 70$ ,  $BarBar//Bar^+ \approx 50$ ,  $BarBar//BarBar \approx 25$ . Останні два генотипи мають потроєну ділянку 16A і називаються подвійний Bar або Ultra Bar.

Наявність дуплікації можна виявити, в першу чергу, за допомогою цитологічного аналізу: у гетерозигот за дуплікацією аберантна хромосома при кон'югації утворює петлю. За допомогою гібридологічного аналізу відрізнити дуплікацію від генних мутацій досить важко, хоча, наприклад, про наявність дуплікації **Bar** можна судити за появою мух дикого типу та **Ultra Bar** в результаті нерівного кросинговеру в потомстві від схрещування самців і самок лінії **Bar**. Дуплікації призводять також до зміни розщеплення моногібридного на полігібридне.

Дуплікації відіграють істотну роль в еволюції, оскільки дупліційовані ділянки можуть змінюватися та започатковувати нові гени. Прикладом походження генів шляхом дуплікацій можуть служити родини генів глобінів.

Отже, на відміну від делецій, дуплікації часто проявляються через виникнення нової ознаки. Найчастіше дуплікації призводять до зміни фенотипу внаслідок того, що гени, які перемістилися, опиняються в новому оточенні.

### г) Генетичний аналіз транслокацій

**Завдання 4.** Оволодіти логікою генетичного аналізу транслокацій на прикладах. Самостійно провести генетичний аналіз транслокації (задача 4).

**Приклад 1.** Порівняти результати аналізуючих схрещувань нормальної особини та гетерозиготи за транслокацією -  $T(2,3) a; b$ :

норма	транслокація
$P_1: \text{♀ } \frac{a \ b}{a \ b} \times \text{♂ } \frac{A \ B}{a \ b}$	$P_1: \text{♀ } \frac{a \ b}{a \ b} \times \text{♂ } \frac{a \ b}{\underline{AB}}$
$F_1: \frac{1}{4} \frac{A \ B}{a \ b}; \frac{1}{4} \frac{a \ b}{a \ b}; \frac{1}{4} \frac{A \ b}{a \ b}; \frac{1}{4} \frac{a \ B}{a \ b}$	$F_1: \frac{1}{2} \frac{a \ b}{a \ b} : \frac{1}{2} \frac{a \ b}{A \ B}$

**Результати аналізу:** в нормі в першому поколінні від схрещування самки  $aabb$  із самцем  $AaBb$  з'являються 4 типи нащадків у співвідношенні 1 : 1 : 1 : 1. В аналізуючому схрещуванні за участю самця, гетерозиготного за транслокацією, з'являються лише два типи життєздатних особин – батьківського типу.

При транслокації, тобто при переміщенні ділянки однієї хромосоми на іншу, не гомологічну, змінюються групи зчеплення таких хромосом. Гетерозиготи за транслокаціями можна виявити за результатами гібридологічного аналізу. При аналізі транслокацій у лінії-тестері маркірованими мають бути обов'язково дві хромосоми, які зачепила ця мутація.

**Приклад 2.** Гетерозиготний самець, відібраний з першого покоління від схрещування самця дрозофіли дикого типу з самками з лінії аналізатора  $vg \ e$ , був зворотно схрещений з самками  $vg \ e$ . У потомстві цього зворотного схрещування виявлено тільки два класи мух – дикого типу та  $vg \ e$ . Визначити генотип вихідного самця, якщо відомо, що ген  $vg$  знаходиться в другій, а ген  $e$  – в третій хромосомі.

**Хід генетичного аналізу:**

1) спочатку для підтвердження того, що у самця дрозофіли дикого типу в гетерозиготному стані є транслокація 2-3 (фрагмент хромосоми 2 переміщений на хромосому 3, а ділянка хромосоми 3 на хромосому 2 – *реципрокна транслокація*),

необхідно залучити в схрещування самку тестерної лінії з маркованими хромосомами 2 (vg - короткі крила) і 3 (ebony –чорне тіло):

P: ♀  $vg\ vg\ e\ e$  x ♂  $vg^+\ vg^+\ e^+\ e^+$

F<sub>1</sub>:  $vg^+\ vg\ e^+\ e$ ;  $vg^+\ vg\ e^+\ e$ ;  $vg^+\ vg\ e$  (летальна);  $vg^+\ vg\ e^+\ e^+\ e$  (летальна)

2) проводимо схрещування гетерозиготного самця, відібраного з першого покоління від схрещування самця дрозофіли дикого типу з самками лінії аналізатора  $vg\ e$ :

F<sub>1</sub>: ♀  $\frac{vg\ e}{vg\ e}$  × ♂  $\frac{vg\ e}{vg^+\ e^+}$

F<sub>a</sub>:  $\frac{vg\ e}{vg^+\ e^+}$  ;  $\frac{vg\ e}{vg\ e}$  :  $vg\ vg\ e$  :  $vg^+\ vg\ e^+\ e\ e$   
 дикий тип      фенотип  $vg\ e$       *гинуть*      *гинуть*

У потомстві зворотного схрещування з'явилося лише два класи нащадків замість очікуваних чотирьох при незалежному спадкуванні генів, відсутні рекомбінантні форми. Ці два класи – з батьківськими сполученнями ознак. Можна припустити, що вихідний самець був гетерозиготним за транслокацією між другою та третьою хромосомами. Цитологічна картина транслокацій досить характерна: якщо в мейозі при кон'югації гомологічних хромосом спостерігаються фігури хрестів - утворюватимуться нежиттєздатні гамети; якщо помітні кільця та вісімки – життєздатні.

**Результат аналізу:** самець є гетерозиготним за транслокацією. Як завжди, при наявності хромосомної мутації в генотипі батьків їх плодючість знижена (частина нащадків гине).

**Задача 4. Самостійно** провести генетичний аналіз транслокацій:

3.1. Чоловік фенотипово здоровий, але в нього знайдена збалансована транслокація 21/15. Як ця мутація відобразиться на його потомстві?

3.2. Під час проведення каріотипування лімфоцитів вагітної жінки в них виявлена транслокація 21-ої аутосоми на 13-ту, в результаті її каріотип містив 45 хромосом. Розрахувати ризик народження у цієї жінки дитини, хворої на синдром Дауна.

**Пояснення до завдання 4:** Транслокація – переміщення частини однієї хромосоми на іншу, негомологічну. В результаті такого переміщення в аберантної хромосоми змінюється характер зчеплення генів. Виділяють **симетричні, асиметричні та робертсонівські транслокації**. Якщо послідовність генів у вихідних хромосомах – 0ABCD і 0EFGH, то в результаті реципрокного симетричного обміну фрагментами утворюються хромосоми 0ABGH і 0EFCD (0 – центромера). Асиметричний обмін з утворенням дицентрика 0ABFE0 і ацентрического фрагмента HGCD призводить до загибелі нащадків клітини. При робертсонівській транслокації відбувається злиття негомологічних хромосом по центромері (DCBA0EFGH) і, відповідно, зменшення їх числа.

Транслокації у дрозофіли позначаються через T, в людини – t. Наприклад, T(2,3)35A;71C означає, що сталася реципрокна транслокація між другою і третьою хромосомами дрозофіли, 35A і 71C – точки розриву на цитологічних картах цих хромосом. На цитологічних препаратах у гетерозигот за реципрокними транслокаціями в пахітені мейозу при кон'югації хромосом утворюється

тетравалент у формі хреста. В генетичних експериментах реципрокні транслокації виявляють за зміною розщеплення в потомстві, оскільки в гетерозигот за транслокаціями життєздатними будуть лише батьківські сполучення генів у генотипі. Кросоверні гамети несуть дуплікації і делеції, і, зазвичай, не беруть участь у заплідненні. У зв'язку з цим гетерозиготи за транслокаціями мають знижену фертильність.

Ефективні методи виявлення транслокацій розроблені для дрозофіли. Поява транслокацій (спонтанна чи індукована) тестується в самців, всі хромосоми яких генетично марковані, наприклад, домінантними алелями генів. Самки, з якими схрещують цих самців, є гомозиготними за рецесивними алелями маркерних генів (наприклад, *dp* для другої хромосоми, *e* в третій хромосомі, *eu* в четвертій). Маркер X-хромосоми – стать потомства. У тварин гетерозиготи за реципрокними транслокаціями зустрічаються досить рідко, тоді як у рослин виявлені транслокації за більш ніж двома негомологічними хромосомами. Транслокації, як і інверсії, використовуються в генетичному аналізі для створення збалансованих хромосом. Вони широко поширені в природних популяціях і, як і інверсії, забезпечують ізоляцію нових форм і сприяють дивергенції в межах виду.

### ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Наведіть класифікацію хромосомних мутацій і методи їх виявлення.
2. Що таке транспозони? Які мобільні елементи відомі в прокариот? Що таке ретротранспозони?
3. Які зміни в клітині індукують МГЕ-елементи?
4. Визначте генотип самки, гетерозиготної за делецією  $Df(1)BC$ , якщо в нормальній хромосомі гени розташовані в наступному порядку: A, B, C, D, E.
5. Зобразіть картину кон'югації хромосом у гетерозиготи  $ABCDE//ABCE$ .
6. Послідовність генів ABCDE. Запишіть генотип самки дрозофіли з двома рецесивними ознаками (b,c), гетерозиготної за  $In(1)bc$  і  $Df(1)c$ .

### Лабораторна робота № 18

#### Генетичний аналіз успадкування ознак в анеуплоїдів і поліплоїдів

**Поліплоїдія** – явище зміни кількості гаплоїдних наборів хромосом у клітині (геномна мутація). **Поліплоїд** – організм, що походить від однієї або двох батьківських форм шляхом подвоєння наборів хромосом. Це подвоєння може бути спонтанним або штучно індукованим. Розрізняють: *автополіплоїдію* – кількісне збільшення числа наборів хромосом того ж самого виду; *алополіплоїдію* – об'єднання в організмі гаплоїдних наборів хромосом різних видів; *ендополіплоїдію* – збільшення числа наборів хромосом в одній клітині або в клітинах однієї тканини (тапетум рослин).

