

УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ ДЛЯ ВЫСШИХ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

З. В. АБРАМОВА, О. А. КАРЛИНСКИЙ

ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИКЕ

Издание 3-е, переработанное и дополненное

Допущено Главным управлением высшего и среднего
сельскохозяйственного образования Министерства
сельского хозяйства СССР в качестве учебного пособия
для студентов высших сельскохозяйственных учебных
заведений по агрономическим специальностям



ЛЕНИНГРАД · КОЛОС

Ленинградское отделение · 1979

ББК 41.3

А16

УДК 631.5:581.15 (076.5)

Рецензент заведующая лабораторией радиобиологии Кишиневского сельскохозяйственного института кандидат с.-х. наук
О. В. БЛЯНДУР

Научный редактор доктор биологических наук, профессор
Т. С. ФАДЕЕВА

Абрамова З. В., Карлинский О. А.

А16 Практикум по генетике / [Науч. ред. Т. С. Фадеева]. — 3-е изд., перераб. и доп. — Л.: Колос. Ленингр. отд-ние, 1979. — 192 с., ил. — (Учебники и учеб. пособия для высш. с.-х. учеб. заведений).

В практикуме даны методика проведения лабораторно-практических занятий по основным разделам генетики, задания, выполняемые студентами во время летней учебной практики. Ряд заданий рассчитан на самостоятельную работу студентов, выполняемую ими в виде научных исследований, курсовых и дипломных работ. В 3-м издании (2-е вышло в 1974 г.) многие разделы дополнены новыми материалами. Больше внимания уделено хромосомной теории наследственности.

А $\frac{40302-138}{035(01)-79}$ 168—79. 3803000000

ББК 41.3
631



© Издательство «Колос», 1974

© Издательство «Колос», 1979, с изменениями

ПРЕДИСЛОВИЕ

Практикум по генетике включает изучение цитологических основ наследственности, закономерностей наследственности и изменчивости, а также биологии цветения и размножения растений. Значительное место в нем отведено гибридологическому анализу — одному из основных методов генетики. Дана методика изучения развития органов и признаков у растений в онтогенезе, рассмотрены вопросы модификационной и мутационной изменчивости, полиплоидии, отдаленной гибридизации. Ряд заданий посвящен анеуплоидии, позволяющей устанавливать группы сцепления и создавать формы с замещенными хромосомами. Большое значение придается генетике популяций; по этой теме также дана серия заданий.

Практикум предназначен для студентов агрономических специальностей сельскохозяйственных вузов, поэтому изучение основных генетических вопросов дано, как правило, на примере наиболее распространенных культурных растений — ржи, пшеницы, гороха, гречихи и других, с которыми впоследствии и придется работать будущему агроному.

Учебное пособие предусматривает проведение как зимних лабораторных занятий, так и занятий во время летней учебной прак-

тики. Некоторые задания могут быть выполнены студентами самостоятельно как научная работа.

Практикум составлен в виде отдельных тематических работ. Каждой работе предпосланы конкретные задания и перечень необходимых материалов и оборудования, даны краткие теоретические предпосылки, позволяющие глубже понять сущность выполняемой работы. Кроме того, в каждом задании указан объект (вид растения и его сорт), с которым лучше всего проводить занятие.

По каждой теме, как правило, дана методика проведения нескольких заданий, что позволит преподавателю выбрать те из них, которые наиболее соответствуют уровню оснащенности кафедры.

Задания построены таким образом, чтобы каждое из них имело элементы научных исследований: овладение соответствующей методикой генетических исследований на современном научном уровне, проведение эксперимента, форма записи полученных экспериментальных данных, их анализ. Задания составлены так, чтобы студент мог применить освоенную им методику для решения практических вопросов селекции и семеноводства, растениеводства, овощеводства, плодоводства и др. При разработке рабочей программы преподаватель может включить в одно занятие несколько заданий, относящихся к данной теме. Например, двухчасовое занятие по изучению митоза может включать овладение техникой приготовления временных цитологических препаратов или определение митотической активности меристемы точки роста проростков или зародышевых кор-

ней семян. При проведении занятия по изучению мейоза целесообразно дополнить его изучением этого процесса у диплоидов, автотетраплоидов и амфидиплоидов. Занятие по микроспорогенезу может включать изучение процесса дегенерации пыльцы у стерильных аналогов и т. д. Сравнительное изучение этих процессов у растений различной генетической природы научит студентов использовать теоретические исследования для решения практических вопросов.

Можно занятия строить и по другому принципу: при изучении мутагенеза, полиплоидии, гетерозиса и других вопросов генетики на одном занятии рассматривать все вопросы — фенотипические особенности растений, имеющих соответствующую генетическую природу, их кариологические и эмбриологические особенности. Целый ряд заданий может быть выполнен как самостоятельная научная работа. С этой целью в практикуме приведен в виде отдельных заданий комплекс наблюдений и оценок соответствующих растений. Например, в разделе «Полиплоидия» даны методика получения полиплоидных растений, примерная форма учета морфологической изменчивости растений с измененным числом хромосом, техника подсчета числа хромосом и др. По этому же принципу построены задания по изучению генетической несовместимости, по гибридологическому анализу, мутационной изменчивости и др.

Для разработки методики исследования при выполнении дипломной работы могут быть использованы методические указания по соответствующим разделам практикума.

Разделы «Цитологические основы наследственности», «Биология полового размножения», «Техника скрещивания», «Полиплоидия», «Онтогенетическая изменчивость», «Инбридинг и гетерозис», «Цитоплазматическая мужская стерильность», «Дрозофила как объект изучения закономерностей наследственности и изменчивости» написаны З. В. Абрамовой, «Генетический (гибридологический) анализ», «Изменчивость», «Генетика популяций» — О. А. Карлинским. Значительно переработан раздел «Онтогенетическая изменчивость». Заново написаны З. В. Абрамовой разделы «Изучение и идентификация хромосом у растений», «Изучение мейоза и определение фертильности пыльцы у тритикале», «Онтогенетическая изменчивость», «Определение общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности сортов и линий», «Цитоплазматическая мужская стерильность».

Авторы выражают глубокую благодарность научному редактору профессору Т. С. Фадеевой, рецензенту О. В. Бляндур, а также профессорам Г. И. Наумову, Н. Н. Колеснику, Д. С. Омарову, доцентам А. Я. Валайнису, С. И. Леонтьеву и другим за полезные советы и ценные указания.

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

Генетика изучает наследственность и изменчивость организмов. Клетка — основа строения и жизнедеятельности всех животных и растений, поэтому все проявления наследственности и изменчивости могут быть поняты только после изучения строения клетки и ее функций. Раздел генетики, который изучает явления наследственности и изменчивости на основе гибридологического (генетического) и цитологического методов, получил название цитогенетики.

Объектом цитогенетических исследований является клетка, в особенности хромосомы, их морфология, биохимия и физиология.

Изучение клетки ведется преимущественно с помощью светового микроскопа. Для изучения морфологии клетки, помимо обычной световой микроскопии, применяют поляризационную, фазово-контрастную, люминесцентную, ультрафиолетовую микроскопию, что позволяет изучать клетку в живом состоянии, а также определять химический состав клетки в целом и отдельных ее органелл. В последние годы для изучения клетки широко используют электронный микроскоп, позволяющий рассматривать органеллы клетки размером $8 \cdot 10^{-8}$... $10 \cdot 10^{-8}$ см, т. е. предельно мелкие клеточные структуры.

ДЕЛЕНИЕ КЛЕТКИ

Митоз

Задание. Внимательно рассмотреть клетки, находящиеся в интерфазе, профазе, метафазе, анафазе и телофазе, и зарисовать их. Особое внимание обратить на хромосомы.

Материал и оборудование. 1. Препарат с продольными срезами корешков лука или другого растения, 2. Микроскоп, 3. Рисуальный аппарат.

Пояснения к заданию. Митоз (кариокинез) — сложный тип деления, протекающий в клетках и являющийся основным способом их размножения. Длительность периода от одного деления до другого, совокупность процессов, происходящих в клетке при этом, называется митотическим циклом.

В процессе митотического цикла происходит сначала удвоение, а затем равномерное распределение наследственного материала, заключенного в хромосомах, между двумя вновь образующимися дочерними клетками. В результате митоза из одной материнской клетки образуются 2 дочерние. Ядро каждой дочерней клетки имеет, как правило, такой же набор хромосом, какой был в исходной материнской клетке. Разделение же цитоплазмы (цитокинез) и ее органелл (пластид, митохондрий, рибосом и др.) между дочерними клетками совершается не с такой правильностью, поэтому дочерние клетки не всегда бывают одинаковыми по размеру и форме.

Интерфаза. Между двумя митотическими делениями клетка растет, функционирует, подготавливаясь к последующему митозу. Это состояние клетки называется интерфазой. В интерфазе ядро имеет шаровидную или эллипсоидную форму и, как видно на препаратах, сравнительно гомогенное строение. В нем бывает хорошо видно одно или несколько ядрышек. В интерфазе идет подготовка клетки к митозу, протекают сложные биохимические процессы: репликация (с удвоением) молекул ДНК, синтез белков и других веществ, необходимых для прохождения митотического цикла.

В интерфазе различают 3 периода: G_1 — пресинтетический, S — синтетический, на котором происходит репликация ДНК, и G_2 — постсинтетический.

В процессе митоза различают 4 последовательно идущие фазы: профазу, метафазу, анафазу и телофазу (рис. 1).

Профаза. Различают раннюю и позднюю профазы. На ранней профазе ядро клетки сохраняет тот же вид, что и в интерфазе, но в нем обнаруживаются нити хроматина. В поздней профазе усиливается спирализация хроматиновых нитей, в результате чего они приобретают форму, присущую хромосомам данного вида, становятся более плотными и короткими. Каждая хромосома, состоящая из двух хроматид, спирально скрученных и соединенных в центромерном районе, четко проявляется.

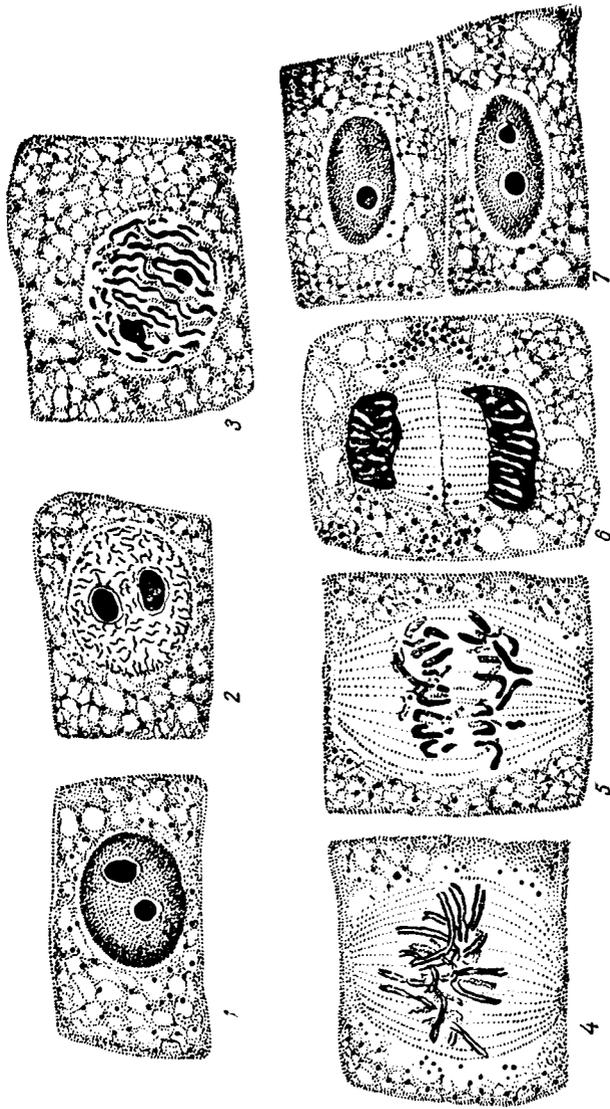


Рис. 1. Митоз в клетках корешка лука:

1 — интерфаза; 2, 3 — профаза; 4 — метафаза; 5 — анафаза; 6 — телофаза; 7 — цитокinesis

В конце профазы происходят фрагментация ядерной оболочки и исчезновение ядрышек.

Метафаза. В этой фазе хромосомы концентрируются в центре клетки и располагаются в одной плоскости, образуя так называемую метафазную (экваториальную) пластинку. Центромера каждой хромосомы располагается строго в плоскости экватора клетки, а плечи хромосом бывают вытянуты более или менее параллельно нитям веретена. В метафазе хорошо выявляются число хромосом, форма и строение метафазной хромосомы, особенно если рассмотреть клетку с полюсов. В метафазе окончательно формируется митотический аппарат — ахроматиновое веретено. Оно состоит из нитей, тянущихся от одного полюса клетки к другому. Нити веретена состоят из фибриллярных белков.

Анафаза. Эта фаза митоза начинается с одновременного деления центромер всех хромосом данной клетки. Сразу же после деления центромер хроматиды каждой хромосомы отделяются одна от другой и расходятся к противоположным полюсам клетки. В это время их уже следует называть сестринскими (дочерними) хромосомами. Все сестринские хромосомы начинают двигаться к полюсам одновременно. В первую очередь отталкиваются центромерные участки хромосом, а затем конечные участки плеч. Если хромосома по какой-либо причине утратила центромеру, то она теряет способность ориентированного перемещения к полюсу и нарушает картину нормального течения анафазы. Фрагменты такой хромосомы могут сохраниться в клетке только в том случае, если они присоединятся к другой хромосоме, имеющей центромеру. Движение хромосом в анафазе происходит при взаимодействии двух процессов: сокращения тянущих нитей веретена, связывающих хромосомы с полюсами клетки, и удлинения опорных нитей веретена, связывающих оба полюса.