Зміна кількості хромосом спричинює в рослин зміну морфологічних ознак і біологічних властивостей. Для штучного одержання поліплоїдних рослин використовують колхіцин - речовину групи алкалоїдів, виділену із соку рослини пізньоцвіт осінній (рос. безвременник осінній)(*Colchicum autumnale* L.), слабкі

розчини якого блокують утворення ахроматинових ниток веретена поділу клітин. Обробляють насінини, що проростають, або верхівки молодих пагонів, які знаходяться в стані інтенсивного поділу клітин. При колхіцинуванні значна частина рослин гине. Можна одержати тетраплоїдні рослини жита при пророщуванні насінин у розчині колхіцину (сухі насінини протягом 3-10 днів, пророслі 4-48 годин). При цьому сильно пошкоджуються зародкові корені, тому слід використовувати велику кількість насінин.

**Мета роботи:** навчитися проводити генетичний аналіз успадкування ознак у поліплоїдних і анеуплоїдних організмів.

**Завдання 1.** Скласти схему геномних мутацій і визначити їх причини.

**Завдання 2.** Ознайомитися з поліплоїдними рядами видів рослин. Розглянути гербарні екземпляри представників різних видів, що створюють поліплоїдні ряди. Скласти висновки щодо морфології цих видів при зміні плоїдності. Замалювати в зошит таблицю:

Рід	основна гаплоїдна кількість хромосом	кількість хромосом у видів даного роду
Пшениця	7	14,28, 42
Пирій	7	14,28,42,56,70
Овес	7	14,28,42
Троянда	7	14,21,28,35,42,56,70
Суниця	7	14,28,42,56,70,84,98
Люцерна	8	16,32,48
Буряк	9	18,36,54,72
Хризантема	9	18,27,36,45,54,63,72,81,90
Шавлія	10	20,40,60,80,100,120,200
Бавовник	13	26,52

**Пояснення до завдання 2.** На відміну від гаплоїдного набору хромосом основне їх число позначається літерою  $x$ . Наприклад, у пшениці диплоїдний вид має  $2n = 2x = 14$  хромосом; тетраплоїдний -  $2n = 4x = 28$  хромосом; гексаплоїдний -  $2n = 6x = 42$  хромосоми. Кратна зміна числа хромосом є важливим джерелом мінливості в еволюції і селекції, особливо в рослин. Перші експериментально отримані поліплоїди томатів та пасльону були описані Р. Вінклером ще в 1916 р. Нині відомо, що більше 1/3 всіх видів покритонасінних є поліплоїдними.

Аналізуючи кількість хромосом різних видів пшениць, можна впевнитись, що род Пшениця (*Triticum*) складається з кількох видів, які поділяються на три групи як за кількістю хромосом, так і за властивостями та ознаками рослин. До першої групи відносяться однозернянки (*Triticum monosocum*) та інші види, які мають у соматичних клітинах  $2n = 2x = 14$ . До другої групи відносяться тверда пшениця (*T. durum*), гілляста (*T. turgidum*), польська (*T. polonicum*) та інші види, які мають  $2n = 4x = 28$  хромосом. Третю групу складають наступні види пшениць: компактна (*T. compactum*), м'яка (*T. aestivum*), спельта (*T. spelta*) та інші, які мають  $2n = 6x = 42$  хромосоми. Якщо основне число хромосом у пшениць  $x = 7$ , то однозернянки виявляються диплоїдами ( $7 \times 2 = 14$ ), тверді пшениці — тетраплоїди ( $7 \times 4 = 28$ ), а м'які пшениці — гексаплоїди ( $7 \times 6 = 42$ ). Такий самий ряд поліплоїдів відомий всередині роду вівса (*Avena*) і для багатьох інших рослин.

Група споріднених видів, у яких набори хромосом складають ряд зростаючого кратного збільшення основного числа хромосом, називається *поліплоїдним рядом*. Існують роди рослин з таким поліплоїдним рядом видів, коли кратне збільшення наборів хромосом відповідає основному числу. Наприклад, рід Троянда складається з низки видів, що мають відповідно 14, 21, 28, 35, 42 і 56 хромосом. Основним числом цього ряду є 7 хромосом. Рід паслін (*Solanum*) становить ряд 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 108, 144. В даному ряду основне число дорівнює 12 хромосом. Припускають, що основне число (12 хромосом) даного ряду є поєднання не менш ніж двох геномів ( $6 + 6$ ), а можливо й чотирьох ( $3 + 3 + 3 + 3$ ).

Існують ряди рослин з двома поліплоїдними рядами. Наприклад, у роду Віка (*Vicia*) види одного ряду мають 12 і 24 хромосоми, де основне число 6, а види другого ряду 14 і 28 хромосом з основним числом 7. У деяких родів, де кратність порушується проміжними числами хромосом, наприклад, роду скерда (*Crepis*), різні види мають числа хромосом: 6, 8, 10, 12, 16, 18, 24, 40, 42.

Знаючи про існування явища хромосомних перебудов і гетероплоїдії, неважко уявити ті процеси, які могли зумовити походження різних поліплоїдних рядів всередині одного роду. Слід мати на увазі, що подвоєння числа хромосом в одному випадку може відбуватися за рахунок хромосом того ж самого геному, в іншому — за рахунок хромосом різних геномів.

Кожен вид має характерний для нього генотип, який включає один або декілька геномів. Основне число у різних видів різне і характерне для вихідного виду або його предка. Поліплоїдний ряд може бути коротким і довгим; він може бути також безперервним і переривчастим. Переривчастість ряду вказує на те, що один з видів — членів ряду — випав в процесі еволюції, опинившись непристосованим: наприклад, у *Geranium*  $2n = 18, 20, 22, 26, 28, 32$ , де форми з  $2n = 24$  і  $2n = 30$  зникли в процесі еволюції. Переривчастість ряду могла бути викликана також гетероплоїдією, наприклад у *Biscutella*  $2n = 12, 16, 18, 27, 36, 45$ , де форма з  $2n = 18$  має гетероплоїдне походження, і продовження ряду здійснювалося кратним збільшенням набору хромосом  $2n = 9$ . Новий член поліплоїдного ряду може виникнути не тільки на основі гаплоїдного або диплоїдного наборів хромосом, але і на основі наборів більшої плоїдності — триплоїдних і тетраплоїдних.

**Завдання 3.** Замалювати схему утворення гамет у тетраплоїда ААаа (8 типів гамет) та триплоїда Ааа (8 типів гамет) (хромосомний тип розщеплення).

**Пояснення до завдання 3.** Характерною особливістю тетраплоїдів, несприятливою для практичного використання, є те, що їхня плодючість буває в тій чи іншій мірі знижена. Значний ступінь стерильності обумовлений тим, що в автотетраплоїдів мейоз триває зовсім інакше. Так, наприклад, у тетраплоїда в профазі утворюються не тільки біваленти, але і триваленти, квалдриваленти (оскільки кон'югують між собою усі гомологічні хромосоми), уніваленти. При більш високій плоїдності можливість кон'югації всіх гомологічних хромосом призводить до утворення полівалентів, або мультивалентів.

Відомо, що якщо одна з пар хромосом диплоїдного організму гетерозиготна за яким-небудь геном (Аа), то в результаті мейозу утворюється два типи гамет 1А : 1а. Якщо з гетерозиготного диплоїда отримати автотетраплоїд (ААаа), то в редукційному поділі розходження гомологічних хромосом до полюсів можливе в

наступних співвідношеннях: 2:2, 3:1, 1:3, 4:0, 0:4. Гамети з трьома, однією і без хромосом даної пари, а саме Ааа і а, Ааа і А, а також О є неповноцінними. Це призводить до утворення нежиттєздатних зигот, тобто знижує фертильність поліплоїдів. Але якщо навіть у гетерозиготного автотетраплоїда ААаа розходження хромосом до полюсів буде проходити регулярно 2:2, розщеплення у тетраплоїдів буде відрізнятися від моногібридного розщеплення диплоїда. Зазначений автотетраплоїд утворює три типи гамет у співвідношенні 1АА:4Аа:1аа, а розщеплення в F<sub>2</sub> за фенотипом відповідає 35:1, що значно відрізняється від такого у диплоїда (3:1).

**Завдання 4.** Ознайомитися з процесом проходження мейозу у поліплоїдних рослин. Оволодіти логікою генетичного аналізу спадкування ознак у геномних мутантів на прикладах.

**Приклад 1.** Яке розщеплення спостерігається при самозапиленні: а) дуплекса, б) триплекса, в) симплекса при повному домінуванні?

**Хід генетичного аналізу:** а) Дуплекс ААаа при функціональній диплоїдії, тобто при бівалентній кон'югації, дає три типи гамет у співвідношенні 1 АА : 4 Аа : 1 аа.

Побудуємо решітку Пеннета з урахуванням частоти гамет кожного типа. При одержанні зигот знайдемо добуток частоти гамет:

♂ ♀	1АА	4Аа	1аа
1АА	1АААА	4 АААа	1 ААаа
4Аа	4 АААа	16 ААаа	4 Аааа
1 аа	1ААаа	4 Аааа	1 аааа

При повному домінуванні спостерігатиметься розщеплення 35 А- : 1 аааа.

б) триплекс АААа дає наступні типи гамет: 3 АА : 3 Аа = 1 АА : 1 аа. При самозапиленні утворюються наступні зиготи:

♂ ♀	1АА	1Аа
1АА	1 АААА	1 АААа
1 аа	ААаа	Аааа

Розщеплення не буде.

в) симплекс Аааа дає наступні типи гамет: 3 Аа : 3 аа = 1 Аа : 1 аа.

Побудуємо решітку Пеннета та одержимо розщеплення:

♂ ♀	1Аа	1 аа
1 Аа	1 ААаа	1 Аааа
1 аа	1 Аааа	1 аааа

Співвідношення фенотипів при повному домінуванні 3 А- : 1 аааа.

**Приклад 2.** Які фенотипи та в якому співвідношенні можуть виникати при реципрокних схрещуваннях двох трисоміків Ааа та ААа за умови повного домінування (з урахуванням того, що в батьківських рослин життєздатними є тільки гаплоїдні гамети)?

**Хід проведення генетичного аналізу:** 1) Аналізуємо пряме схрещування: ♀ Ааа × ♂ ААа. Материнська рослина може утворювати тільки чотири, а батьківська - два типи гамет у наступному співвідношенні:

♂ ♀	2Аа	2 а	1 А	1 аа
2А	4 ААа	4 Аа	2 АА	2 Ааа
1 а	2 Ааа	2 аа	1 Аа	1 ааа

Співвідношення фенотипів у потомстві: 17А : 3а. 2) Аналізуємо результати зворотного схрещування: ♀ ААа × ♂ Ааа. Материнська рослина утворюватиме чотири, а батьківська - два типи гамет у наступному співвідношенні:

♂ ♀	2Аа	2 А	1 АА	1 А
2аа	4 Аааа	4 Ааа	2 ААаа	2 ааа
1 А	2 ААа	2 АА	1 ААА	1 Аа

Співвідношення фенотипів у потомстві: 8А : 1а.

**Приклад 3.** Яке співвідношення генотипів і фенотипів очікується від схрещування автотетраплоїдів з генотипом ААаа при повному домінуванні та випадковому хромосомному розщепленні?

**Хід проведення генетичного аналізу:** При випадковому хромосомному розщепленні тетраплоїди з генотипом ААаа можуть дати три типи гамет у співвідношенні: 1 АА : 1аа : 4Аа. Отже, в потомстві від схрещування таких особин має відбутися наступне розщеплення:

♂ ♀	1 АА	4 Аа	1 аа
1 АА	1 АААА	4 АААа	1 ААаа
4 Аа	4 АААа	16 ААаа	4 Аааа
1 аа	1 ААаа	4 Аааа	1 аааа

Таким чином, співвідношення фенотипів у розщепленні за умови повного домінування: 35А : 1а; співвідношення генотипів: 1АААА : 8АААа : 18ААаа : 8Аааа : 1аааа.

**Пояснення до завдання 4.** В автополіплоїдів кожна хромосома набору представлена повністю гомологічними хромосомами в кількості, відповідній плоїдності: трьома, чотирма і т. д. При цьому змінюється доза домінантного гена, наприклад, у тетраплоїдів може виникати п'ять різних генотипів по одному гену: квадриплекс - АААА, триплекс - АААа, дуплекс - ААаа, симплекс - Аааа і нуллиплекс - аааа. Розщеплення в їх потомстві варіюють залежно від частоти утворення квадริвалентів, три - і унівалентів в профазі першого поділу мейозу, від відстані гена відносно центромери, а також від числа хіазм, типів взаємодії генів та їх локалізації. Наприклад, у тетраплоїдів регулярно відбувається утворення квадривалентів. У діакінезі вони утворюють кільця або ланцюги з чотирьох хромосом, або триваленти та уніваленти, або два біваленти. Розходження хромосом з мультівалентів і розподіл унівалентів може відбуватися випадково або вибірково. У результаті неправильного розходження хромосом завжди утворюються макро - і мікроспори з незбалансованим числом хромосом, частина з яких нежиттєздатна і не приймає участі в заплідненні. В автополіплоїдів розщеплення може бути пов'язано або з випадковим розходженням хромосом (випадкове хромосомне розщеплення), або з розходженням хроматид (випадкове хроматидне розщеплення).

**Завдання 5.** Самостійно провести генетичний аналіз спадкування ознак у поліплоїдних і анеуплоїдних мутантних форм:

1. Конюшина – трисомік за хромосомою, що містить ген забарвлення квіток, з генотипом ААа (А – червоне, а – біле забарвлення). Визначити розщеплення в F<sub>2</sub> за фенотипом. (**Відповідь: 17 червоноквіткових форм: 1 білокріткова**).



2. Якого розщеплення слід очікувати при самозапиленні автотетраплоїдів при повному домінуванні та незалежному спадкуванні генів А та В? а) ААааВВвв, б) ААааВввв.
3. Які фенотипи та в якому співвідношенні можна одержати при схрещуванні двох автотетраплоїдів дуплекса та симплекса?
4. Схрещуються 2 автотетраплоїдних дуплекси ротиків. Визначити забарвлення квіток батьків і потомства, якщо наявна адитивна дія алелей. (АААА – темно-червоне забарвлення, АААа – червоне, ААаа – світло-червоне, Аааа – рожеве, аааа – біле).
5. При схрещуванні автотетраплоїдних рослин дурману з пурпурними квітками в F<sub>1</sub> одержано 1715 рослин із пурпурними, 51 - з білими квітками. Визначити генотипи вихідних рослин і пояснити розщеплення.
6. Яке розщеплення одержимо при схрещуванні трисомиків ААа та Ааа за умови повного домінування ознаки?
7. Генотип батьківської рослини конюшини з червоними квітками **Ааа**. Знайти розщеплення в F<sub>2</sub>. (**Відповідь: 2 червоноквіткових рослин: 1 білокріткова**).
8. При схрещуванні високої білокріткової рослини дурману (дисомик) з низькою червоноквітковою рослиною (трисомик) одержана висока з червоними квітками рослина, яка в потомстві дала розщеплення: за кольором квітки – 17 червоноквіткових: 1 білокріткове; за висотою – 3 високих: 1 низька. Чим можна пояснити таку відмінність у розщепленні за різними ознаками?
9. У дурману наявність шипів на коробочці контролюється домінантним геном **А**, відсутність – алеломорфом **а**. За схрещування гібридних, із домінантною ознакою форм між собою в F<sub>2</sub> одержано 3383 рослини з шипами на плоді та 118 – без шипів. Визначити генотип форм, що схрещуються. (**Відповідь: ААаа**).
10. Схрещені дві гомозиготні рослини суниці з червоними та білими квітками. Гібрид має рожеві ягоди. Зворотне схрещування з рослиною з білими ягодами дало розщеплення: 19 рослин – з білими ягодами; 22 – з рожевими; 78 – зі світло-рожевими. Пояснити одержані результати.
11. Тетраплоїдна рослина жита нормальних розмірів при схрещуванні з тетраплоїдною карликовою дала в потомстві 19 рослин: 16 нормальних і 3 карликових. Визначити генотипи вихідних рослин. (**Відповідь: ААаа x аааа**).
12. Червоноплідна тетраплоїдна рослина томату невідомого походження при запиленні пилком жовто плідної рослини дала 50% червоноплідних і 50% жовтоплідних рослин. Визначити генотип материнської рослини (**Відповідь: Аааа**).

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Чому поліплоїдія зменшує ймовірність знаходження генних мутацій?
2. Чому поліплоїдія дуже рідко поширена серед тварин?
3. Назвіть основні типи поліплоїдії. В чому її еволюційне значення?
4. Наведіть значення поліплоїдії у селекції рослин.
5. Чому гібрид між двома видами більш фертильний, якщо він тетраплоїд, і менш фертильний, коли диплоїд?

6. Чому легше вести селекцію тетраплоїду, якщо він розмножується брунькуванням або черенкуванням?
7. Чим відрізняються автополіплоїди від алополіплоїдів?
8. Які гамети утворюють трисоміки ААа? Тетраплоїди АААа?
9. Чому серед триплоїдних форм рослин трапляються рослини з безнасінними плодами?
10. Яку частку від загальної кількості гамет складатимуть життєздатні гамети, що утворюються триплоїдами ААа, ААА, ааа?
11. Які життєздатні гамети та в якій пропорції утворюватиме гексаплоїд АААаа?
12. Яке розщеплення слід очікувати від самозапилення гексаплоїда АААааа?
13. В якому поколінні та з якою ймовірністю з'являться білокріткові рослини від схрещування тетраплоїдних гомозиготних пурпуроквіткової та білокріткової рослин дурману при умові повного домінування та випадкового хромосомного розщеплення?
14. Яке співвідношення фенотипів слід очікувати від схрещування автотетраплоїда ААаа з диплоїдом Аа при умові повного домінування та випадкового хромосомного розщеплення у поліплоїда?
15. У дрозофіли зустрічаються життєздатні трисоміки за IV хромосомою. Самка з нормально розвиненими очима, трисомік за IV хромосомою з генотипом ААа, схрещується з безоком самцем з генотипом аа. Яке потомство слід очікувати від цього схрещування?

## Лабораторне заняття № 19

### Генеалогічний метод антропогенетики. Складання та аналіз родоводів

Методи дослідження, які використовуються для діагностики в медичній генетиці: генеалогічний, молекулярно-генетичний, методи дерматогліфіки і пальмоскопії, біохімічні, електрофізіологічні методи, цитогенетичний метод.

**Генеалогічний метод** - метод родоводів, вивчає закономірності передачі спадкових ознак індивіда в ряді послідовних поколінь. Метод ґрунтується на складанні й аналізі родоводів. **Клініко-генеалогічний метод** дослідження – це вивчення родоуду та поширення патологічної ознаки в родині (роді) за допомогою клінічного обстеження зі вказанням родовідних зв'язків між членами сім'ї (роду). Складовими генеалогічного аналізу є встановлення спадкового характеру ознаки та типу спадкування. Метод застосовують для:

- встановлення спадкового характеру ознаки;
- визначення типу успадкування, пенетрантності гена;
- аналізу зчеплення генів і картування хромосом;
- вивчення інтенсивності мутаційного процесу;
- розшифрування механізмів взаємодії генів;
- медико-генетичного консультування.