Телофаза. В начале телофазы заканчивается движение хромосом, и в клетке начинаются структурные преобразования: дочерние хромосомы деспирализуются и утрачивают видимую индивидуальность. Образуется ядро, окруженное оболочкой, восстанавливаются ядрышки (одно или несколько) в том же количестве, в каком они были в ядре материнской клетки, происходит постепенное разделение всего содержимого клетки. Этот процесс образования двух новых клеток называется цитокинезом,

или плазмотомией. Он начинается с того, что в экваториальной части материнской клетки утолщаются опорные нити веретена и между ними образуется клеточная перегородка.

Выполнение задания. Изучать фазы митоза лучше всего на постоянных препаратах продольных срезов корешков лука или других растений. Для этой цели корешки фиксируют по Навашину, окрашивают гематоксилином по Гейденгайну. Если нет постоянных микротомных препаратов, можно использовать давленные временные или полупостоянные препараты (см. с. 24).

Препарат помещают на столик микроскопа, при объективе $\times 9$ находят соответствующую фазу митоза, затем переводят на объектив $\times 40$ или $\times 90$, изучают и зарисовывают клетки, находящиеся в различных фазах митоза, обращая внимание на состояние ядра, ядерной оболочки, ядрышка, цитоплазмы. Особенно внимательно следует рассмотреть состояние хромосом в каждой фазе митоза.

Митотическая активность

Задание. Определить митотический индекс (МИ) меристемы конуса нарастания стебля или корешка в зависимости от предварительной обработки семян ингибиторами или стимуляторами роста.

Материал. Препараты с продольными срезами конуса нарастания стебля или корешка лука, бобов или другого растения.

Пояснения к заданию. Митотическая активность тканей определяется отношением числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу клеток на данном участке, например в зоне меристемы корешка. Это отношение выражают либо в процентах или в виде показателя, который получил название митотического индекса (МИ). Митотический индекс чаще всего выражают в промилле (‰), т. е. в числе митозов на 1000 клеток исследуемого участка ткани.

Митотическую активность можно изучать как на постоянных микротомных препаратах, так и на давленных временных и полупостоянных препаратах. При этом нужно уметь хорошо отличать по форме и величине клетки зоны деления от клеток других зон. Для занятия используют специальные препараты продольных срезов корешков лука, кормовых бобов, гречихи, сахарной свеклы и других культур, семена которых были предвари-

тельно обработаны стимуляторами или ингибиторами роста.

Выполнение задания. 1. Внимательно рассмотреть под микроскопом (объектив $\times 9$, окуляр $\times 15$) постоянные или временные препараты продольных срезов корешков и установить зону деления клеток (меристема конуса нарастания корня). На постоянном препарате четко видны ряды клеток. На каждом срезе считают число клеток в одном ряду и умножают на число рядов. Затем считают число клеток, находящихся в различных фазах митоза. На временных давленных препаратах подсчитывают общее число клеток, находящихся в митозе, в 10...5 полях зрения.

2. Подсчитать общее число клеток в контроле и в соответствующем варианте опыта и записать в таблицу (табл. 1).

Таблица 1. Митотический индекс в зоне деления корешков лука, имеющих различную длину

Длина корешка в момент фиксации, мм	№ срезов	Число клеток в зоне деления						Митотический индекс (МИ), ‰
		Всего	В том числе в митозе					
			Всего	Профаза	Метафаза	Анафаза	Телофаза	
5	1	1846	42	18	7	9	8	$\frac{47,3}{1881} \cdot 1000 =$ $= 25$
	2	1614	36	16	5	6	9	
	3	2182	64	28	8	12	16	
	Всего	5642	142	62	20	27	33	
	Среднее	1881	47,3	20,7	6,0	9,0	11,0	
20	1	1265	16	10	2	1	3	$\frac{19,3}{1254} \cdot 1000 =$ $= 15,4$
	2	1437	24	11	4	4	5	
	3	1060	18	8	3	3	4	
	Всего	3762	58	29	9	8	12	
	Среднее	1254	19,3	9,6	3,0	2,7	4,0	

3. Подсчитать число клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы и записать в соответствующие графы той же таблицы.

4. Аналогичные подсчеты проводят на других срезах этого и других корешков. Желательно для получения достоверных данных подсчеты проводить на 3...4 срезах

у 5...10 корешков в каждом варианте опыта. Если занятие проводится на однотипном материале, то среднее по каждому варианту опыта можно вывести на основании суммирования результатов наблюдения всех студентов группы.

5. Определить митотический индекс (МИ), т. е. отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в промилле по формуле $МИ = (M/N) 1000$, где M — число митозов; N — число клеток в зоне деления.

6. Записать заключение по данному эксперименту и определить зависимость митотической активности меристемы от длины корня.

Мейоз

Задание. Внимательно рассмотреть клетки, находящиеся в различных фазах мейоза, и зарисовать их.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты пыльников или целых соцветий во время микроспорогенеза. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка. 4. Иммерсионное масло. 5. Ацетокармин или ацетолакmoid.

Пояснения к заданию. Мейоз — особый вид деления, протекающий в материнских клетках микроспор и мегаспор (макроспор). В результате мейоза образуются споры, которые в дальнейшем дают начало мужскому гаметофиту (пыльцевому зерну) и женскому гаметофиту (зародышевому мешку). В процессе мейоза число хромосом в клетке редуцируется (уменьшается вдвое). Их число становится гаплоидным. В процессе оплодотворения происходит слияние двух гаплоидных половых клеток — отцовской и материнской, и в зиготе восстанавливается диплоидный набор хромосом, присущий соматическим клеткам.

Мейоз состоит из двух последовательных делений. Первое деление, в результате которого образуются клетки с гаплоидным набором хромосом, называется редукционным, или гетеротипическим; второе деление называют эквационным, или гомотипическим. Оно протекает по типу митоза. Каждое деление в свою очередь состоит из ряда последовательных фаз (рис. 2). Фазы, относящиеся к первому делению, принято обозначать цифрой I, ко второму — II.

Между I и II делениями клетки находятся в состоянии интеркинеза.

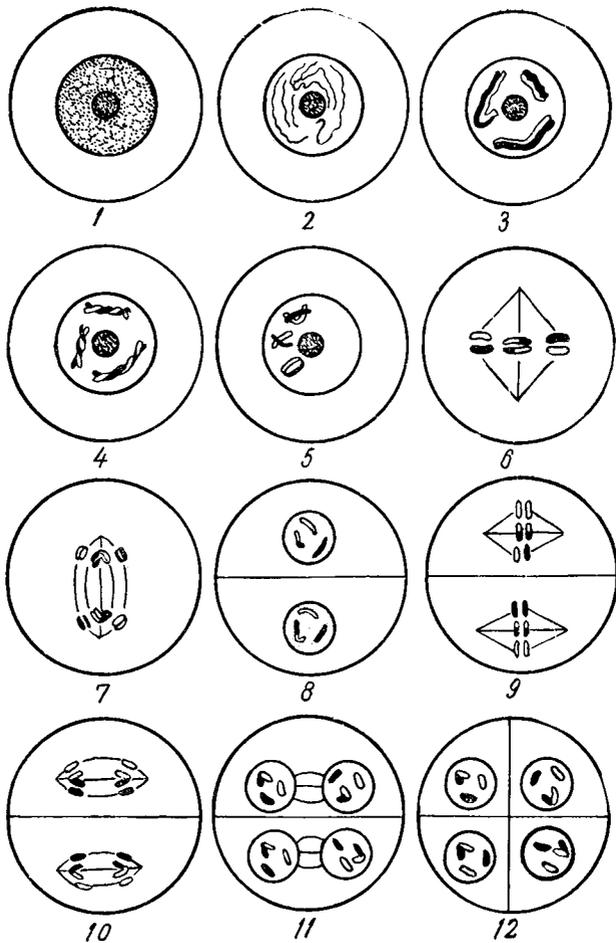


Рис. 2. Схема мейоза у покрытосеменных растений (по А. И. Агабековой и Е. И. Устиновой, 1971):

1 — интерфаза; 2...5 — профаза I (2 — лептогена; 3 — зиготена; 4 — пахитена; 5 — диакинез); 6 — метафаза I; 7 — анафаза I; 8 — интеркинез; 9 — метафаза II; 10 — анафаза II; 11 — телофаза II; 12 — образование тетрады микроспор

Профаза I. Фаза мейоза, во время которой происходят сложные структурные преобразования хромосомного материала. Она состоит из ряда последовательных стадий: лептонемы, зигонемы, пахинемы, диплонемы * и диакинеза.

В лептонеме хромосомы имеют вид длинных тонких нитей, собранных в ядре в виде рыхлого клубка. Каждая хромосома состоит из двух хроматид.



В зигонеме происходит конъюгация, или синапсис (соединение попарно), гомологичных хромосом. Конъюгация обычно начинается с концов и распространяется вдоль хромосомы.

В пахинеме гомологичные хромосомы, соединенные в биваленты, укорачиваются и утолщаются вследствие спирализации. Такие пары хромосом называют бивалентами. Каждый бивалент состоит из четырех хроматид.

В диплонеме хромосомы, соединенные в биваленты, начинают отходить одна от другой. Процесс расхождения начинается с отталкивания центромерных участков гомологичных хромосом. По фигурам бивалентов распознают, произошел ли кроссинговер (т. е. обмен участками между хроматидами гомологичных хромосом, обусловливающий рекомбинацию генов) и был ли он одинарным или двойным. При этом хромосомы образуют χ -образные фигуры, называемые хиазмами. По месту соединения гомологичных хромосом на этой стадии устанавливают место кроссинговера.

* Иногда эти стадии называют лептотена, зиготена, пахитена и диплотена.

На стадии диакиннеза происходит сильное утолщение и укорочение хромосом. Гомологичные хромосомы остаются соединенными только в одной или нескольких точках. Биваленты в это время располагаются по периферии ядра.

Метафаза I. В этой фазе заканчивается формирование митотического аппарата, исчезает ядерная оболочка, биваленты располагаются в цитоплазме по экватору клетки. Центромеры хромосом прикреплены к тянущим нитям веретена. В отличие от митоза в метафазе I мейоза центромеры не делятся.

Анафаза I. Гомологичные хромосомы начинают расходиться к противоположным полюсам клетки. Вследствие кроссинговера хромосомы не всегда бывают идентичны исходным, вступившим в мейоз (рис. 3).

Телофаза I. Хромосомы концентрируются на полюсах и деспирализуются. На полюсах формируются ядра, нити веретена исчезают. На экваторе клетки формируется оболочка (происходит цитокинез), образуется диада клеток. У многих видов растений в телофазе I хромосомы не деспирализуются, образования клеточной оболочки не происходит. В этом случае телофаза является переходной фазой ко II делению мейоза.

Интеркинез. Фаза между I и II делениями мейоза. У некоторых видов растений она может быть довольно длительной. В этом случае образуется диада гаплоидных клеток (см. рис. 7, A). У других видов растений, у которых микроспорогенез протекает по симультанному (одновременному) типу, сразу после телофазы I наступает II деление мейоза (см. рис. 7, B).

Профаза II. В ядрах клеток диады четко проявляются хромосомы, каждая из которых состоит из двух хроматид, соединенных центромерой. Они имеют вид довольно тонких нитей, расположенных по периферии ядра.

Метафаза II. В каждой клетке диады заканчивается формирование веретена. Хромосомы располагаются по экватору. К центромерам хромосом прикрепляются тянущие нити веретена.

Анафаза II. Центромеры делятся, и хроматиды расходятся к противоположным полюсам клетки.

Телофаза II. Сестринские хромосомы концентрируются на полюсах клеток и деспирализуются. Формируются ядра и образуются клеточные оболочки. Обычно все фазы II деления протекают одновременно в обеих

клетка днад. Заканчивается мейоз образованием из каждой материнской клетки четырех макро- или микроспор с гаплоидным набором хромосом.

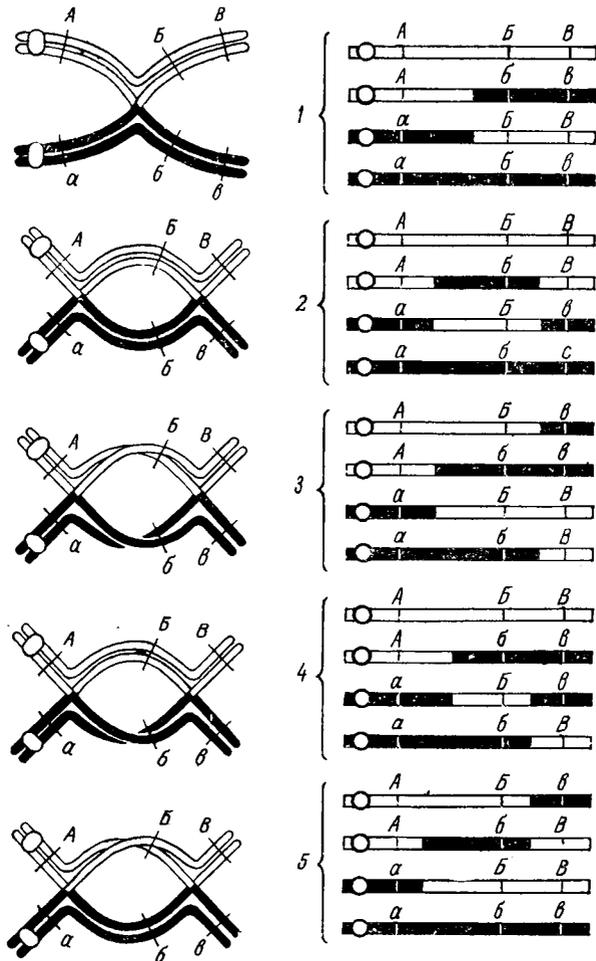


Рис. 3. Схематическое изображение различных типов кроссинговера: 1 — единичный кроссинговер; 2 — двойной кроссинговер между двумя хроматидами; 3 — двойной кроссинговер между четырьмя хроматидами; 4, 5 — двойной кроссинговер между тремя хроматидами; А, В, V — доминантные аллели; а, б, в — рецессивные аллели

Итак, в мейозе совершаются следующие процессы, имеющие важное значение в наследовании признаков:

1) уменьшение вдвое (редукция) числа хромосом; 2) расхождение в дочерние клетки парных (гомологичных) хромосом; 3) конъюгация гомологичных хромосом и как возможный результат — кроссинговер.