Спадковий характер досліджуваної патологічної ознаки (хвороби) можна запідозрити, якщо вона кілька разів трапляється у родоводі. Однак можливі фенокопії - вплив того самого патогенного фактора на кількох членів родини.

При складанні родоводу керуються правилами:

- пробанда на схемі родоводу позначають стрілкою;
- особи одного покоління займають окремий рядок або коло;
- покоління позначають зліва римською цифрою (найстарше цифрою 1, а наймолодше – внизу родоводу);
- усіх членів одного покоління розміщують у порядку народження (зліва направо) по горизонталі й позначають арабськими цифрами;
- до родоводу включають усіх членів сім'ї. При посиланні на будь-якого члена сім'ї спочатку вказують номер покоління, а потім номер члена (наприклад II-3). До схеми родоводу додається легенда (систематизовані дані про пробанда та його родичів). У легенді відмічаються дані обстеження пробанда, відомості про огляд родичів, зіставлення результатів огляду пробанда з даними опитування його родичів, з письмовими відомостями про родичів, що мешкають в іншій місцевості. Проведений аналіз родоводу дозволяє встановити, чи є дана ознака (хвороба) спадковою (чи досліджувана ознака зустрічається в родоводі кілька разів), тип успадкування (домінантний чи рецесивний, аутосомний чи зчеплений зі статтю, зиготність пробанда (гомозигота чи гетерозигота) за досліджуваною ознакою; встановлюється ймовірність ризику прояву спадкової ознаки в нащадків.

**Мета заняття:** на конкретних прикладах ознайомитися з особливостями проведення діагностики генних захворювань людини за допомогою генеалогічного та молекулярно-генетичного методу; навчитися розраховувати ризик народження дітей з патологією в родині пробанда.

**Завдання 1.** Ознайомитися з особливостями використання генеалогічного методу в практиці медико-генетичного консультування (МГК), навчитися «читати» родоводи та визначати тип успадкування ознаки, ймовірність повторного народження дитини з тією ж патологією в наступному поколінні.

**Приклад 1.** На рис. 4.9 представлений родовід родини. Відомо, що всі особи, з якими вступили у шлюб представники цієї сім'ї (за виключенням їх засновників), походили з родин, де ця ознака ніколи не виявлялася. Аналізуючи родовід, визначити характер успадкування цієї ознаки (домінантний, рецесивний, зчеплений або не зчеплений із статтю і т.д.). Вказати генотипи всіх осіб, помічених номерами (якщо для цього не вистачить даних, назвіть можливі генотипи і висловіть міркування щодо їх порівняльної ймовірності).

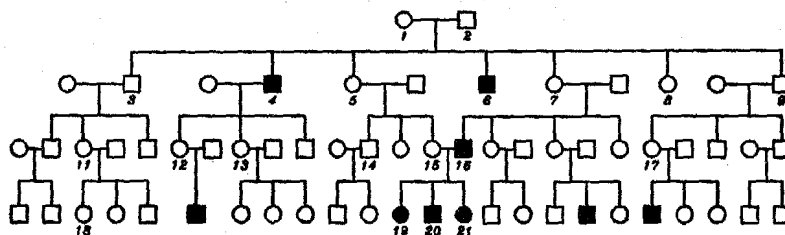


Рис 4.9.- Родовід людини, з ознакою, що рідко зустрічається

**Хід аналізу:** ознака не може бути домінантною, інакше вона б з'являлася б у дітей таких самих батьків. На зчеплення цієї ознаки із статтю вказують наступні факти:

1) вона виявляється переважно в чоловіків (виключення складають лише жінки 19 та 21, про яких мова йтиме нижче);

2) вона передається тільки через жінок (від будь-якого нащадка з цією ознакою завжди є прямий шлях через жінок до предка з цією ж ознакою або до вихідної пари).

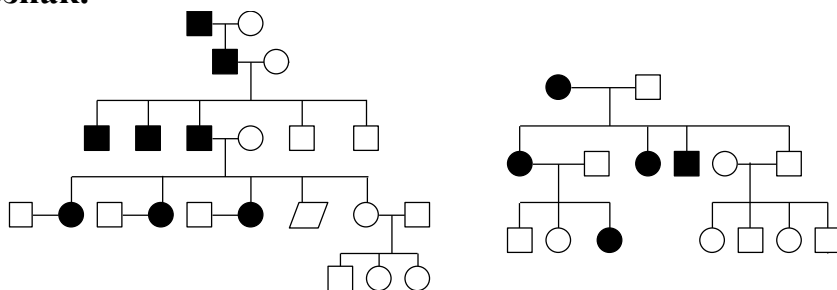
Припускаємо, що ознака успадковується зчеплено зі статтю, причому засновниця сім'ї 1 – гетерозиготний носій відповідного гена. Таке припущення підтверджується тим, що близькородинний шлюб між двоюрідними сібсами (сестрою та братом) 15 та 16 призвів до народження дівчинок 19 і 21 з даною ознакою (очевидно, їхня матір 15 була гетерозиготним носієм). Після таких суджень легко можна визначити генотипи вказаних осіб:

$P : X^A X^a \times X^A Y$ ; №3 –  $X^A Y$ ; № 4,6 –  $X^a Y$ ; №5 –  $X^A X^a$ .

**Відповідь:** ознака, що аналізується, успадковується за зчепленим із статтю рецесивним типом; генотипи осіб:  $P : X^A X^a \times X^A Y$ ; №3 –  $X^A Y$ ; № 4,6 –  $X^a Y$ ; №5 –  $X^A X^a$ .

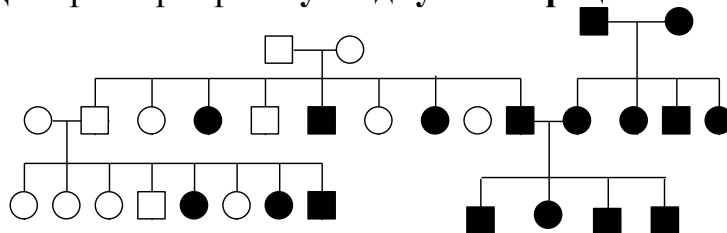
**Приклад 2.** Аналізуючи родоводи, визначити характерні особливості спадкування ознак у родинах пробандів.

**Хід аналізу:** дуже часто в якості ознаки, що вивчається, у людини фігурує те чи інше захворювання. На **рис. 4.10** зображені родоводи, в кожній з яких пробанд – носій певної аномалії, спричиненої генною мутацією. В усіх випадках захворювання спостерігається в кожному поколінні; кожний хворий має хоча б одного родича з тією ж самою ознакою. Це характерні риси **успадкування домінантних ознак**.







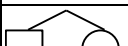
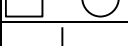
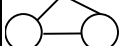

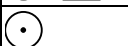
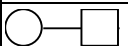
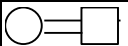



**Рис. 4.10.** – Приклади родоводів з домінантною ознакою

На **рис.4.11** зображені родоводи, для яких характерний інший тип успадкування. Ознаки, що аналізуються, в деяких поколіннях не зустрічаються, хоча у попередніх вони мали місце. Відбувається немов би “перестрибування” ознаки через покоління. Це характерні риси **успадкування рецесивних ознак**.



**Рис. 4.11.** – Приклади родоводів з рецесивною ознакою

**Пояснення до завдання 1.** Основним методом вивчення характеру успадкування ознак є гібридологічний аналіз. Але в антропогенетиці його не можна використовувати, оскільки проведення спланованого парування осіб для вивчення успадкування ознаки для людини є неприйнятним. Тому застосовують специфічний метод-аналіз родоводів, або генеалогічний метод. Людина, що обстежується і родовід якої складають, називається пробандом (пропозитом). Дітей однієї батьківської пари називають сибсами (брати – сестри). Сім'я – батьки та їх діти, а якщо включають кровних родичів – рід. Якщо ж родовід складається таким чином, що від пробанда спускаються до потомства, то його називають генеалогічним деревом (генеалогією). Якщо ж від пробанда простежують успадкування до батьків та інших більш віддалених предків, такий родовід називається таблицею предків. Після збору відомостей складають графічне зображення родоводу, використовуючи систему умовних позначень, запропонованих у 1931 році А. Юстом і доповнених іншими авторами:

	Чоловік
	Жінка
	стать не в'ясна
	Власник ознаки, що вивчається
	дизиготні (різноїцеві) близнюки
	Монозиготні (однойцеві) близнюки
	шлюб чоловіка з двома жінками
	Гетерозиготний носій рецесивного гена
	Шлюб
	родинний шлюб
	батьки,
	діти і порядок їх народження
	Інтерсекс
	Дитина з вадами розвитку

Виконуючи цю роботу, важливо дотримуватися наступних правил:

1. Складання родоводу починають з пробанда. Брати і сестри пробанда розташовуються в порядку народження зліва направо, починаючи зі старшого.
2. Всі члени родоводу розташовуються строго за поколінням в один ряд.
3. Покоління позначаються римськими цифрами зліва від родоводу зверху вниз.
4. Нумерується арабськими цифрами потомство одного покоління (один ряд) зліва направо.
5. Вказується вік членів сім'ї у зв'язку з тим, що деякі хвороби починають виявлятися в різні періоди онтогенезу.

6. Відзначаються особисто обстежені члени родоводу. Чим більше поколінь простежено в родоводі, тим вона повніше і тим вище шанси на отримання достовірних відомостей. Збір генетичної інформації проводиться шляхом опитування, анкетування, особистого обстеження сім'ї. Опитування зазвичай починається з родичів по материнській лінії: бабусі та дідуся по материнській лінії із зазначенням онуків, дітей кожної дитини бабусі і дідусі. У родовід вносять відомості про викидні, аборти, мертвонародження, безплідні шлюби та ін.

Для визначення типу спадкування аналізують родовід, враховуючи наступні моменти:

- 1) чи зустрічається досліджувана ознака в усіх поколіннях і чи багато членів родоводу володіють ним;
- 2) чи однакова його частота в осіб обох статей і в осіб якої статі вона зустрічається частіше;
- 3) особам якої статі ознака передається від хворого батька або хворої матері;
- 4) чи є в родоводі сім'ї, в яких в обох здорових батьків народжувалися хворі діти, або у обох хворих батьків народжувалися здорові діти;
- 5) яка частина потомства має спадкову ознаку в сім'ях, де хворим є один з батьків.

У залежності від локалізації мутантних генів (в аутосомі чи в статевій хромосомі - гетерохромосомі) та особливостей генних взаємодій (домінантність, рецесивність та ін) розрізняють такі найважливіші типи успадкування моногенних ознак (у тому числі і спадкових хвороб) людини:

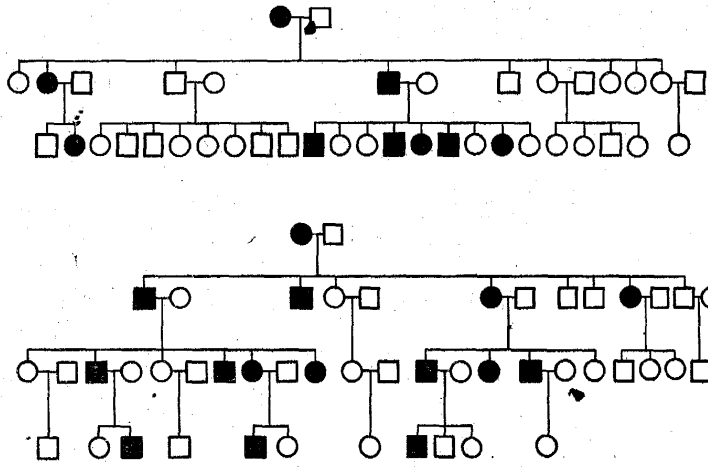
- 1) аутосомно-домінантний (якщо домінантний ген локалізований в аутосомі);
- 2) аутосомно-рецесивний;
- 3) аутосомно - кодомінантний (якщо алельні гени кодомінантні та знаходяться в гомологічних аутосомах);
- 4) Х-зчеплений домінантний;
- 5) Х-зчеплений рецесивний;
- 6) У-зчеплений тип;
- 7) цитоплазматичний тип.

Складання й аналіз родоводів використовують у практиці медико-генетичних консультацій (МГК) для складання генетичних прогнозів та розрахунку ризику появи хворої дитини у родині пробанда. Генеалогії більш зручні для генетичного аналізу, тому що в цьому випадку все потомство походить від однієї подружньої пари. Для визначення генотипів батьків за кількісними співвідношеннями розщеплення у потомстві та розрахунку генетичного ризику появи хворої дитини у родині звичайно об'єднують декілька генеалогій.

Отже, на основі ретельно складеного родоводу можна визначити:

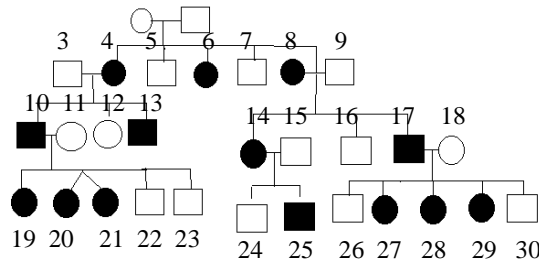
- 1) тип успадкування;
- 2) генотип багатьох осіб родоводу (відносно певного гена);
- 3) ймовірність народження дітей зі спадковим дефектом;
- 4) виявити гетерозиготних носіїв мутантного гена.

**Завдання 2.** Самостійно визначити генотипи батьків і розрахувати ризик народження дитини з патологією в наступному поколінні на прикладі родоводів, представлених на **рис. 4.12.**



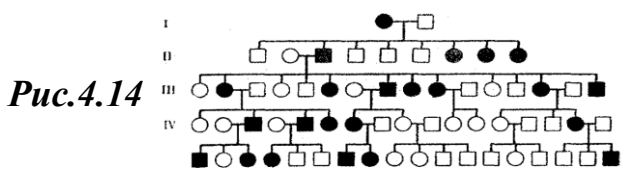
**Рис. 4. 12.-** Родоводи людини з ахондроплазією, на основі аналізу яких можна розрахувати ризик народження хворої дитини в наступному поколінні

**Завдання 3.** У родоводі з ознакою специфічна форма рахіту (**рис.4.13**) вказати можливі генотипи хворих і здорових осіб.

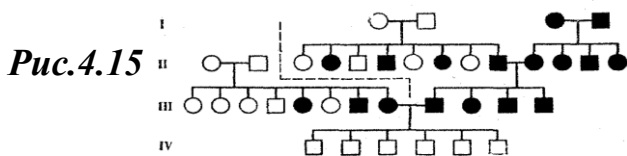


**Рис. 4.13.-** Родовід за ознакою специфічна форма рахіту

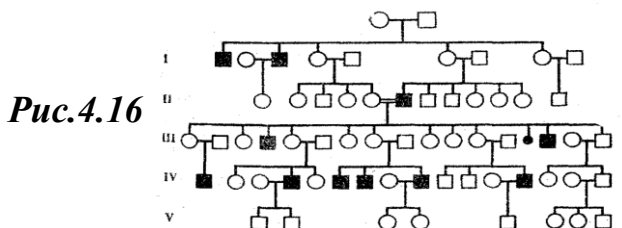
**Завдання 4.** Проаналізувати родоводи, представлені на рисунках 4.14-4.16, визначити характер успадкування ознаки:



Ознака – брахідактілія



Ознака – глухонімота



Ознака - гемофілія А

**Завдання 5.** Скласти родовід за легендою: 1) Пробанд – здорова жінка. Її сестра також здорова, а два брати хворі на дальтонізм. Матір і батько пробанда здорові. Чотирі сестри матері пробанда здорові, чоловіки їх також здорові. Про двоюрідних сибсів з боку матері пробанда відомо, що в одній сім'ї є один хворий брат, а дві сестри і брат здорові. У двох інших сім'ях є по одному хворому брату і по одній хворій сестрі; у четвертій сім'ї – одна здорова сестра. Бабуся пробанда з боку матері здорова, дід був хворим на дальтонізм. З боку батька пробанда не відмічено хворих на дальтонізм. Скласти родовід. Визначити ймовірність народження у пробанда хворих на дальтонізм дітей за умови, якщо вона вийде заміж за здорового чоловіка.

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Скласти родовід власної родини та прослідкувати передачу з покоління в покоління певної спадкової ознаки. Розрахувати ймовірність проявлення цієї ознаки в наступному поколінні.
2. Що дозволяє визначити генеалогічний метод генетики людини?
3. Що таке медико-генетичне консультування? Які цілі та задачі вирішує МГК?
4. В яких випадках медико-генетичне консультування (МГК) необхідне? Які категорії населення перш за все мають стати на облік і повинні обстежитися в МГК?
5. Як правильно скласти родовід і проаналізувати його?
6. Пробанд хворіє на легку форму серпоподібноклітинної анемії. Його дружина здорова. Вона має дочку з легкою формою анемії. Матір і батько пробанда страждали цією ж формою серпоподібноклітинної анемії, інші сибси матері та її батько здорові. У жінки пробанда є сестра, хвора на легку форму анемії, друга сестра померла від анемії. Матір і батько жінки пробанда страждали анемією, крім того відомо, що в батька було два брати і сестра з легкою формою анемії і що в сім'ї сестри батька двоє дітей померли від серпоподібноклітинної анемії. Скласти родовід. Визначити ймовірність народження дітей з тяжкою формою анемії у сім'ї дочки пробанда, якщо вона вийде заміж за такого ж чоловіка, як її батько.



## РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В ПОПУЛЯЦІЯХ

### Лабораторна робота № 20

#### Генетичний аналіз динаміки частот алелей і генотипів у популяції

**Мета роботи:** навчитися визначати співвідношення генотипів у модельній популяції при заданих частотах гамет; дослідити процес зміни частот алелей і генотипів під впливом факторів мікроеволюції – мутацій, міграції, природного добору, дрейфу генів.

**Завдання 1.** Скласти модельну панміктичну популяцію із заданими частотами гамет і впевнитися, що з покоління в покоління частоти генотипів у цій популяції не змінюються.

#### *Хід виконання завдання 1:*

1. Формуються три підгрупи студентів. Кожна підгрупа одержує два мішечка, в кожному – 100 «гамет», співвідношення яких у всіх трьох підгрупах може бути різним, наприклад, в одній підгрупі – 50 носіїв домінуючого алеля (чорних кружалець), 50 – рецесивних (білих); у другій підгрупі це співвідношення може складати 60 на 40, у третій – 70 на 30. Один із студентів вибирає, не дивлячись у мішок, по одному кружальцю («яйцеклітині»), інший вибирає випадковим чином «сперматозоїди», третій студент записує одержані сполучення гамет, тобто «зиготу». Кружальця кожного разу повертають у мішок і ретельно перемішують. Так необхідно повторити 100 разів, чим імітуються умови панміксії.

2. Оформити результати у вигляді таблиці:

Колір кружалець	Чорний Чорний	Чорний Білий	Білий Білий
Генотип	AA	Aa	Aa
Кількість			
Всього			

3. Скласти теоретично очікуване співвідношення генотипів для заданого співвідношення гамет, порівняти з ним фактично одержане співвідношення за методом  $\chi^2$ . Встановити, чи відрізняється одержане співвідношення від очікуваного при  $p > 0,05$ .