Изучать мейоз можно на продольных срезах пыльников ржи, кукурузы, кормовых бобов, лука или любого другого растения. Препараты могут быть временные, полупостоянные или постоянные. Пыльники фиксируют в то время, когда в них протекает микроспорогенез: у ржи — за 5...7 дней до колошения, у кукурузы — за 4...8 дней до выметывания метелки, у лука и других растений — в фазе начала бутонизации. В различных цветках одного соцветия мейоз протекает неодновременно. Так, если в пыльнике, взятом из цветка, расположенного в средней части колоса ржи, мейоз уже закончился и образовались тетрады микроспор, то в пыльниках цветков, расположенных в нижней и верхней частях колоса, мейоз только начинается и можно наблюдать клетки, находящиеся в профазе I и метафазе I. Для приготовления постоянных препаратов пыльники следует фиксировать по Навашину, окрашивать гематоксилином по Гейденгайну или генциановым фиолетовым по Ньютону.

Мейоз можно изучать также на давленных ацетокарминовых или ацетолакмоидных препаратах. Летом временные препараты готовят непосредственно сразу после сбора материала. Для приготовления временных препаратов в зимнее время используют специально зафиксированные в период микроспорогенеза соцветия ржи, кукурузы, лука и других растений. Соцветия фиксируют целиком в измененном фиксаторе Карнуа (3 части 96%-ного спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение 2...12 ч. После этого соцветия промывают в 70%-ном спирте, а затем хранят их в спирте такой же концентрации.

Удобно изучать мейоз на так называемых полупостоянных препаратах. Полупостоянные препараты готовят на сахарном сиропе. Они могут храниться довольно долго (до 1 года и более), и приготовление их не связано с большой затратой времени. Сахарозу (40 г) растворяют в 60 мл воды и кипятят до тех пор, пока объем раствора не уменьшится на $\frac{1}{4}$. После охлаждения сиропа во избежание кристаллизации добавляют в него 2...3 капли иммерсионного масла и тщательно перемешивают. Затем в сироп кладут кристаллик фенола. Такой сироп может храниться до 1 мес,

Выполнение задания. 1. Из цветков соцветий, срезаемых с растений в поле или хранящихся в 70%-ном спирте после фиксации в измененном фиксаторе Карнуа, пинцетом извлечь 2...3 пыльника.

2. Пыльники поместить на предметное стекло, раздавить стеклянной палочкой, тщательно распределить по стеклу содержимое пыльника, стенки пыльника удалить со стекла.

3. На полученный мазок нанести каплю ацетокармина или ацетолакмоида и накрыть покровным стеклом.

4. Для лучшего окрашивания препарат подогреть на спиртовке.

5. Для приготовления полупостоянных препаратов из цветка, зафиксированного в измененном фиксаторе Карнуа (3:1), извлекают пыльники и помещают в бюкс или пробирку с ацетокармином на 12...24 ч. Окрашенный пыльник переносят на предметное стекло, раздавливают стеклянной палочкой и удаляют остатки стенок пыльника. На предметном стекле получается мазок окрашенных микроспороцитов. На мазок наносят 1...2 капли 45%-ной уксусной кислоты, через 1...2 мин ее удаляют фильтровальной бумагой, а на мазок наносят каплю сахарного сиропа, накрывают покровным стеклом и нажатием кончика спички на покровное стекло удаляют излишек сиропа.

Препарат просматривают под микроскопом, определяют фазу мейоза и на свободном конце предметного стекла с правой стороны делают тушью соответствующую надпись. Покровное стекло окантовывают бесцветным маникюрным лаком. Этим же лаком покрывают и надпись.

6. Препарат внимательно изучают под микроскопом и зарисовывают все фазы мейоза. Особое внимание следует обратить на стадии профазы I.

МОРФОЛОГИЯ ХРОМОСОМ

Подсчет числа хромосом на резаных препаратах

Задание. Зарисовать хромосомы 5...10 метафазных пластинок и подсчитать на рисунках число хромосом.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты поперечных срезов кончиков корешков изучаемого растения. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка. 4. Иммерсионное масло. 5. Карандаш.

Пояснения к заданию. Соматические клетки каждого вида растений содержат определенное число хромосом. Так, в соматических клетках ржи содержится 14 хромосом, гречихи — 16, кормовых бобов — 12, мягкой пшеницы — 42 и т. д.

Число хромосом постоянно для каждого вида растений, но это постоянство относительное. Некоторые дифференцированные клетки одного и того же растения (например, тапетума) имеют различное число хромосом. Кроме того, у некоторых видов растений (рожь, кукуруза и др.) в соматических клетках содержатся так называемые добавочные хромосомы. Число их может колебаться в довольно значительных пределах. Так, у кукурузы число добавочных хромосом колеблется от 1 до 10.

Подсчет числа хромосом позволяет определить ploidy (гаплоидное, диплоидное, триплоидное или тетраплоидное растение), что очень важно при получении полиплоидных форм, например, триплоидных семян у арбуза, сахарной свеклы и других культур. Кроме того, подсчет числа хромосом позволяет обнаружить полисомию, а также установить кариотип (полный набор хромосом) у отдаленных гибридов.

Выполнение задания. У важнейших культурных растений в клетках содержится сравнительно небольшое число хромосом (табл. 2), поэтому подсчет их не представляет больших трудностей. Обычно число хромосом подсчитывают на постоянных препаратах поперечных срезов корешков изучаемого растения. Перед фиксацией кофешки должны быть либо подвергнуты действию пониженной температуры, либо обработаны водным раствором колхицина или 8-оксихинолина. Под действием этих веществ хромосомы несколько укорачиваются и рассредоточиваются в цитоплазме, что значительно облегчает их подсчет. Фиксировать материал лучше всего по Навашину или по Карнуа. Окрашивать срезы можно гематоксилином по Гейденгайну, генциановым фиолетовым по Ньютону, реактивом Шиффа по Фельгену и др.

Постоянные препараты с поперечными срезами корешков соответствующего растения помещают на предметный столик микроскопа, тщательно, ряд за рядом, просматривают срезы при объективе $\times 9$ и окуляре $\times 15$ и отыскивают метафазные пластинки с наиболее удоб-

ным для подсчета расположением хромосом. Хромосомы должны лежать свободно, не налегая одна на другую. Лучшие пластинки отмечают, делая соответствующую запись в тетради и на препарате (например, ряд 2, 5-я сверху). Если микроскоп имеет столик-препаратопроводитель, то можно записать показания горизонтальной и вертикальной шкал. Отмечают 5...10 таких пластинок на нескольких препаратах изучаемого растения.

Подсчет числа хромосом проводят в клетках, не поврежденных ножом при резке на микротоме. С этой целью отмеченные клетки перед подсчетом проверяют при иммерсионном объективе $\times 90$ путем различной фокусировки объекта. Вращая микровинт, устанавливают объект таким образом, чтобы был виден верхний слой цитоплазмы, затем размытые контуры хромосом, а потом уже более четкие. При дальнейшем движении микровинта хромосомы опять теряют четкость и снова виден лишь слой цитоплазмы. Если пластинка разрезана микротомным ножом, то хромосомы бывают видны в верхнем или нижнем слое.

Число хромосом подсчитывают при максимально возможном увеличении — лучше всего с иммерсионным объективом $\times 90$ и окуляром $\times 10$. Чтобы подсчет числа был точным, их обязательно следует тщательно зарисовать. Лучше всего использовать рисовальный аппарат РА-6, РА-4 или др. Рисовальный аппарат отбрасывает изображение метафазной пластинки на бумагу. Слегка вращая микровинт, добиваются четкого изображения хромосомы, обводят ее контур остро отточенным карандашом и ставят порядковый номер. После зарисовки одной хромосомы начинают рисовать следующую и таким образом зарисовывают все хромосомы метафазной пластинки. Последняя порядковая цифра будет соответствовать числу хромосом исследуемого вида.

После того как контуры всех хромосом данной метафазной пластинки зарисованы, необходимо еще раз сверить рисунок с препаратом. Убедившись в точности рисунка и в том, что ни одна из хромосом не пропущена при зарисовке, приступают к их подсчету на рисунке. Для установления точного числа хромосом у растения данного вида необходимо их подсчитывать на нескольких (5...10) метафазных пластинках.

Т а б л и ц а 2. Число хромосом у основных видов культурных растений

Вид	Число хромосом в клетках	
	половых (n)	соматических (2n)
1	2	3
<i>Полевые культуры</i>		
Пшеница однозернянка — <i>Triticum monococcum</i> L.	7	14
Пшеница твердая — <i>Triticum durum</i> Desf.	14	28
Пшеница мягкая — <i>Triticum aestivum</i> L.	21	42
Рожь — <i>Secale cereale</i> L.	7	14
Овес посевной — <i>Avena sativa</i> L.	21	42
Ячмень — <i>Hordeum sativum</i> (H. vulgare, H. distichum L.) Less.	7	14
Кукуруза — <i>Zea mays</i> L.	10	20
Просо обыкновенное — <i>Panicum miliaceum</i> L.	18	36
Рис посевной — <i>Oryza sativa</i> L.	12	24
Гречиха обыкновенная — <i>Fagopyrum sagittatum</i> Gilib.	8	16
Горох посевной — <i>Pisum sativum</i> L.	7	14
Бобы кормовые — <i>Faba vulgaris</i> Moench.	6	12
Фасоль обыкновенная — <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	11	22
Нут — <i>Cicer arietinum</i> L.	8	16
Чечевица — <i>Zens esculenta</i> Moench.	7	14
Вика посевная — <i>Vicia sativa</i> L.	6	12
Вика мохнатая — <i>Vicia villosa</i> Roth.	7	14
Подсолнечник — <i>Helianthus annuus</i> L.	17	34
Соя — <i>Glycine hispida</i> Maxim.	19	38
Арахис — <i>Arachis hypogea</i> L.	20	40
Кунжут — <i>Sesamum indicum</i> L.	13	26
Горчица белая — <i>Sinapis alba</i> L.	12	24
Лен-долгунец — <i>Linum usitatissimum</i> L.	16	32
Конопля — <i>Cannabis sativa</i> L.	10	20
Хлопчатник травянистый — гуза — <i>Gossypium herbaceum</i> L.	13	26
Хлопчатник обыкновенный — <i>Gossypium hirsutum</i> L.	26	52
Хлопчатник перувианский (египетский) — <i>Gossypium barbadense</i> L.	26	52
Сахарная свекла — <i>Beta vulgaris</i> L.	9	18
Картофель культурный — <i>Solanum tuberosum</i> L.	24	48
Табак — <i>Nicotiana tabacum</i> L.	24	48
Земляная груша (топинамбур) — <i>Helianthus tuberosus</i> L.	51	102
Клевер красный — <i>Trifolium pratense</i> L.	7	14

Продолжение табл. 2

Вид	Число хромосом в клетках	
	половых (<i>n</i>)	сомати- ческих (<i>2n</i>)
1	2	3
Клевер ползучий — <i>Trifolium repens</i> L.	16	32
Люцерна посевная — <i>Medicago sativa</i> L.	16	32
Люпин желтый — <i>Lupinus luteus</i> L.	26	52
Люпин узколистый — <i>Lupinus angustifolius</i> L.	20	40
Тимофеевка луговая — <i>Phleum pratense</i> L.	21	42
Овсяница луговая — <i>Festuca pratensis</i> Huds.	7	14
<i>Овощные культуры</i>		
Томат — <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	12	24
Перец красный — <i>Capsicum annuum</i> L.	12	24
Огурец — <i>Cucumis sativus</i> L.	7	14
Тыква гигантская — <i>Cucurbita maxima</i> Duch.	24	48
Арбуз столовый — <i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	11	22
Репка, турнепс — <i>Brassica campestris</i> L.	10	20
Капуста кочанная — <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	9	18
Редька культурная — <i>Raphanus sativus</i> L.	9	18
Свекла обыкновенная — <i>Beta vulgaris</i> L.	9	18
Лук репчатый — <i>Allium cepa</i> L.	8	16
<i>Плодовые культуры</i>		
Яблоня домашняя — <i>Malus domestica</i> Borkh.	17	34
Груша обыкновенная — <i>Pyrus communis</i> L.	17	34
Абрикос — <i>Armeniaca vulgaris</i> L.	8	16
Вишня обыкновенная — <i>Cerasus vulgaris</i> Mill.	16	32
Слива домашняя — <i>Prunus domestica</i> L.	24	48
Персик — <i>Persica vulgaris</i> Mill.	8	16
Земляника лесная — <i>Fragaria vesca</i> L.	7	14
Земляника садовая — <i>Fragaria grandiflora</i> Ehrh.	28	56
Клубника — <i>Fragaria moschata</i> Duch.	21	42
Малина обыкновенная — <i>Rubus idaeus</i> L.	7	14
Крыжовник — <i>Grossularia reclinata</i> Mill.	8	16
Смородина красная — <i>Ribes rubrum</i> L.	8	16
Смородина черная — <i>Ribes nigrum</i> L.	8	16

Подсчет числа хромосом на давленных препаратах из кончиков корня

Задание. 1. Приготовить временный препарат из корешков кормовых бобов, сахарной свеклы или другого растения. 2. Подсчитать хромосомы в клетках.