**Завдання 2.** У групі студентів, прийнятій за популяцію, підрахувати частоту генів, що зумовлюють колір очей та вільність/прирослість мочки вуха (завдання 2 виконати в позаурочний час).

#### *Хід виконання завдання 2:*

1. Підрахувати кількість студентів у групі, які мають карі та блакитні очі (перша ознака) та вільну (В) або прирослу (в) мочку вуха (друга ознака).
2. Обчислити процент співвідношення домінуючої і рецесивної ознак.
3. Одержані дані внести в таблицю та з урахуванням деяких припущень розрахувати генетичну структуру популяції:

Ознаки	Кількість осіб	$q^2(aa)$ на 100 осіб	$q(a)$	$p(A)$	$p^2(AA)$ на 100 осіб	$2pq(Aa)$
кароокість блакитноокість						
Вільна мочка вуха Приросла мочка вуха						

3. Скласти висновок щодо відповідності фактично одержаного співвідношення частот генотипів теоретично розрахованому та визначити, чи знаходиться популяція у стані рівноваги.

**Завдання 3.** Визначити частоти алелей гена, представленого в панміктичній популяції серією множинних алелей, за такими даними:

найпоширенішими групами крові системи АВО в херсонській популяції є I (0) та II (A) - частота відповідно 0,41 та 0,38. Значно менше (з частотою 0,06) поширена група IV (AB). Визначити частоти алелів гена I, що визначає групи крові системи АВО в херсонській популяції. Чи знаходиться популяція в стані рівноваги? Довести це.

**Пояснення до завдання 3.** Розглянемо хід генетичного аналізу частоти генів із множинними алелями в популяції на прикладі: частоти фенотипів за групами крові системи АВО у популяції наступні: А – 0,45; В – 0,13; АВ – 0,06; О – 0,36. Розрахувати частоту алелей:  $r(i^0)$ ,  $q(I^B)$ ,  $p(I^A)$ .

**Хід аналізу:** Визначаємо, які генотипи можливі в кожній групі. Власники групи А в популяції можуть мати два генотипи:  $I^A I^A$  та  $I^A i^0$  (повне домінування). Власники групи АВ матимуть два алелі в генотипі  $I^A I^B$ , які можуть зустрічатися з різною частотою. Носії третьої групи (В), як і власники другої групи (А), матимуть також два генотипи:  $I^B I^B$  та  $I^B i^0$ . Отже, для визначення частоти алеля підходить лише група О.

Визначаємо частоту рецесивного алеля групи О. Для цього позначимо частоти алелів:  $i^0 - r$ ,  $I^A - p$ ,  $I^B - q$ . Частота алеля  $r(i^0) = \sqrt{r^2 i^0 i^0} = \sqrt{0,36} = 0,60$ .

Сумарна частота груп крові В і О дорівнює  $(q + r)^2 = 0,13 + 0,36 = 0,49$ . Тоді  $q + r = \sqrt{0,49} = 0,70$ . Звідси  $q(I^B) = (q + r) - r = 0,70 - 0,60 = 0,10$ .

Визначаємо частоту домінантного алеля  $p(I^A) = 1 - q - r = 1 - 0,10 - 0,60 = 0,30$ .

Визначимо, чи знаходиться популяція в стані рівноваги. Для цього необхідно визначити частоту гетерозигот  $2pq = 2 \times 0,3 \times 0,1 = 0,06$ . Саме з такою частотою зустрічаються власники групи крові АВ (див. зміст задачі). Отже, популяція знаходиться в стані рівноваги.

**Завдання 4.** Визначити генетичну структуру панміктичних популяцій у стані рівноваги:

1) Серед 2000000 жителів 3% виявилися лівшами, 37% – амбідекстри (однаково добре володіють обома руками). Визначте генетичну структуру популяції, а також

співвідношення фенотипів в ній через 10 років. (популяція знаходиться в рівноважному стані).

2) Деякі форми розумової відсталості при синдромі Лоренца–Муна–Барді–Бідла мають пенетрантність 86%. Визначте генетичну структуру популяції, якщо у місті з мільйонним населенням зареєстровано 200 хворих з даним синдромом.

3) При визначенні груп крові в місті з'ясовано, що серед 4200 чоловік 1218 має групу крові М, 882 людини - групу N і 2100 - групу MN. Визначити частоти алелей у популяції.

4) У пологовому будинку з 1000 породіль у 150 спостерігався імунний конфлікт за резус-фактором. Rh<sup>-</sup> особи зустрічаються в панміктичній популяції з частотою, близькою до 16%. Визначте частоти поширеності алелей у даній вибірці та встановіть генетичну структуру популяції.

5) Вроджений вивих стегна успадковується аутосомно-домінантно, середня пенетрантність 25%, захворювання поширене з частотою 6 : 10 000. Визначити кількість гомозигот за рецесивним геном.

6) У популяції, яка складається з 100 млн. людей, 40 тисяч має рецесивну форму карликовості. Якщо цим особам не дозволити відтворювати потомство та якщо чисельність популяції не зміниться, скільки хворих буде в наступному поколінні?

7) Штучно створена популяція складається з 60% гомозигот за алелем А і 40% гетерозигот. В якому поколінні та з якою ймовірністю в цій популяції проявиться рецесивний ген при умові панміксії?

**Пояснення до завдання 4.** Розглянемо методика визначення генетичної структури популяції у стані панміксії на конкретних прикладах.

**Приклад 1.** У вибірці, що складається з 84000 рослин жита 210 рослин виявилось альбіносами, оскільки у них рецесивний ген (r) знаходиться в гомозиготному стані. Визначити частоти алелей R і r, частоту гетерозиготних за цими генами рослин.

**Хід аналізу.** Визначаємо частоту (q) генотипу rr. Вона буде дорівнювати 210: 84000=0,0025, тоді частота (q) алелю r =  $q = \sqrt{0,0025} = 0,05$ . Частота (p) алелю R = 1 - q = 1 - 0,05 = 0,95. Частота (2pq) гетерозигот Rr-носіїв гена альбінізму = 2 x 0,95 x 0,05 = 0,095.

Структура популяції рослин жита буде мати наступне співвідношення генотипів:  $p^2 RR + 2 pq Rr + q^2 rr = (0,95)^2 + 2 \times 0,95 \times 0,05 + (0,05)^2$ .

**Приклад 2.** Кистозний фіброз підшлункової залози вражає індивідуумів з рецесивним гомозиготним фенотипом і зустрічається серед населення з частотою 1 на 2000. Розрахувати частоту носіїв.

**Хід аналізу.** Носії є гетерозиготами. Частоти генотипів розраховуються за рівнянням Харді-Вайнберга:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , де  $p^2$  – частота домінантного гомозиготного генотипу,  $2pq$  – частота гетерозиготного генотипу,  $q^2$  – частота рецесивного гомозиготного генотипу.

Кистозний фіброз підшлункової залози вражає індивідуумів з рецесивним гомозиготним фенотипом; отже,  $q^2 = 1:2000 = 0,0005$ . Звідси  $q = \sqrt{0,0005} = 0,0224$ . Оскільки  $p + q = 1$ , то  $p = 1 - q = 1 - 0,0224 = 0,9776$ .

Таким чином, частота гетерозиготного фенотипу  $(2pq) = 2 \times (0,9776) \times (0,0224) = 0,044 = 1$  на  $23 \approx 5\%$ , тобто носії рецесивного гена кистозного фіброзу підшлункової залози складають близько  $5\%$  від популяції.

**Завдання 5.** Визначити генетичну структуру популяцій, у якій порушена рівновага під дією факторів, що забезпечують її динаміку. Обчислити коефіцієнт добору:

1. В озимого жита гомозиготний стан рецесивних алелей ff обумовлює повну стерильність квіток. Домінантний алель F як в гомозиготному, так і в гетерозиготному стані обумовлює нормальну фертильність. У вихідній популяції частота рецесивного алеля 0,2. Визначте генетичну динаміку даної популяції до четвертого покоління.

Чому дорівнює коефіцієнт добору S?

Яка частота домінантного алеля?

Яка частота гетерозиготного генотипу в четвертому поколінні?

Яка частота домінантного гомозиготного генотипу?

Яка частота гомозиготного рецесивного генотипу в четвертому поколінні?

2. На острів вітром занесло насіннячко однорічної самоzapильної рослини, гетерозиготної за одним геном. Як буде виглядати рослинний покрив на острові через три роки, якщо припустити, що всі особини виживають, даючи одне покоління за рік? Яка ймовірність знаходження через п'ять років рослини, ідентичної за генотипом з прабатьківським?

3. Яке співвідношення зелених рослин і хлорофільних мутантів гороху слід очікувати в п'ятому поколінні від самоzapилення гетерозиготної рослини? Хлорофільна мутація - рецесивна ознака, мутанти життєздатні. Горох - облігатний самоzapилювач.

4. Чи відповідає формулі Харді-Вайнберга наступне співвідношення гомозигот і гетерозигот у популяції: 4096 AA : 4608 Aa : 1296 aa?

#### **Пояснення до завдання 5.**

У рівноважній популяції жіночі та чоловічі особини мають однакові частоти як алеля A ( $p$ ), так і алеля a ( $q$ ). У результаті схрещування жіночих гамет  $\text{♀}(p + q)$  з чоловічими  $\text{♂}(p + q)$  визначаються частоти генотипів:  $(p + q)(p + q) = p^2 + 2pq + q^2$ . У рівноважній популяції частоти алелей і частоти генотипів зберігаються в низці поколінь.