Материал и оборудование. 1. Проросшие семена кормовых бобов или другого растения. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат. 4. Ацетокармин или ацетолакмоид. 5. Лезвие безопасной бритвы. 6. Предметные стекла. 7. Покровные стекла. 8. Фильтровальная бумага, нарезанная полосками 2×5 см. 9. Спиртовка и спички. 10. Препаровальная игла.

Пояснения к заданию. Метод подсчета хромосом на временных давленных препаратах нашел довольно широкое применение в цитологии, генетике, селекции и семеноводстве; в частности, его применяют в семеноводстве сахарной свеклы для определения плоидности растений при производстве гибридных триплоидных семян. Для приготовления временных препаратов используют ацетокармин, ацетолакмоид, ацетоорсеин, реактив Шиффа. Удобнее всего подсчитать хромосомы в клетках молодых корешков. Корешки должны быть длиной не более 1...2 см с хорошо выраженной меристемой. Можно готовить временные препараты и из молодых листочков 3...7 мм длины. Корешки или листочки можно предварительно зафиксировать в измененном фиксаторе Карнуа (3:1) и хранить в 70%-ном спирте.

Приготовление красителей для временных препаратов. Для окраски временных препаратов широко используют кармин, лакмоид и орсеин, которые растворяют в уксусной кислоте.

Приготовление ацетокармина. В стеклянную колбу объемом 200...250 мл наливают 55 мл дистиллированной воды, приливают 45 мл ледяной уксусной кислоты и насыпают 2...5 г кармина. Затем колбу со стеклянной воронкой ставят на водяную баню или на малый огонь. Если кипячение ведут на электрической плитке, го под колбу подкладывают асбестовую пластинку. Раствор кипятят в течение 30...60 мин, охлаждают и фильтруют. Профильтрованный раствор помещают в бутылочку с притертой пробкой, где он может храниться неограниченно долгое время.

Приготовление ацетолакмоида. В стеклянную колбу объемом 200...250 мл наливают 40 мл дистиллированной воды, 60 мл ледяной уксусной кислоты, вставляют стек-

лянную воронку и ставят колбу на водяную баню. После закипания раствора в него добавляют 2 г лакмоида и кипятят в течение 5 мин. Горячий раствор фильтруют. Если после фильтрования в ацетолакмоиде будет осадок, то раствор следует профильтровать снова. После этого ацетолакмоид может храниться довольно долго.

Приготовление ацетоорсеина по Ла-Куру. В стеклянную колбу объемом 150...200 мл наливают 45 мл ледяной уксусной кислоты, вставляют стеклянную воронку и ставят на водяную баню или на электрическую плитку с асбестовой пластинкой. В горячую уксусную кислоту добавляют 1 г орсеина, растворяют его и раствор охлаждают, после чего к нему добавляют 55 мл дистиллированной воды, хорошо взбалтывают и фильтруют. В. А. Кунак и Б. А. Левенко рекомендуют при приготовлении рабочего раствора к 100 мл ацетоорсеина добавлять 25 мл дистиллированной воды. В краситель фиксированный материал (корешки и др.) можно помещать на 2...3 сут или выдерживать 3...4 мес. Для работы небольшое количество ацетокармина (ацетолакмоида, ацетоорсеина) вливают в пенициллиновый флакон, закрытый корковой пробкой. Сквозь пробку продевают пипетку с резиновой трубкой. Этой пипеткой наносят на предметное стекло необходимое количество ацетокармина. Для научных целей чаще всего используют методику приготовления временных препаратов, разработанную в Кембриджском институте селекции растений (Великобритания) для выделения анеуплоидных растений пшеницы (см. с. 117).

Выполнение задания. 1. На предметное стекло нанести каплю ацетолакмоида.

2. При работе с нефиксированным (свежим) материалом сделать бритвой возможно более тонкий продольный срез кончика корешка; первый срез с эпидермисом отбросить.

3. Перенести полученный срез на предметное стекло в каплю ацетолакмоида, накрыть покровным стеклом и осторожно несколько раз подогреть на спиртовке. По мере испарения ацетолакмоида его следует добавлять, не снимая покровного стекла.

4. Когда срезы будут достаточно мацерированы (при надавливании препаровальной иглой на покровное стекло срез начинает «расплываться»), нагревание прекратить. Не трогая покровное стекло, фильтровальной бумагой убрать лишний лакмоид.

5. Кончиком спички или деревянной палочки легкими ударами по покровному стеклу острожно раздавить препарат и распределить клетки равномерно в один слой. Покровное стекло не должно смещаться.

6. Приготовленный препарат поместить на предметный столик микроскопа и найти хорошие метафазные пластинки.

7. Пользуясь рисовальным аппаратом или окулярной сеткой при объективе $\times 90$ и окуляре $\times 10$, тщательно зарисовать каждую хромосому на подобранной метафазной пластинке.

8. После того как контуры каждой хромосомы будут нанесены на бумагу, рисунок необходимо сверить с препаратом. Убедившись в точности рисунка, подсчитать хромосомы. Для установления точного числа хромосом необходимо подсчитать их на 5...10 метафазных пластинках каждого препарата.

Если препарат готовят из фиксированного материала, хранящегося в 70%-ном спирте, корешки непосредственно из спирта переносят на предметное стекло в каплю красителя, а затем подогревают и раздавливают. Листочки предварительно мацерируют в смеси крепкой соляной кислоты и метилового спирта (1:1) в течение 5 мин и промывают в воде в течение 5 мин, затем окрашивают ацетокармином или ацетолакмоидом.

Часто для подсчета числа хромосом делают микрофотографии 10...15 метафазных пластинок изучаемого вида и на них производят подсчет числа хромосом.

Изучение и идентификация хромосом у растений

Задание. 1. Ознакомиться с особенностями морфологической классификации хромосом по Г. А. Левитскому. 2. Ознакомиться с методикой приготовления препаратов для изучения кариотипа. 3. На временном или постоянном препарате найти метафазные пластинки, на которых четко проявляется строение каждой хромосомы. 4. Получить микрофотографии метафазных пластинок и определить основные параметры каждой хромосомы данного вида. 5. Составить идиограмму изучаемого вида растений.

Материал и оборудование. 1. Временный или постоянный препарат корешка лука, кормовых бобов, ячменя, ржи или другого растения. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка. 4. Окуляр-микрометр. 5. Карандаш. 6. Иммерсионное масло. 7. Микрофотография. 8. Ножницы, клей.

Пояснения к заданию. Хромосомы каждого вида растений или животных имеют свои морфологические

особенности и определенные размеры. Строение хромосом лучше всего выявляется в метафазе митоза, когда они укорочены и расположены в экваториальной плоскости. Г. А. Левитским в 1931 г. разработана методика описания морфологии хромосом. Он установил единый принцип описания строения хромосом, как бы они не были различны по форме на первый взгляд. Каждая метафазная хромосома состоит из двух хроматид, имеет различную длину и обязательно имеет центромеру (кинетохор), к которой прикрепляется нить веретена, способствующая расхождению хроматид к полюсам клетки.

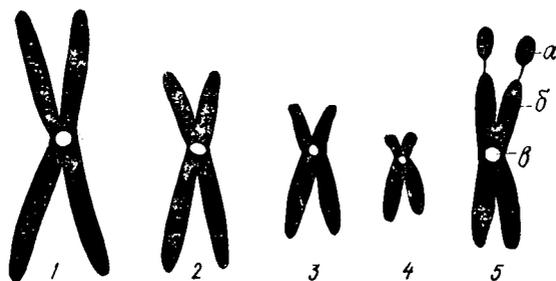


Рис. 4. Форма метафазных хромосом:

1 — метацентрическая; 2 — субметацентрическая; 3 — акроцентрическая; 4 — телоцентрическая; 5 — метацентрическая спутничная (SAT-хромосома); а — спутник; б — плечо; с — центромера

Местоположение центромеры специфично для соответствующей хромосомы данного вида. Центромера делит хромосому на два плеча и тем самым определяет ее форму (рис. 4). Если центромера расположена строго посередине, то хромосома называется метацентрической. Если центромера располагается ближе к тому или другому концу, то хромосомы называются акроцентрическими. Разница между длиной плеч может колебаться в довольно широких пределах. Если меньшее плечо представлено ничтожно малым участком, хромосому называют телоцентрической. Участок плеча хромосомы, расположенный ближе к центромере, называют проксимальным, а отдаленный от центромеры — дистальным. Отношение длины большего плеча к длине меньшего называют плечевым индексом. Метацентрические хромосомы имеют плечевой индекс 1...1,9, субметацентрические — 2...4,9, акроцентрические — 5 и более. Хромосомы, у которых это отношение более 8, а форма короткого плеча напоминает

шаровидное тело, называются телоцентрическими (головчатыми).

Кроме положения центромеры, форму хромосомы определяет так называемая вторичная перетяжка — наличие на концах хромосом сегментов, отделенных вторичной акинетической перетяжкой. Сегмент хромосомы С. Г. Навашин назвал спутником. Спутники сильно варьируют по форме и величине. Различают микроспутники — мелкие, сферические, имеющие диаметр меньше диаметра хромосомы; макроспутники — крупные, сферические, диаметр их превышает $\frac{1}{2}$ диаметра хромосомы; линейные — длинные сегменты хромосом, соединенные с ней далеко отстоящей от конца хромосомы перетяжкой; тандемные — два спутника на одном плече хромосомы с двумя вторичными перетяжками. При идентификации хромосом особо выделяют спутничные хромосомы и детально описывают морфологию спутника.

В диплоидном наборе хромосом соматических клеток каждая хромосома имеет подобную себе по размеру и форме. Такие парные хромосомы называются гомологичными. Графическое изображение хромосом, присущих одной соматической клетке данного вида, со всеми их структурными характеристиками (положение центромеры и спутников, расположение хромомер и гетерохроматина), по предложению С. Г. Навашина (1922) принято называть идиограммой (кариограмма, кариотип; рис. 5).

При использовании специальных методов окраски (по Гимза и др.) различают эухроматические и гетерохроматические зоны в каждой хромосоме. Гетерохроматические зоны обычно окрашиваются более ярко. Предполагают, что они включают блоки идентичных генов, обладающих сходным действием.

Эухроматиновые зоны бывают значительно слабее окрашены. Считают, что в них находятся гены, определяющие развитие свойств и признаков организма.

В настоящее время препараты для изучения и идентификации хромосом готовят различными методами: по Гимза с окраской азур-эозином по Романовскому, по Фельгену, по Туркову с окраской железным ацетокармином и др.

Метод В. Д. Туркова (1972). Этот метод можно использовать для изучения хромосом у всех культурных растений. Он прост и доступен практически любой лаборатории, дает стабильные результаты и представляет

несомненный интерес для генетико-селекционных исследований (табл. 3).

Семена проращивают в чашках Петри при температуре 24...26° С до образования корешков 5...40 мм в



Рис. 5. Кариотип ржи ($2n = 14$):

1 — метафазная пластинка; 2 — идиограмма; I—VII — пары гомологичных хромосом

зависимости от вида растения. Предобработку проросших семян или корешков проводят при температуре 4° С в насыщенном растворе монобромнафталина в течение 5 ч, фиксируют в спиртоуксусной смеси (1:1) в течение 24...48 ч, мацерируют в 3 н. HCl 10 мин при температуре 20...22° С, промывают в дистиллированной воде 1...2 мин, затем в 45%-ной уксусной кислоте 1 ч. Окрашивают на водяной бане 0,02%-ным железным ацетокармином при температуре 100° С в течение 5...6 мин, дифферен-

цируют в 45%-ной уксусной кислоте десять минут (см. табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Приготовление временных давленных препаратов по методу В. Д. Туркова

Процедура	Реактив	Температура, °С	Продолжительность
Предобработка	Монобромнафталин, насыщенный раствор	4	4 ч
Фиксация	Спирт 96%-ный Уксусная кислота 96%-ная (1 : 1)	20 ... 22	24 ... 48 ч
Мацерация	3н. HCl	20 ... 22	10 мин
	Уксусная кислота 45%-ная	20 ... 22	1 ч
Промывка	Вода	15 ... 17	10 мин
Окрашивание	0,1 ... 2%-ный железный ацетокармин	100	15 мин
Дифференциация и промывка	Уксусная кислота 45%-ная	20 ... 22	15 мин
Приготовление препарата	Хлоралгидрат насыщенный раствор	20 ... 22	Корешок переносят на предметное стекло в каплю реактива

Примечание. Предобработке подвергают проросшие семена с корешками длиной 5...40 мм в пенициллиновых флаконах, пробирках или бюксах. Затем отрезают кончики корешков и в процессе фиксации, мацерации, промывки и окрашивания либо переносят корешки из одного реактива в другой, либо они находятся в одном флаконе, в котором последовательно меняют реактивы.

Для приготовления препарата кончик корня с ярко окрашенной зоной деления переносят на предметное стекло в каплю насыщенного раствора хлоралгидрата, разрезают на несколько частей, накрывают покровным стеклом и осторожно раздавливают, постукивая по покровному стеклу кончиком спички или препаровальной иглы. Для более равномерного распределения хромосом в одной плоскости на покровное стекло ставят гирьку 5...20 г на 24 ч.

Перевод временных препаратов в постоянные. Для этой цели лучше всего использовать жидкий азот или сухой лед. На плоскую поверхность блока сухого льда ставят препарат и замораживают в течение 20...30 с. Затем осторожно с помощью лезвия бритвы снимают покровное стекло, препарат проводят через 100%-ный этиловый

спирт (2 смены по 5 мин), через ксилол (2 смены по 3 мин) и заключают в канадский бальзам.

Микрофотографирование. Для исследования подбирают метафазные пластинки, в которых все хромосомы располагаются в одной плоскости и находятся примерно в одинаковом состоянии спирализации.

Микрофотографию делают обычным способом на пленку «микрат 300» на микроскопе МБИ-3 или другом при объективе $\times 40$ или $\times 90$ и окуляре $\times 10$ или $\times 12,5$

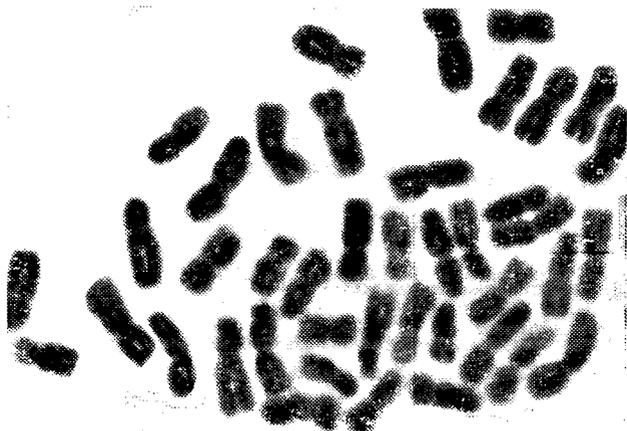


Рис. 6. Кариотип мягкой пшеницы ($2n = 42$)

с фазово-контрастным устройством при помощи микрофотонасадки МФИ-12.

Для получения четкого изображения каждой хромосомы В. Д. Турков рекомендует многократное перефотографирование. При печатании с негатива микрофотографии дают небольшое увеличение, добиваясь четкого изображения каждой хромосомы. Если увеличение полученной микрофотографии недостаточно, с нее делают снимок и получают новую фотографию с большим увеличением без снижения четкости изображения. В случае необходимости изображение метафазной пластинки перефотографируют еще несколько раз.

Такой метод дает возможность получить четкое изображение каждой хромосомы при разном увеличении

(рис. 6), что очень важно при изучении строения хромосом у растений.

При подборе метафазных пластинок для идентификации хромосом того или иного вида следует особое внимание обратить на идентичное состояние спирализации хромосом. С этой целью на микрофотографиях метафазных пластинок определяют индекс спирализации (I^s):

$$I^s = \frac{\text{Суммарная длина двух коротких хромосом}}{\text{Суммарная длина двух длинных хромосом}}$$

Для исследования следует брать метафазные пластинки, имеющие одинаковый индекс спирализации. Окончательные выводы о размерах и строении хромосом делают на основании анализа не менее чем 40 метафазных пластинок на 10 препаратах после статистической обработки полученных данных.

При идентификации хромосом пользуются рядом показателей:

1. Абсолютная длина каждой хромосомы L^a (мкм).
2. Относительная длина хромосомы L^r (%):

$$L^r = \frac{\text{Длина данной хромосомы}}{\text{Длина всех хромосом}} 100.$$

3. Плечевой индекс I^b :

$$I^b = \frac{\text{Длина длинного плеча}}{\text{Длина короткого плеча}}$$

4. Центромерный индекс I^c (%):

$$I^c = \frac{\text{Длина короткого плеча хромосомы}}{\text{Длина всей хромосомы}} 100.$$

5. На препаратах, приготовленных по Гимза, определяют также отношение гетерохроматиновой части хромосомы ко всей ее длине I^a (%):

$$I^a = \frac{\text{Длина гетерохроматина}}{\text{Длина всей хромосомы}} 100.$$

Выполнение задания. 1. Приготовить временный препарат из кончика корешка изучаемого растения.

2. Под микроскопом подобрать соответствующие метафазные пластинки и тщательно изучить морфологию хромосом, пользуясь масляной или водной иммерсией.

3. Получить микрофотографии отобранных метафазных пластинок с максимально возможным увеличением.

Таблица 4. Основные параметры хромосом ржи

Группа сходных хромосом	№ пары гомологичных хромосом	№ хромосомы	Длина, мкм			Плечевой индекс	Центромерный индекс, %	Примечания	
			абсолютная	относительная, %	длинного плеча				короткого плеча
A	I	1	4,0	7,6	2,1	1,9	47	Все хромосомы имеют плечевой индекс 1,1...1,7, т. е. являются метацентрическими	
		2	4,0	7,6	2,1	1,9	47		
		3	4,0	7,6	2,2	1,8	45		
		4	4,0	7,6	2,2	1,8	45		
B	III	5	3,8	7,2	2,3	1,5	40		
		6	3,8	7,2	2,3	1,5	40		
		7	3,7	7,1	2,2	1,5	43		
		8	3,7	7,1	2,2	1,5	43		
C	V	9	3,7	7,1	2,3	1,4	38		
		10	3,7	7,1	2,3	1,4	38		
		11	3,8	7,2	2,1	1,7	45		
		12	3,8	7,2	2,1	1,7	45		
D	VII	13	3,3	6,2	1,9	1,4	42		Хромосомы имеют спутник
		14	3,3	6,2	1,9	1,4	42		
			$\Sigma = 52,6$	$\Sigma = 100\%$					

Зная истинную длину измеренной на препарате хромосомы и ее длину на микрофотографии, определить коэффициент увеличения. Например, истинная длина III хромосомы ржи 3,8 мкм, размер ее на микрофотографии 45,6 мм. Следовательно, коэффициент увеличения в нашем примере (см. рис. 4) равняется 12 000 ($45\ 600:3,8 = 12\ 000$).

4. Последовательно вырезать микрофотографию каждой хромосомы, подобрать гомологичные хромосомы и, пользуясь кронциркулем или миллиметровой бумагой, определить общую длину хромосомы и каждого ее плеча. Данные занести в табл. 4.

5. Вычислить относительную длину каждой хромосомы в процентах, определить плечевой индекс и центромерный индекс.

6. Из хромосом данного кариотипа составить идиограмму. Для этого все хромосомы наклеить в тетрадь, располагая их по сходным группам (см. рис. 5). Центромеры должны быть расположены точно по одной прямой. Короткое плечо располагают вверх, длинное — вниз.

7. В заключении необходимо дать словесную характеристику каждой паре гомологичных хромосом.

Метод цитохимического выявления ДНК в клетках с помощью реакции Фельгена — Шиффа

Задание 1. Ознакомиться с техникой приготовления реактива Шиффа и сернистой воды. 2. Приготовить постоянные препараты, окрашенные на ДНК по Фельгену—Шиффу. 3. Рассмотреть и зарисовать клетки, окрашенные по Фельгену. Особое внимание следует обратить на интенсивность окраски ядра и хромосом, указывающую на локализацию ДНК.

Материал и оборудование. 1. Микротомные срезы корешка или точки роста стебля изучаемого растения, наклеенные на предметные стекла. 2. Микроскоп. 3. Термостат. 4. Стеклообразные цилиндры для окраски препаратов. 5. Мерные цилиндры. 6. Реактив Шиффа. 7. 1%-ный раствор светлого зеленого. 8. Бисульфат натрия. 9. Концентрированная соляная кислота (плотность 1,19). 10. 96%-ный спирт. 11. 100%-ный спирт. 12. Карбол-ксилол. 13. Ксилол. 14. Канадский бальзам. 15. Дистиллированная вода. 16. Цветные карандаши.

Пояснения к заданию. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — сложный биологический полимер. Она состоит из длинной цепочки нуклеотидов. В состав каждого нуклеотида входят остаток фосфорной кислоты (фосфат), пентозный сахар дезоксирибоза и азотистое

основание. В качестве азотистого основания, входящего в состав нуклеотида молекулы ДНК, может быть любое из четырех гетероциклических азотсодержащих соединений — аденин, гуанин, тимин и цитозин. Аденин и гуанин — производные пурина, а тимин и цитозин — производные пиримидина. Дж. Уотсон и Ф. Крик в 1953 г. установили пространственную структуру молекулы ДНК. Она состоит из двух цепей полинуклеотидов, объединенных в виде двойной спирали.

Хромосомы каждого вида растений и животных содержат специфическую ДНК. Эта видовая специфичность определяется числом нуклеотидов в молекуле ДНК, порядком их чередования, определенной последовательностью сочетаний пуриновых и пиримидиновых оснований, а также отношением $\frac{\text{Гуанин} + \text{цитозин}}{\text{Аденин} + \text{тимин}}$. ДНК способна реплицироваться, т. е. воспроизводить подобные себе молекулы в период S-интерфазы митотического цикла. Дезоксирибонуклеиновая кислота через информационную рибонуклеиновую кислоту (*и*-РНК) управляет синтезом белка в клетке.

Реакция Фельгена на ДНК основана на взаимодействии реактива Шиффа с альдегидными группами сахара дезоксирибозы. В молекуле ДНК альдегидные группы связаны, поэтому их предварительно освобождают гидролизом в слабой соляной кислоте при температуре 60° С. В результате гидролиза от молекул ДНК отщепляются пуриновые основания — гуанин и аденин и освобождается остаток молекулы ДНК со свободными альдегидными группами.

Реактив Шиффа (фуксин-сернистая кислота) — неустойчивое соединение и легко соединяется со свободными альдегидными группами, в результате чего получается окрашенное вещество. Дезоксирибонуклеиновая кислота содержится преимущественно в хромосомах, поэтому реактив Шиффа окрашивает только ядра. Характер окраски ядер в клетках неодинаков. Так, ядра зоны деления обычно приобретают яркий красновато-фиолетовый цвет, а ядра из зоны растяжения и чехлика корешка окрашиваются более или менее однородно и менее интенсивно. При этом ядрышко не окрашивается. В клетках, находящихся в различных фазах митоза, окрашиваются только хромосомы. Красновато-фиолетовый цвет хромосом свидетельствует о локализации в них

молекул ДНК, а по интенсивности окраски можно судить о состоянии комплекса ДНП.

Выполнение задания. Реактив Шиффа (фуксин-сернистая кислота) готовят так: берут 1 г чистого основного фуксина (парафуксина), тщательно растирают в фарфоровой ступке, растворяют в 200 мл кипящей воды и кипятят 5 мин. После кипячения раствор охлаждают до 50° С и прибавляют 20 мл 1 н. соляной кислоты. Для приготовления 1 н. соляной кислоты 8,25 мл концентрированной химически чистой соляной кислоты (плотность 1,19) доливают до 100 мл дистиллированной воды. Раствор фуксина и соляной кислоты охлаждают до 25° С и прибавляют 1 г сухого мета-бисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Полученный реактив переливают в склянку с притертой пробкой, плотно закрывают и хранят в темноте в холодильнике при температуре 0...4° С. Через несколько часов жидкость становится бесцветной или светло-желтой. Через 24 ч она годна к употреблению. Перед окраской препаратов реактив Шиффа наливают в цилиндр, в который и помещают препарат на 1...2 ч.

Каждый раз перед окраской препаратов готовят свежий раствор сернистой воды и разливают ее в 3 цилиндра. В эти цилиндры последовательно помещают препараты после реактива Шиффа на 2...5 мин в каждый. Для приготовления сернистой воды используют мета-бисульфит натрия и однонормальную соляную кислоту. К 200 мл дистиллированной воды прибавляют 10 мл 10%-ного раствора мета-бисульфита натрия и 10 мл 1 н. соляной кислоты.

Для обнаружения ДНК используют постоянные препараты продольных срезов меристемы корешков лука, кормовых бобов, сахарной свеклы, ржи и других растений. Фиксировать материал лучше всего в фиксаторе Карнуа или Навашина. Продолжительность фиксации должна быть как можно более краткой. Затем материал следует обезводить, пропитать парафином и нарезать на микро-томе, тонкие микротомные срезы наклеить на предметные стекла. Порядок окрашивания этих срезов на выявление и локализацию ДНК дан в табл. 5.

Реактив Шиффа совершенно не окрашивает цитоплазму. Поэтому для окраски цитоплазмы и клеточных оболочек используют дополнительную окраску 1%-ным водным или спиртовым раствором светлого зеленого (лихтгрюн). При этом цитоплазма окрашивается в светло-зеленый

Т а б л и ц а 5. Порядок выполнения задания по выявлению ДНК в клетках с помощью реактива Шиффа

№ п.п.	Реактив	Процедура с препаратом*	Продолжительность	Примечание
1	Ксилол парафиновый I	Поместить в цилиндр » » Обмыть из капельницы Поместить в цилиндр » » Обмыть из капельницы Поместить в цилиндр Обмыть из капельницы Поместить в цилиндр	10...15 мин	Цилиндр поместить в термостат с температурой 60 °С для гидролиза
2	» II		10...15 мин	
3	Спирт + ксилол (1 часть 100%-ного спирта + 1 часть ксилола)		3...5 мин	
4	96%-ный спирт		30 с	
5	»		5...10 мин	
6	45%-ный		3...5 мин	
7	Дистиллированная вода		3...5 мин	
8	I н. соляная кислота		30 с	
9	»		8 мин **	
10	»	Обмыть из капельницы Поместить в цилиндр » » » » »	1...5 мин	
11	Дистиллированная вода		30 с	
12	Реактив Шиффа		1...3 ч	
13	Сернистая вода I		2 мин	
14	» II		2...5 мин	
15	» III		2...5 мин	
16	Проточная		15 мин	
17	Дистиллированная вода	1...2 мин		

№ п.п.	Реактив	Процедура с препаратом *	Продолжительность	Примечание
18	Светлый зеленый (лихтгрюн)	Поместить в цилиндр	1...2 мин	
19	Проточная вода	»	5 мин	Промыть под тонкой струей воды
20	90%-ный спирт	Обмыть из капельницы	3 с	
21	»	Поместить в цилиндр	1...2 мин	
22	100%-ный »	Обмыть из капельницы	30 с	
23	»	Поместить в цилиндр	1...5 мин	
24	Спирт+ксилол (1 часть 100%-ного спирта +1 часть ксилола)	»	1 мин	
25	Ксилол бальзамовый I	»	5...10 мин	
26	»	»	5 мин	
27	Бальзам	ЗаклЮчить объект в бальзам	1 мин	
28	Препарат рассмотреть под микроскопом и с помощью цветных карандашей зарисовать клетку, указывая на рисунке локализацию и относительное количество ДНК.			