Знаючи співвідношення домінантних і рецесивних фенотипів у популяції, можна визначити частоту генів і сказати, чи знаходиться ця популяція в рівновазі.

У природних популяціях ці закономірності далеко не завжди здійснюються. Рівновага порушується під впливом мутаційної мінливості, добору, збільшення або зменшення чисельності популяції, ізоляції. А в популяціях людини, крім того, часто панміксія обмежується тим, що шлюби складаються на основі асортативності (вибірковості) за інтелектом, ростом, віком, релігійними, етнічними, расовими ознаками, за суспільним станом тощо.

Першим джерелом спадкової мінливості в популяціях є мутації. Вони виникають у кожному поколінні, поповнюючи генофонд популяції новими генами. Цей процес накопичення мутацій називається мутаційним тиском.

Збереження або загибель носіїв мутацій залежить від їх пристосованості до умов середовища, тобто від того, наскільки їх підхоплює або знищує природний добір. Якщо мутант виживає та розмножується, то його адаптивна цінність дорівнює 1, а коефіцієнт добору дорівнює 0. Якщо ж мутанти зовсім не здатні до розмноження в популяції, їх адаптивна цінність дорівнює 0, а коефіцієнт добору дорівнює 1. У більшості випадків адаптивна цінність мутацій і коефіцієнт добору коливається між 0 та 1. Припустимо, що особини, гомозиготні за рецесивним геном (aa), на кожні 100 нащадків дають 93 рецесивних гомозигот. Адаптивну цінність генотипів AA та Aa можна взяти за 1, тоді адаптивна цінність рецесивних гомозигот становитиме 0,93. У цьому випадку коефіцієнт добору S дорівнюватиме  $1 - 0,93 = 0,007$ . якщо домінантні та рецесивні генотипи мають однакову адаптивну цінність, то коефіцієнт добору цих генів дорівнює 0. Отже, коефіцієнт добору (S) виражає ступінь зменшення або збільшення частоти гена внаслідок добору.

Зміна частоти генів у популяції називається **генетичним дрейфом**. Частота домінантних і рецесивних генів змінюється під дією добору з різною швидкістю. Домінантні мутації піддаються добору зразу ж після виникнення. Рецесивні мутації певний час зберігаються в гетерозиготному стані, тільки при переході в гомозиготний стан вони підлягають дії добору. Тому добір рецесивних генів є менш ефективним: у кожному наступному поколінні рецесивні гомозиготи (aa) виникатимуть з гетерозигот (Aa).

Динаміка популяції виражається в зміні частот різних генотипів у поколіннях. Причинами порушення рівноваги в популяції можуть бути мутації, добір, збільшення або зменшення чисельності популяцій, ізоляція її. Показник збільшення або зменшення частоти відповідного алелю в поколіннях даної популяції називається **коефіцієнтом добору** і позначається буквою S. Він може змінюватися від +1 до -1 і бути спрямований проти домінантного або рецесивного алеля. Рецесивні мутації можуть зберігатися в популяції і з'являтися в ряді поколінь навіть при повній елімінації рецесивних гомозигот, оскільки рецесивні алелі містяться в генотипах гетерозиготних особин.

При  $S = -1 \rightarrow$  (aa) частота рецесивних алелей обчислюється для будь-якого покоління популяції за формулою:

$$q_n = q : (1 + nq),$$

де n — покоління, для якого ведеться розрахунок.

Наприклад, частота рецесивного алеля в популяції п'ятого покоління розраховується наступним чином:

$$q_5 = 0,5 : (1 + 5 \times 0,5) = 0,5 : (1 + 2,5) = 0,143.$$

У нашому прикладі генетична структура популяції у п'ятому поколінні буде обчислюватись наступним чином:

покоління	Частота		Кількість особин у популяції із генотипом, %		
	Домінантного алеля pA	Рецесивного алеля g a	g <sup>2</sup> aa	2pgAa	p <sup>2</sup> AA
вихідне	0,500	0,500	25,00	50,00	25,00
1-е	0,667	0,333	11,12	44,44	44,44
2-е	0,750	0,250	6,25	37,50	56,25
3-е	0,800	0,200	4,00	32,00	64,00
4-е	0,833	0,167	2,78	27,78	69,44

5-e	0,857	0,143	2,04	24,51	73,44
N	$pn = 1 - qn$	$qn = q : (1 +$ $qn)$	$q^2 n$	$2pnqn$	$p^2$

## ЗАВДАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

1. Яким чином визначити, чи знаходиться популяція в стані рівноваги?
2. Як розрізняється генетична структура автогамної, алогамної, апогамної популяцій?
3. Назвіть і коротко охарактеризуйте фактори динаміки популяцій.
4. Що показує коефіцієнт добору? Для чого він використовується?
5. У популяції, яка розмножується шляхом вільного схрещування, визначена частота генотипів: 0,2 AA ; 0,8 Aa. Розрахувати частоти генотипів AA, Aa, aa у першому поколінні після схрещування особин популяції.
6. В Африці на 1 000 000 населення трапляються 4 альбіноси з відсутністю пігментації шкіри. Визначити частку гомозигот (у %) з нормальною для негроїдної раси пігментацією шкіри через 4 покоління.
7. У деякій гіпотетичній державі кожний десятий чоловік – дальтонік. Скільки у цій державі людей, хворих на дальтонізм, якщо населення держави становить 1млн. чоловік, а кількість жінок і чоловіків є однаковою?
8. У рівноважній популяції частота жінок, хворих на гемофілію, становить 0,0001. Частота алеля, що визначає групу крові А, становить 0,251, групу крові В – 0,06. Визначити частоту хворих на гемофілію чоловіків з другою групою крові.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ватти К. В., Тихомирова М. М. Руководство к практическим занятиям по генетике / К.В. Ватти, М.М.Тихомирова. - М.: «Просвещение», 1972.- 179 с.
2. Генетика: Учебник для вузов / Под редакцией Академика РАМН В. И. Иванова.- М: ИКЦ «Академкнига», 2006.- 638 с.
3. Голыгина В. В. Хиромониды – модельный объект кариологических исследований / В.В. Голыгина, О.В. Ермолаева, А.Д, Брошков.- Новосибирск, 2013.- 46 с.
4. Задачи по современной генетике: Учеб. Пособие / Под ред. М. М. Асланяна: М.: КДУ, 2005.- 224 с.
5. Иванова С.В. Практикум по генетике / С.В. Иванова С.В., Л.И. Долгодворова, И.В. Потоцкая, И.А. Фесенко, Л.С. Большакова.- М.: РГАУ-МСХА, 2007.- 254с.
6. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов.-М.: Мир, 1989.- 591 с.
7. Никольский В. И. Практические занятия по генетике : учеб. пособие для студ. учреждений высш. пед. проф. образования / В.И. Никольский.-М.:Издательский центр «Академия», 2012. - 224 с.
8. Орлова Н. Н. Генетический анализ. Учеб. Пособие / Н.Н.Орлова.- М.: Изд-во МГУ, 1991.- 318 с.

## ДОДАТОК А

### Характеристика форм нестатевого і статевого розмноження одноклітинних і багатоклітинних організмів

Форма розмноження	Коротка характеристика процесів, що відбуваються	Організми, яким властива ця форма розмноження
1	2	3
<b><i>Нестатеве розмноження одноклітинних організмів</i></b>		
Поділ	Спочатку мітотичний поділ ядра (каріокінез), потім у цитоплазмі виникає перетинка, яка весь час поглиблюється (цитокінез). Дочірні клітини одержують рівну кількість спадкової інформації, органели розподіляються рівномірно. Якщо ж певна органела знаходиться у материнській клітині поодинокі, то вона опиняється в одній з дочірніх клітин, а в іншій формується знову (джгутик евглени). Після поділу дочірні особини, які є вдвічі меншими за материнську, ростуть і після досягнення розмірів материнського організму переходять до нового поділу.	Амеби, джгутикові, інфузорії
Ендогонія	Внутрішнє брунькування, з утворенням двох дочірніх особин – <b><i>ендодіогоній</i></b> . Але можливе і множинне внутрішнє брунькування, що призводить до шизогонії.	Токсоплазма
1	2	3
Шизогонія, або множинний поділ	Ця форма розмноження виникла із попередньої і чергується із статевим розмноженням. Відбувається багаторазовий поділ ядра без цитокінеза, потім вся цитоплазма поділяється на часточки, що обособлюються навкруги ядер. У результаті з однієї клітини утворюються багато дочірніх.	Малярійний плазмодій
Брунькування	На материнській клітині спочатку утворюється невелика брунька, що містить дочірнє ядро (нуклеоїд). Брунька росте, і після досягнення нею розмірів материнської особини відокремлюється.	Бактерії, дріжджі, сисні інфузорії
Спороутворення	Спора - спеціалізована клітина, яка служить для розмноження, є однією із стадій клітинного циклу. У деяких видів водоростей і грибів спори мають органели руху і здатні активно пересуватися у вологому середовищі. Спори без джгутиків вкриті щільною оболонкою, здатні зберігати життєздатність декілька десятків років і поширюються вітром, водою, іншими організмами. У	Тварини типу Найпростіші, класу Споровики; нижчі рослини