* Препараты представляют собой микротомные срезы, наклеенные на предметные стекла и приготовленные из предварительно зафиксированного материала, обезвоженного и пропитанного парафином.

** Продолжительность гидролиза от 4 до 15 мин в зависимости от фиксатора. Для фиксатора Карнуа оптимальная продолжительность гидролиза 8 мин, для измененного фиксатора Карнуа (без хлороформа) — 6 мин, для материала, фиксированного по Навашину, — 5...10 мин.

цвет. В качестве дополнительной окраски применяют также 1%-ный водный раствор оранже G. В этом случае цитоплазма приобретает желтовато-оранжевую окраску.

Выявление ДНК и РНК в клетках путем окраски препаратов метиловым зеленым с пиронином

Задание. 1. Ознакомиться с методикой приготовления метилового зеленого с пиронином. 2. Приготовить постоянные препараты, окрашенные метиловым зеленым с пиронином. 3. Рассмотреть полученные препараты под микроскопом и зарисовать с помощью цветных карандашей, на рисунке указать локализацию ДНК и РНК в клетке.

Материал и оборудование. 1. Микротомные продольные срезы корешков лука или другого растения, наклеенные на предметные стекла. 2. Микроскоп. 3. Цветные карандаши. 4. Мерные цилиндры. 5. Реактивы, необходимые для окраски и заключения постоянного препарата в канадский бальзам. 6. Раствор метилового зеленого с пиронином (раствор А). 7. Ацетатный буфер с рН 4,8 (раствор Б). 8. Ацетон. 9. Ксилол.

Пояснения к заданию. В синтезе белка большую роль играет рибонуклеиновая кислота (РНК). Строение молекулы РНК несколько отличается от ДНК: нуклеотиды, из которых состоят молекулы РНК, содержат вместо сахара дезоксирибозы сахар рибозу, вместо пиримидинового основания тимина — урацил. Кроме того, молекула РНК имеет значительно меньшую относительную массу и представляет собой одну цепочку нуклеотидов.

В клетках содержится 3 вида РНК: информационная, которую называют матричной, или РНК-посредник, и обозначают либо *и*-РНК, либо *т*-РНК; транспортная, которую иначе называют РНК-переносчик и обозначают *т*-РНК или *с*-РНК, и рибосомальная РНК, входящая в состав рибосом. РНК синтезируется в ядре на том или ином участке (на матрице) молекулы ДНК. При этом нуклеотиды молекулы РНК располагаются в соответствии с расположением комплементарных нуклеотидов в молекуле ДНК.

Синтезированная молекула *и*-РНК перемещается в цитоплазму к рибосоме. На рибосоме она участвует в синтезе специфической молекулы белка в соответствии с той информацией, которую она «считала» с участка молекулы ДНК. Аминокислоты, необходимые для построения белковой молекулы, доставляют к рибосоме *т*-РНК. От порядка расположения аминокислот в бел-

ковой молекуле зависит специфичность белка. Порядок расположения аминокислот определяется порядком расположения нуклеотидов в РНК. Таким образом, последовательность аминокислот в белковой молекуле опосредованно связана с последовательностью азотистых оснований в ДНК. Последовательность сочетания комплементарных пар азотистых оснований при определенном их чередовании в ДНК представляет собой запись наследственной информации каждого вида, называемую кодом наследственности.

Реакция, позволяющая выявить ДНК и РНК окраской метиловым зеленым с пиронином, обусловлена наличием в молекулах ДНК и РНК кислых фосфатных групп (HPO_4). Метиловый зеленый окрашивает молекулы ДНК в зеленый цвет, а пиронин — молекулы РНК в красный. Интенсивность окраски зависит от количества нуклеиновых кислот. При этом следует помнить, что пиронин не считается специфическим реактивом на РНК. Поэтому нужно пользоваться контрольными препаратами, которые перед окраской помещают в 0,1 н. водный раствор рибонуклеазы и ставят в термостат при температуре 37°C на 2...3 ч. За это время в клетках происходит гидролиз молекул РНК. Вместо рибонуклеазы можно использовать 5...10%-ную трихлоруксусную кислоту. Контрольные препараты красят обычным методом одновременно с исследуемыми препаратами. Если контрольные препараты окрашиваются пиронином в красный цвет слабо, то значит в них содержалась РНК, которая гидролизовалась под воздействием рибонуклеазы.

Готовят 2 раствора — раствор А (метиловый зеленый с пиронином) и раствор Б (ацетатный буфер).

Раствор А состоит из трех частей: 17,5 мл 5%-ного водного раствора пиронина, 10,0 мл 2%-ного водного раствора метилового зеленого (метилгрюн) и 250 мл воды. Каждый компонент готовят отдельно, а затем сливают в склянку с притертой пробкой и хранят в темном месте, лучше в холодильнике. Раствор А годен к употреблению в течение нескольких месяцев.

После приготовления 2%-ного водного раствора метилового зеленого его следует очистить от примеси метилового фиолетового экстрагированием хлороформом. Для этого к раствору метилового зеленого приливают равное количество хлороформа, тщательно взбалтывают и оставляют на 1...2 дня для отстоя. Затем осторожно

с помощью делительной воронки отделяют верхний слой раствора, содержащий метиловый зеленый, от нижнего слоя, содержащего примесь метилового фиолетового. Эту операцию повторяют 2...3 раза и более.

Таблица 6. Порядок выполнения задания по выявлению ДНК и РНК в клетках

№ п. п.	Реактив	Процедура с препаратом	Продолжительность процедуры
1	2	3	4
1	Ксилол парафиновый I	Поместить в цилиндр	10...15 мин
2	» » II	» »	10...15 мин
3	Спирт+ксилол (1 часть 100%-ного спирта+1 часть ксилола)	» »	3...5 мин
4	96%-ный спирт	Обмыть из капельницы	30 с
5	» »	Поместить в цилиндр	5...10 мин
6	45%-ный »	» »	3...5 мин
7	Дистиллированная вода	» »	3...5 мин
8	» »	Обмыть из капельницы	30 с
9	Буферный метиловый зеленый с пиронином	Поместить в цилиндр	20 мин
10	Дистиллированная вода I	Прополоскать в цилиндре*	30 с
11	» » II	То же	30 с
12	Ацетон	Обмыть из капельницы	30 с
13	Ацетон+ксилол I (9 частей ацетона+1 часть ксилола)	» »	30 с
14	Ацетон+ксилол II (5 частей ксилола+5 частей ацетона)	» »	30 с
15	Ацетон+ксилол III (1 часть ацетона+9 частей ксилола)	» »	30 с
16	Ксилол бальзамовый I	» »	30 с
17	» » II	» »	30 с
18	Канадский бальзам	ЗаклЮчить препарат в канадский бальзам	1 мин
19	Рассмотреть препарат под микроскопом и зарисовать, цветными карандашами указать локализацию ДНК и РНК в клетках		

* После дистиллированной воды препарат следует быстро обсушить фильтровальной бумагой. Предварительно материал должен быть зафиксирован, пропитан парафином. Парафиновые срезы, сделанные на микротоме, должны быть наклеены на предметные стекла и высушены.

Раствор Б-ацетатный буфер с рН 4,8 готовят из смеси двух растворов: 1) в мерную колбу наливают 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и доливают до 100 мл водой;

2) в мерную колбу насыпают 2,72 г уксуснокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$) и доливают до 100 мл дистиллированной водой. Затем соединяют оба раствора вместе в одной склянке: 77 мл первого раствора и 100 мл второго. Получается буфер с рН 4,8. Растворы А и Б смешивают в отношении 1:1 только перед окраской препаратов.

Метиловым зеленым с пиронином окрашивают преимущественно постоянные препараты, приготовленные из фиксированного материала. Для этого берут корешки лука или другого растения. Фиксировать их лучше всего по Карнуа, насколько возможно сократив время фиксации. Микротомные срезы приготавливают и наклеивают на предметные стекла по обычной цитологической методике.

Выполнение задания. Порядок выполнения задания дан в табл. 6.

Люминесцентный метод выявления ДНК и РНК в клетках

Задание. 1. Приготовить препарат для люминесцентного микроскопа. 2. Определить локализацию ДНК и РНК в клетках меристемы корешков.

Материал. 1. Акридин оранжевый. 2. Фосфатный буфер с рН 4,2. 3. Давленные препараты или микротомные срезы. 4. Сахарный сироп 50%-ный (см. с. 18), 5. Реактивы для депарафинирования микротомных срезов.

Пояснения к заданию. Метод люминесцентной микроскопии основан на том, что некоторые вещества при освещении коротковолновыми лучами (ультрафиолетовыми, рентгеновскими и др.) способны люминесцировать, т. е. светиться желто-зеленым или оранжевым светом. Способность веществ излучать свет называется первичной люминесценцией. Если вещество не люминесцирует, то его можно обработать специальными красителями — флюорохромами. В этом случае они тоже люминесцируют (вторичная, или наведенная, люминесценция). Препарат, окрашенный флюорохромами, изучают в среде, которая не люминесцирует под действием коротковолновых лучей. Такой средой могут быть вода, глицерин, сахарный сироп и др.

Наблюдать люминесценцию можно в обычном биологическом микроскопе при помощи специального устройства ОИ-17 с ртутной лампой в качестве источника света. Но удобнее всего для этой цели пользоваться люминес-

центными микроскопами МЛ-2, МЛ-3, МЛ-4. У этих микроскопов источником света служит кварцевая или ртутно-кварцевая лампа. Работать с таким микроскопом лучше в затененной комнате.

Для выявления ДНК и РНК чаще всего в качестве флюорохрома используют акридин оранжевый. Оптимальным для дифференцированной окраски ДНК и РНК является рН 4,2. Для создания такого рН используют фосфатно-ацетатный буфер.

Для приготовления раствора акридина оранжевого 0,1 г красителя растворяют в 100 мл дистиллированной воды, а затем перед употреблением его еще раз разводят в фосфатно-ацетатном буфере до концентрации 0,01%.

Т а б л и ц а 7. Порядок приготовления препаратов для люминесцентного исследования ДНК и РНК

№ п. п.	Реактив	Процедура с препаратом *	Продолжительность
1	Ксилол парафиновый I	Поместить в цилиндр	10...15 мин
2	» » II	» »	10...15 мин
3	96%-ный спирт	Обмыть из капельницы	30 с
4	80%-ный »	Поместить в цилиндр	2...3 мин
5	70%-ный »	» »	1...2 мин
6	50%-ный »	» »	1...2 мин
7	Дистиллированная вода	» »	3 мин
8	0,01%-ный акридин оранжевый	» »	3 мин
9	Фосфатный буфер рН 4,2	» »	1...2 мин
10	0,1 М CaCl ₂	» »	1...2 мин
11	Фосфатный буфер рН 4,2	Обмыть из капельницы	30 с
12	50%-ный сахарный сироп	ЗаклЮчить препарат в сахарный сироп	
13	Исследовать препарат под люминесцентным микроскопом		

* Предварительно материал для приготовления постоянных препаратов должен быть зафиксирован, пропитан парафином. Парафиновые срезы должны быть наклеены на предметные стекла с помощью дистиллированной воды. Давленные препараты для люминесцентного исследования готовят по той же методике, но они не нуждаются в депарафинировании, поэтому их промывают в дистиллированной воде (п. 7) и окрашивают акридином оранжевым.

Фосфатно-ацетатный буфер с рН 4,2 готовят из двух растворов: 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия (Na₂HPO₄) и 0,1 М лимонной кислоты. Учитывая, что относительная молекулярная масса Na₂HPO₄·2H₂O равна 179, для приготовления 0,2 М раствора берут 35,8 г вещества и растворяют в 1000 мл дистиллиро-

ванной воды. 0,1 М раствор лимонной кислоты (относительная молекулярная масса 210) готовят из 10,5 г вещества, растворенного в 500 мл дистиллированной воды. Буфер с рН 4,2 получают, добавив к 82,8 мл 0,2 М раствора двузамещенного фосфата натрия 117,2 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты.

Если для выявления ДНК и РНК используют парафинированный материал, то микротомные срезы готовят по обычной методике и приклеивают их на предметные стекла дистиллированной водой. Ни в коем случае нельзя приклеивать срезы белком. Затем срезы депарафинируют и окрашивают акридином оранжевым (см. табл. 7). После окрашивания препараты заключают в сахарный сироп.

Этим методом можно исследовать и давленные препараты, которые готовят из материала, зафиксированного по Карнуа и промытого в 70%-ном спирте. Их окрашивают, дифференцируют в фосфатно-ацетатном буфере и заключают в сахарный сироп. ДНК, окрашенная акридином оранжевым, под люминесцентным микроскопом светится ярко-зеленым цветом, а РНК — желтовато-красным. Порядок выполнения задания дан в табл. 7.

БИОЛОГИЯ ПОЛОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

Половое воспроизведение осуществляется через половые клетки — гаметы. При оплодотворении две половые клетки — мужская и женская, имеющие гаплоидный набор хромосом, соединяются, образуя зиготу. Зигота дает начало новому организму, сочетающему признаки и свойства, присущие родительским особям.

Процесс развития половых клеток, предшествующий оплодотворению, имеет принципиальное сходство у всех живых организмов, так как в основе его лежит мейоз. Вместе с тем этот процесс имеет и особенности, присущие каждому виду растений и животных. К тому же женские и мужские половые клетки у животных и растений различаются как по характеру своего развития, так и по своему строению. Процесс образования микроспор называется микроспорогенезом, а макроспор — макроспорогенезом, или мегаспорогенезом. Процесс развития мужских половых клеток — спермиев — называется микрогаметогенезом, или спермиогенезом, а женских — яйцеклеток — макрогаметогенезом, или мегагаметогенезом.

СПОРОГЕНЕЗ И ГАМЕТОГЕНЕЗ

Микроспорогенез и микрогаметогенез (спермиогенез)

Задание. 1. Ознакомиться с процессами образования микроспор. 2. Просмотреть под микроскопом и зарисовать основные этапы микроспорогенеза и микрогаметогенеза у ржи и гороха или других культур (пшеницы, ячменя, кукурузы, кормовых бобов, вики и т. д.), но желательно, чтобы одно из изучаемых растений было двудольным, а другое — однодольным.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты продольных срезов пыльников в состоянии микроспорогенеза и микрогаметогенеза. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка.

Пояснения к заданию. В цветочных почках на четвертом этапе органогенеза (см. с. 130) происходят дифференциация цветка и заложение тычиночных и пестичных бугорков. Затем тычиночные бугорки дифференцируются на тычиночную нить и пыльник. Пыльник состоит из четырех микроспорангиев. Два латеральных микроспорангия составляют теку, или сумку. Теки соединены между собой связником. В центре гнезда пыльника обособляется спорогенная ткань — первичный археспорий. Она состоит из крупных клеток, имеющих по сравнению с другими клетками более густую цитоплазму и более крупное ядро с одним ядрышком. Клетки первичного археспория, делясь и обособляясь, дают начало клеткам вторичного археспория, преобразующимся в материнские клетки пыльцы (микроспороциты). Микроспороциты претерпевают мейотическое деление, в результате которого образуется тетрада микроспор, содержащих гаплоидный набор хромосом (рис. 7). Затем микроспоры обособляются, и в каждой из них вскоре образуются 2 оболочки — внешняя (экзина) и внутренняя (интина). У многих видов растений внешняя поверхность экзины имеет различные образования — зубчики, шипики, углубления и т. д. Кроме того, в экзине имеются поры — отверстия, через которые в дальнейшем прорастает пыльцевая трубка. Внутренняя оболочка пыльцевого зерна — интина — представляет собой тонкую двухслойную пленку.

В пыльцевом зерне через несколько дней начинается микрогаметогенез. Сначала делится первичное ядро пыльцевого зерна. Это деление протекает по типу митоза, и в результате его образуются 2 клетки (два ядра) — вегетативная и генеративная; пыльцевое зерно становится двуядерным. В дальнейшем вегетативная клетка не делится; в ней происходит накопление питательных веществ, необходимых для развития генеративной клетки и роста пыльцевой трубки во время оплодотворения. Генеративная клетка веретенообразной формы имеет очень тонкую оболочку, плотное ядро.

У одних растений за 1...3 дня до цветения (у злаков, льна, сложноцветных и др.) генеративная клетка делится в пыльцевом зерне, в результате чего образуются две мужские половые клетки — спермии; у других — деление генеративной клетки и образование спермиев происходит в пыльцевой трубке во время прорастания

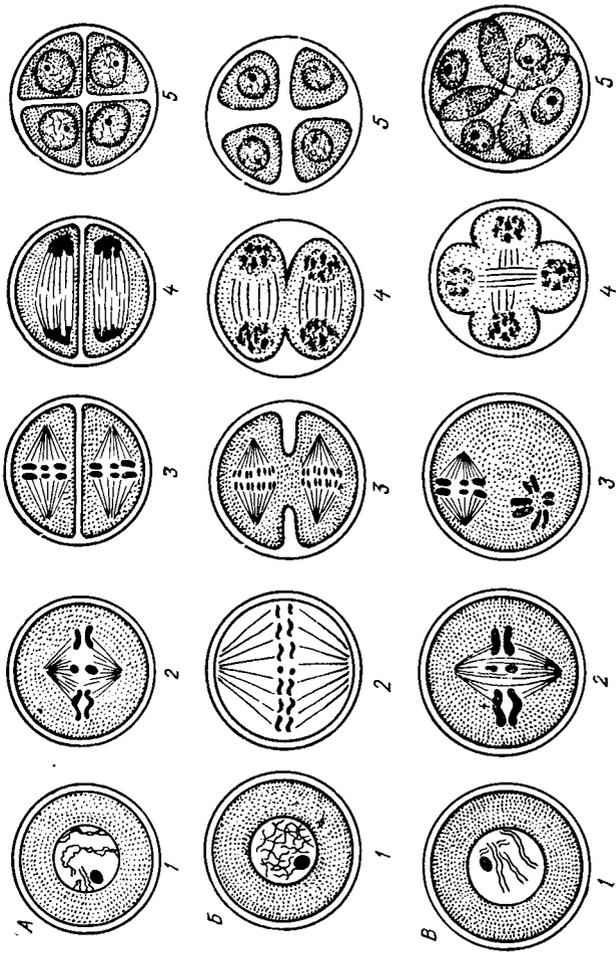


Рис. 7. Типы развития тетрад микроспор у покрытосеменных растений (по А. И. Агабековой и Е. И. Устиновой, 1971);

А — сукцессивный (последовательный) тип; В — симультанный (одновременный) тип; 1 — профазы I; 2 — метафаза I; 3 — метафаза I; 4 — телофаза I; 5 — тетрада микроспор

пыльцевого зерна. По форме спермии могут быть округлыми, овальными, серповидными, червеобразными и т. д.

Число пыльцевых зерен в одном пыльнике может быть значительным: у пшеницы — от 800 до 1200 и более, у ржи — более 3000 и т. д.

Выполнение задания. Микроспорогенез и микрогаметогенез изучают на постоянных, полупостоянных или временных препаратах, которые готовят из пыльников ржи, кукурузы, пшеницы, гороха, кормовых бобов, лука и других растений по обычной цитологической методике. Перед фиксацией на временных препаратах следует убедиться в том, что в данном соцветии идет микроспорогенез или микрогаметогенез, и только после этого фиксировать материал для приготовления постоянных или полупостоянных препаратов. Фиксировать пыльники лучше всего по Навашину, но можно и по Карнуа. Обычно у злаков микроспорогенез протекает за 3...7 дней до колошения, а микрогаметогенез — через 2...5 дней после колошения. Постоянные препараты удобнее делать из продольных срезов пыльников. Окрашивать их лучше всего гематоксилином по Гейденгайну, по Делафилду или по Фельгену.

Микроспорогенез и микрогаметогенез можно изучать и на временных препаратах. Для этой цели используют либо свежесобранный материал, либо соцветия, зафиксированные по Карнуа и хранящиеся в 70%-ном спирте. Техника приготовления этих препаратов та же, что и при изучении мейоза (см. с. 18).

Препараты следует внимательно рассмотреть под микроскопом и зарисовать этапы микроспорогенеза, протекающего по сукцессивному и симультанному типам. Затем рассмотреть под микроскопом и зарисовать препараты пыльцы, в которой протекает микрогаметогенез. При этом следует обратить особое внимание на строение и размеры пыльцевых зерен, присущих данному виду растений, на наличие и строение пор, на вегетативную и генеративную клетки, а также на клетки-спермии.

Мегаспорогенез и мегагаметогенез

Задание. Рассмотреть под микроскопом и зарисовать мегаспорогенез и основные этапы формирования зародышевого мешка у пшеницы, кукурузы, гороха, льна и других растений.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты с картинами мегаспорогенеза и различных этапов формирования зароды-

шевого мешка. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка. 4. Карандаш.

Пояснения к заданию. Мегаспорогенез (макроспорогенез) у покрытосеменных растений протекает в семяпочках, расположенных в завязи пестика. Число семяпочек в одной завязи может быть самым различным в зависимости от вида растений. У злаков в завязи развивается одна семяпочка, у бобовых — от одной до семи, у маковых — несколько тысяч.

В семяпочке различают интегументы (покровы) и нуцеллус (ядро, центральная часть). Интегументы обычно не полностью покрывают нуцеллус, образуя пыльцевход (микропиле), через который пыльцевые трубки проникают в зародышевый мешок (женский гаметофит).

В нуцеллусе каждой семяпочки закладывается одноклеточный археспорий. Археспориальная клетка крупнее остальных клеток нуцеллуса, имеет густую цитоплазму, крупное ядро с одним ядрышком. В ней происходит мейоз, в результате которого образуется тетрада макроспор. Каждая макроспора содержит гаплоидный набор хромосом.

Тетрады макроспор чаще всего располагаются линейно, одна за другой. В дальнейшем у многих растений из четырех гаплоидных макроспор развивается в зародышевый мешок только одна, обычно обращенная к халазе, а остальные три макроспоры дегенерируют. Зародышевый мешок нормального типа (Polygonum-тип) образуется из этой нижней халазальной макроспоры, которая разрастается в длину и ширину; ее ядро претерпевает 3 последовательных деления, в результате которых образуется восьмиядерный зародышевый мешок (рис. 8).

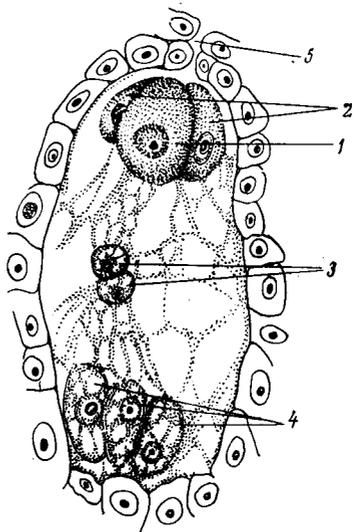


Рис. 8. Зародышевый мешок пшеницы сразу после окончания мегаспорогенеза:

1 — яйцеклетка; 2 — синергиды;
3 — полярные ядра; 4 — антиподы; 5 — микропиле

Ядра занимают строго полярное положение: 4 из них располагаются в халазальном, а 4 — в микропилярном концах зародышевого мешка. Из противоположных концов зародышевого мешка отходит по одному ядру (полярные ядра), которые сближаются и располагаются в его центральной части. У многих растений (пшеница, кукуруза, горох, кормовые бобы, лук и др.) полярные ядра, как правило, не сливаются, а находятся в сближенном состоянии до оплодотворения. У других растений (например, гречиха, подсолнечник) они сливаются в момент сближения, образуя диплоидное ядро центральной клетки зародышевого мешка.

В халазальном конце зародышевого мешка располагаются клетки-антиподы. Эти клетки у некоторых видов растений способны делиться, и число их бывает иногда довольно большим. Например, у пшеницы их бывает 16...32. Они довольно разнообразны по форме и величине. У некоторых растений 3 клетки-антиподы сохраняются до начала эмбриогенеза, у других они дегенерируют раньше — до начала оплодотворения.

В микропилярном конце зародышевого мешка находится яйцевой аппарат. Он состоит из 3 клеток — яйцеклетки (женской гаметы) и 2 синергид. Яйцеклетка обычно занимает центральное положение в яйцевом аппарате. Она крупнее синергид, удлиненной или грушевидной формы, имеет крупное ядро с одним ядрышком. Ядро расположено в нижней, наиболее широкой части яйцеклетки, обращенной внутрь зародышевого мешка. Синергиды располагаются с обеих сторон яйцеклетки. Они вытянутые, с небольшими овальными или вытянутыми ядрами.

Выполнение задания. Макроспорогенез и макрогаметогенез обычно изучают на постоянных препаратах.

Для изучения развития зародышевого мешка следует фиксировать пестики, взятые из цветков, которые находятся в разной степени развития: в бутонах, перед цветением, во время цветения и т. д. У пшеницы формирование зародышевого мешка начинается за 1...3 дня до колошения и заканчивается спустя 1...3 дня после колошения. Созревает зародышевый мешок за 2...3 дня до цветения. У ячменя формирование зародышевого мешка заканчивается до колошения, у гороха — в бутонах.

Постоянные препараты следует внимательно рассмотреть под микроскопом и зарисовать этапы макроспорогенеза. Затем рассмотреть другие препараты и зарисовать 1-, 2-, 4-, 8-ядерные зародышевые мешки, а также сформированный зародышевый мешок пшеницы (или другого злакового растения) и гороха (или другого бобового растения).

Особое внимание следует обратить на расположение и строение яйцеклетки, полярных ядер, клеток-антипод.

Оплодотворение у покрытосеменных растений

Задание. 1. Познакомиться с методикой приготовления постоянных препаратов 2. Для изучения процесса оплодотворения у растений под микроскопом рассмотреть постоянные препараты и зарисовать зародышевые мешки во время оплодотворения у пшеницы, кукурузы, гороха, льна и других культур.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты с картинами оплодотворения у пшеницы, кукурузы, гороха и других растений. 2. Микроскоп. 3. Рисовальный аппарат или окулярная сетка.