	паразитичних найпростіших (споровики) спори або цисти (одноклітинні або багатоклітинні) з щільною оболонкою не є формою нестатевого розмноження, а служать для існування у несприятливих умовах середовища та поширення (ураження нових хазяїв). Цисти з тією ж метою утворюються і в деяких груп бактерій.	
<b>Вегетативне розмноження багатоклітинних організмів</b>		
Невпорядкований поділ	Новий організм утворюється з групи клітин, що відокремлюються від материнського організму. При цьому кількість і розміри частин, на які розпадається організм, є непостійними. У губок та гідри за рахунок розмноження групи клітин на тілі утворюються випинання (бруньки). У бруньку входять клітини екто- та ентодерми. У гідри брунька поступово збільшується, на ній формуються щупальця. Потім вона відділяється від материнської особини. Плоскі, війчасті і кільчасті черви поділяються перетинками на декілька частин, у кожній з яких відновлюються органи, яких не вистачало.	Губки, деякі кишковопорожнинні; війчасті, плоскі та кільчасті черви; голкошкірі
Впорядкований поділ	Кількість і розміри фрагментів, що утворюються, більш-менш постійні. У деяких кишковопорожнинних зустрічається розмноження <b>стробіляцією</b> : поліплоїдний організм інтенсивно росте, при досягненні певних розмірів починає ділитися поперечними перетинками на дочірні особини - медузи, які відокремлюються і самостійно плавають. У багатьох видів кишковопорожнинних вегетативна форма розмноження чергується із статевою.	Морські зірки, деякі медузи, поліпи кишковопорожнинних
Брунькування	Від материнського організму відокремлюється одно або декілька багатоклітинних утворень – бруньок, які з часом розвиваються у самостійні організми	Поліпи кишковопорожнинних, деякі кільчасті черви
Фрагментація	Нові особини розвиваються з окремих частин батьківського організму (стебла, листа, кореня) або їх видозмін (цибулини, бульби, кореневища тощо)	Вищі рослини
Поліембріонія	Особлива форма розмноження. Ембріон поділяється на декілька частин, кожна з яких розвивається як самостійний організм	Як постійне явище притаманна комахам (оси – їздці), ссавцям (броненосець). Прикладом поліембріонії у ссавців і людини є монозиготні близнюки.

		Зустрічається у в'їчастих і кільчастих черв'їв, іноді у членистоногих, риб, птахів.
<b>Статеве розмноження одноклітинних організмів</b>		
Кон'югація	<p>Особини зближуються попарно, між ними утворюється протоплазматичний місток. Одночасно в ядерному апараті кожного з партнерів макронуклеус (велике за розмірами ядро) розчиняється, мікронуклеус (маленьке ядро) поділяється з утворенням гаплоїдних стаціонарного та мігруючого ядер. Мігруюче ядро переходить у цитоплазму партнера. У кожному з них стаціонарне та мігруюче ядра зливаються з утворенням синкаріону з диплоїдним набором хромосом, з якого у подальшому формуються макро- та мікронуклеуси. Завдяки обміну каріоплазмою спадкова інформація кожної особини змінюється.</p> <p>У бактерій дві особини (жіноча, реципієнтна та чоловіча, донорська) утворюють між собою протоплазматичний місток, через який частина нитки ДНК переходить з донорської клітини у реципієнтну, що призводить до виникнення генетичної різноманітності спадкового апарату клітини (комбінативної мінливості).</p>	Інфузорії – тварини типу Найпростіші; бактерії.
Гаметична копуляція	<p>Це процес, при якому дві особини набувають статевих різниць, формуються статеві елементи і повністю зливаються з утворенням зиготи. У процесі еволюції ступінь відмінності гамет збільшується:</p> <p>I етап. <b>Ізогамія</b></p> <p>Морфологічної диференцировки гамет не відбувається. У одноклітинних тварин ядро ділиться мейозом, три гаплоїдних ядра підлягає лізису, а клітина, що залишилася, набуваючи джгутиків, стає рухливою ізогаметою.</p>	Черепашкова кореніжка полістомела (Polystomella), джгутиконосець політома (Polytoma).
<b>Статеве розмноження багатоклітинних організмів</b>		
Гаметична копуляція	<p>II етап. <b>Анізогамія</b></p> <p>Відбувається диференціація гамет на великі і дрібні клітини, які є рухливими. Зливаються попарно не тільки велика гамета з малою, але мала з малою, велика гамета з великою ніколи не зливається. Отже, у пандоріні поряд з появою анізогамії зберігається ізогамія.</p> <p>Макро – і мікрогамети є рухливими, але зливаються лише різні гамети, тобто проявляється виключно анізогамія.</p>	Колоніальний джгутиконосець Pandorina morum  Колоніальний

		джгутиконосець <i>Eudarina elegans</i>
Гаметична копуляція	III етап. <b>Овогамія</b> Гамети різко відрізняються за розмірами, велика гамета є нерухливою. Розвиток гамет відбувається у статевих залозах – гонадах. Розрізняють два типи статевих клітин: чоловічі (сперматозоони) та жіночі (яйцеклітини). Сперматозоони розвиваються у сім'яниках, яйцеклітини – в яєчниках.	Вольвокс ( <i>Volvox globator</i> )  Багатоклітинні тварини
Гермафродитизм	Чоловічі і жіночі статеві клітини розвиваються в межах однієї особини. При природному гермафродитизмі чоловічі і жіночі статеві залози можуть функціонувати одночасно протягом всього життя особини. У таких випадках організми, як правило, мають ряд пристосувань, які запобігають самоzapлідненню. У деяких молюсків статеві залози періодично продукує або яйцеклітини, або сперматозоони, що залежить від віку особини та умов існування. Наприклад, в устриць це може бути обумовлено переважанням білкового або вуглеводного живлення.	Плоскі, кільчасті черви, молюски. Спостерігається у деяких груп вищих тварин і людини лише як патологічний стан, який є наслідком порушень в ембріогенезі

**Нерегулярні типи статевого розмноження багатоклітинних організмів**

Статеве розмноження без запліднення – <b>апоміксис</b>	<b>Апоміксис</b> – спосіб статевого розмноження, коли відсутня каріогамія і зародок розвивається з клітин гаметофіту при різних порушеннях спорогенезу (у рослин) і статевого процесу (у тварин) аж до повної їх відсутності. У рослин–апоміктів розвиваються зовнішньо нормальні квітки, але мейоз найчастіше замінюється мітозом, тому зародкові мішки та пилкові зерна є аномальними, яйцеклітина та інші елементи зародкового мішка є диплоїдними. Запилення приймочок пилком виконує у одних видів стимулятивну роль, у інших – є необов'язковим. Типами апоміксису є: 1. <b>Партеногенез</b> – апоміктичне розмноження на основі розвитку зародка з незаплідненої яйцеклітини. Буває гаплоїдним (генеративним) та диплоїдним (соматичним), постійним (облігатним) або циклічним (факультативним). При <b>облігатному диплоїдному партеногенезі</b> яйцеклітини розвиваються без запліднення і дають лише особин жіночої статі. При <b>факультативному партеногенезі</b> із запліднених яєць розвиваються самки, з незапліднених – самці з гаплоїдним набором	Вищі рослини – апомікти, деякі види комах, нижчі ракоподібні          Деякі види рослин (ястребінка), кавказська скальна ящірка, злакові (м'ятлик лужний). Бджоли, мурашки, коловратки, паразитичні оси, червеці, кліщі, попелиці, ракоподібні
--	--	--

	<p>хромосом (арренотокія). Мейоз у самця відсутній – з одного сперматоґонію утворюється один сперматозоїд. Влітку у попелиць, коловраток, дафній існують лише самки, що розмножуються партеногенетично, а восени на зміну партеногенезу приходить розмноження із заплідненням - <b>гетерогенія</b>. Різновидом партеногенезу є гіногенез та андрогенез.</p> <p><b>Гіногенез</b> – розвиток зародка виключно за рахунок ядра яйцеклітини та її цитоплазми. Дробіння яйцеклітини активується сперматозоїдом, який не приймає участь у заплідненні. Чоловічий пронуклеус гине, організм розвивається за рахунок жіночого пронуклеусу.</p> <p><b>Андрогенез</b> – розвиток зародка тільки за рахунок чоловічого пронуклеусу у випадку загибелі жіночого пронуклеусу. Зустрічається дуже рідко.</p> <p>2. <b>Апогаметія</b> – утворення зародка із незапліднених синергід або антипод, які можуть бути диплоїдними і гаплоїдними.</p> <p>3. <b>Апоспорія</b> – зародковий мішок розвивається із соматичних клітин насінного зачатка, а не з гаплоїдної мегаспори. Він розвивається як додатковий до основного зародкового мішка і розміщений збоку від нього (у халазальній частині).</p> <p>4. <b>Адвентивна ембріонія</b> – утворення зародка безпосередньо з клітин нуцелусу або інтегументу насінного зачатка, тобто ззовні зародкового мішка. У межах одного насінного зачатка утворюється велика кількість зародків поруч із зиготичним зародком.</p>	<p>(дафнії).</p> <p>Гермафродитні круглі черви, деякі риби</p> <p>Їздець <i>Nabrobracon</i>, тутовий шовкопряд, порода індиків.</p> <p>Деякі різновиди льону, кукурудзи, рису, соняшника.</p> <p>Родина Айстрові: різні види ястребінок та соняшника.</p> <p>Види цитрусових</p>
<p><b>Партенокарпія</b></p>	<p>Плоди розвиваються навіть при відсутності насіння і дегенерації насінних зачатків. У результаті утворюються безнасінні плоди</p>	<p>Плодові (груша, яблуна), цитрусові (лимон, апельсин), овочеві (огірок, гарбуз, томат), ананас</p>
<p>Статеве розмноження із заплідненням – <b>амфіміксис</b>, або <b>еугамія</b></p>	<p>Статеві клітини розвиваються із первинних статевих клітин, які обособлюються на ранніх стадіях зародкового розвитку: у аскариди, ракоподібних, комах, жаби – в процесі дробіння, у плазунів і птахів – на стадії гастрული, у ссавців і людини – під час раннього органогенезу. Первинні статеві клітини мають ряд морфологічних та біохімічних особливостей на відміну від соматичних клітин. Зародок утворюється в результаті злиття жіночої і чоловічої гамет з наступною каріогамією.</p>	<p>Більшість вищих рослин і тварин</p>