Пояснения к заданию. У покрытосеменных растений протекает двойное оплодотворение. Двойное оплодотворение было открыто в 1898 г. С. Г. Навашиным. Он впервые показал, что у покрытосеменных растений в пыльцевом зерне содержатся 2 спермия, один из которых при оплодотворении сливается с ядром яйцеклетки, а другой — с ядром диплоидной центральной клетки или с двумя полярными ядрами (см. рис. 9). Процесс оплодотворения у покрытосеменных растений протекает следующим образом. На рыльце пестика прорастает довольно много пыльцевых зерен. Они образуют длинные пыльцевые трубки, которые вырастают в ткань рыльца пестика. Однако лишь немногие из них продолжают расти дальше и достигают завязи. У большинства растений пыльцевые трубки растут вдоль покровов семязпочки и проникают в зародышевый мешок через микропиле и изливают свое содержимое чаще всего на одну из синергид. Спермии попадают в цитоплазму зародышевого мешка, затем один из них проникает в ядро яйцеклетки и сливается с ним, образуя зиготу, другой — сливается с полярными ядрами и образует первичное ядро эндосперма. Через некоторое время в ядре зиготы образуются 2 ядрышка, что обычно свидетельствует об окончании процесса оплодотворения. В результате слияния двух гамет—спермия и яйцеклетки,

имеющих гаплоидные наборы хромосом, в зиготе восстанавливается диплоидный набор хромосом, присущий соматическим клеткам данного вида. Из зиготы в процессе эмбриогенеза развивается зародыш семени.

Первичное ядро эндосперма содержит триплоидный набор хромосом, поскольку к диплоидному ядру центральной клетки, образовавшемуся при слиянии двух гаплоидных полярных ядер, присоединился еще гаплоидный набор хромосом спермия. Из первичного ядра эндосперма в процессе митотических делений образуется вначале ядерный, а затем клеточный эндосперм.

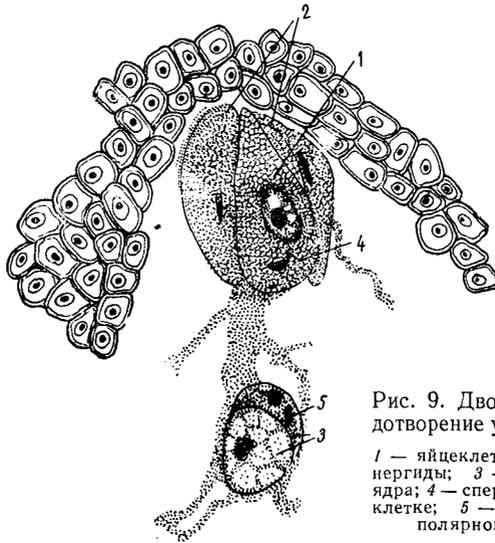


Рис. 9. Двойное оплодотворение у пшеницы:

1 — яйцеклетка; 2 — синергиды; 3 — полярные ядра; 4 — спермий в яйцеклетке; 5 — спермий в полярном ядре

Эндосперм имеет исключительно важное значение в развитии зародыша семени. У пшеницы, ржи, ячменя и других растений, если не произойдет слияние спермия с полярными ядрами, зародыш (проэмбрио) прекращает свое развитие на стадии 4...8 клеток.

В зародышевый мешок семяпочки обычно проникает одна пыльцевая трубка, но в некоторых случаях — несколько пыльцевых трубок, в результате чего внутри зародышевого мешка появляются дополнительные спермии.

Выполнение задания. Изучают процесс оплодотворения обычно на постоянных препаратах, которые готовят следующим образом. Пестики через определенное время

Таблица 8. Окраска постоянных эмбриологических препаратов основным фуксином с подкраской метиловым синим

№ п. п.	Реактив	Процедура, проводимая с препаратом *	Продолжительность процедуры
1	2	3	4
1	Ксилол парафиновый I	Поместить в цилиндр	10...15 мин
2	» » II	» »	10...15 мин
3	Спирт+ксилол	» »	1 мин
4	96%-ный спирт	Обмыть из капельницы	20...30 с
5	» »	Поместить в цилиндр	10...15 мин
6	Дистиллированная вода	» »	5 мин
7	» »	Обмыть из капельницы	20...30 с
8	Основной фуксин	Поместить в цилиндр	1...2 ч
9	96%-ный спирт I (дифференциация)	» »	5 мин
10	96%-ный спирт II (дифференциация)	» »	В зависимости от степени окраски (контролируют под микроскопом)
11	96%-ный спирт	Окунуть в цилиндр	3...5 с
12	Метиловый синий на анилиновой воде	Налить из капельницы 2...3 капли на поверхность срезов	1...2 мин
13	100%-ный спирт	Обмыть из капельницы	20...30 с
14	Ксилол+спирт (1 : 1)	Поместить в цилиндр	10...15 мин
15	Ксилол	Обмыть из капельницы	20...30 с
16	Карбол-ксилол	Поместить в цилиндр	5 мин
17	Ксилол бальзамовый I	» »	5 мин
18	» » II	» »	3 мин
19	Бальзам	ЗаклЮчить в бальзам	1 мин

* Препарат представляет собой парафинированные продольные микрономные срезы завязи, наклеенные на предметные стекла.

после опыления фиксируют в фиксаторе Модилевского или Навашина. Водные фиксаторы в клетки завязи проникают медленно, поэтому пестики следует предварительно на 1...2 мин опустить в уксусный алкоголь (измененный фиксатор Карнуа). Дальнейший процесс приготовления постоянных препаратов проводят по обычной цитологической методике. При резке на микротоме пестики следует ориентировать так, чтобы лезвие ножа было параллельно шву срастания плодолистиков. Красить препараты, особенно в начале процесса оплодотворения,

лучше всего по Модилевскому — основным фуксином с метиленовым синим (табл. 8). В этом случае растущие пыльцевые трубки окрашиваются в ярко-красный цвет, спермии — в темно-лиловый, остальные ядра клеток завязи, в том числе и зародышевого мешка, — в синий, а цитоплазма зародышевого мешка — в голубой различных оттенков. Синергиды, после того как пыльцевая трубка проникнет в зародышевый мешок и изольет на них свое содержимое, окрашиваются в светло-розовый цвет.

СИСТЕМА ПОЛОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

В генетике тип опыления у растений данного вида называют системой полового размножения. Покрытосеменные по типу опыления делят на самоопыляющиеся и перекрестноопыляющиеся. У растений-самоопылителей (пшеница, ячмень, овес, просо, горох, кормовые бобы, хлопчатник, лен и др.) в естественных условиях пестики опыляются пылью из тычинок того же цветка. Пыльцевое зерно, попав на рыльце пестика, прорастает пыльцевой трубкой в ткани столбика и завязи, затем пыльцевая трубка проникает в зародышевый мешок, и спермии, находящиеся в ней, обеспечивают двойное оплодотворение. У этих растений вполне возможно опыление и пылью других растений, особенно при благоприятных погодных условиях, а также в тех случаях, когда по какой-либо причине у них не происходит самоопыления.

В природе гораздо чаще, чем самоопыление, встречается перекрестное опыление. У перекрестноопыляющихся растений (рожь, гречиха, кукуруза, сахарная свекла, редис, морковь, клевер, люцерна и др.) обычно пыльцевые зерна собственного цветка или растения слабо прорастают на рыльце пестика; пыльцевые трубки образуются короткими, и если и внедряются в ткань рыльца, то их рост в тканях столбика или завязи прекращается, и оплодотворение не происходит. Только единичные пыльцевые трубки могут проникнуть в зародышевый мешок, обеспечить двойное оплодотворение и завязывание семян. Растения, выросшие из этих семян, нередко менее жизнеспособны, у них наблюдается снижение плодовитости и развитие ослабленного потомства.

В ходе естественного отбора у перекрестноопыляющихся растений выработались разнообразные и совершен-

ные приспособления, препятствующие самоопылению. Это раздельнополость у двудомных (конопля, клубника) и однодомных (кукуруза) растений, разностолбчатость (гетеростилия), например у гречихи, разновременное созревание тычинок и пестиков (дихогамия) и др. Кроме того, для перекрестноопыляющихся растений характерно наличие различных приспособлений, обеспечивающих перенос пыльцы с одного растения на другое с помощью ветра или насекомых.

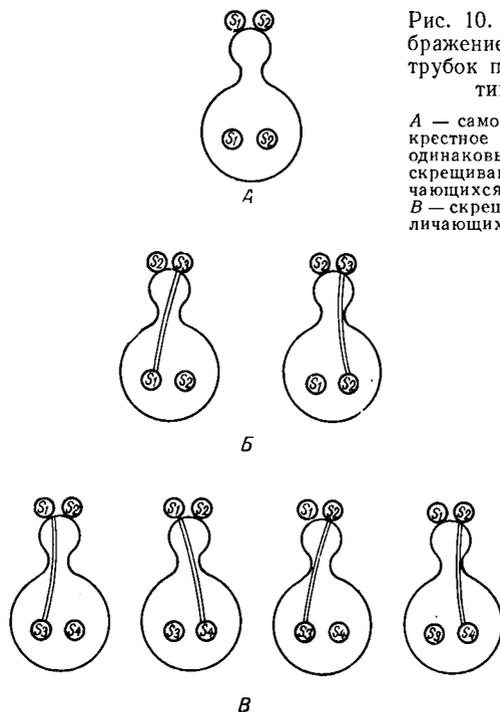
Некоторые сельскохозяйственные растения — редис, капуста и другие виды рода *Brassica*, клевер, сахарная свекла, многие плодовые растения, особенно вегетативно размножающиеся (яблоня, черешня и др.), хотя и имеют гермафродитный цветок, но обладают хорошо выраженной системой несовместимости. Под несовместимостью понимают неспособность пыльцевых трубок жизнеспособных пыльцевых зерен проникать через столбик и завязь в зародышевый мешок и обеспечить оплодотворение при самоопылении (самонесовместимость) или при опылении пыльцой других видов и родов (перекрестная несовместимость). Как самонесовместимость, так и перекрестная несовместимость определяются генотипом.

Основная функция самонесовместимости — предупреждение самоопыления (инбридинга) и обеспечение переопыления между неродственными особями одного вида (ауткроссинг).

Известны 3 основных типа несовместимости: гаметофитный, спорофитный и гетероморфный.

1. Гаметофитная самонесовместимость впервые была установлена для *Nicotiana sanderae*, поэтому ее называют несовместимостью типа *Nicotiana* (рис. 10). При этом типе несовместимости подавляется рост пыльцевых трубок на рыльцах пестика и в столбике. Она обусловлена серией множественных аллелей локуса гена *S* или нескольких локусов. При этом ни один из аллелей не проявляет доминирования или какой-либо другой формы взаимодействия аллелей. Диплоидные клетки пестика при этом содержат 2 аллеля несовместимости (например, S^1S^2). Растущая пыльцевая трубка того же растения содержит либо аллель S^1 , либо аллель S^2 . И в том, и в другом случае прорастание пыльцы или рост пыльцевых трубок будут подавляться аллелями S^1 и S^2 . Это выражается в том, что пыльца растет очень медленно или вовсе не прорастает, если пыльцевое зерно несет

тот же аллель, которым обладает пестик. Гаметофитная несовместимость обнаружена у видов клевера (*Trifolium pratense*, *T. repens*), донника лекарственного (*Melilotus officinalis*), у ржи (*Secale cereale*), у свеклы (*Beta vulgaris*) и других растений. При перекрестном опылении часть пыльцевых зерен всегда будет нести другую аллель (S^3 , S^4 , S^5 , S^6 и т. д.), поэтому при перекрестном опылении



пыльцевые зерна всегда будут прорастать на рыльце данного растения и обеспечат оплодотворение.

2. Спорофитная несовместимость определяется генотипом рыльца, столбика или завязи и проявляется в несоответствии генотипов пыльцевых трубок и генотипа клеток тканей столбика и завязи. В этом случае проявляется доминирование одного гена. Например, если аллель S^1 подавляет аллель S^2 , то вся пыльца растений S^2S^2 будет несовместимой с пестиками растения, имеющего ген S^1 . Если растение имеет генотип S^2S^2 , то на

рыльце и в столбике будет расти как пыльца растений S^1S^1 , так и пыльца растений с генотипом S^1S^2 . Такого рода несовместимость характерна для ряда видов семейства сложноцветных и крестоцветных.

3. Гетероморфная несовместимость проявляется у гетеростильных растений — гречихи, примулы, некоторых видов льна и др. При таком типе несовместимости нормальное завязывание семян происходит только в том случае, если пыльца длинностолбчатых цветков (ss или aa) опылит рыльца пестиков короткостолбчатых цвет-

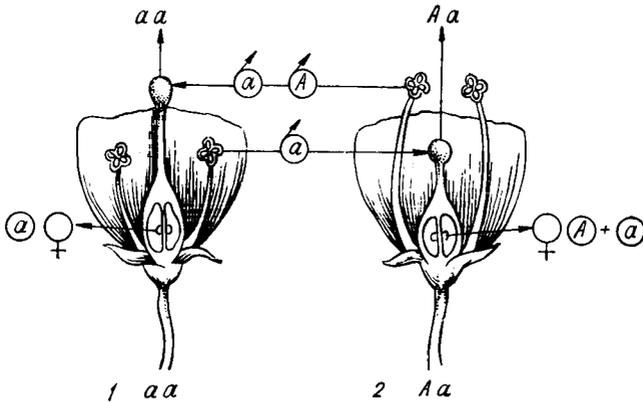


Рис. 11. Перекрестное опыление при гетеростилии:

1 — длинностолбчатое растение с генотипом aa ; 2 — короткостолбчатое растение с генотипом Aa

ков (Ss или Aa) или, наоборот, пыльца растений с генотипом Ss опылит растения с генотипом ss (рис. 11). Половина потомства от такого скрещивания будет состоять из растений с длинностолбчатыми цветками и половина — с короткостолбчатыми. Наряду с этим встречаются растения со столбиками и тычинками трех видов — длинными, средними и короткими. Длина столбиков и в этом случае генетически детерминирована: генотип длинного столбика обозначается $mmss$, среднего — $Mmss$ или $MMss$ и короткого — $MmSs$, $mmSs$, $MMSs$, $MMSS$ или $mmSS$.

Гаметофитную самонесовместимость удобнее всего изучать на растениях ржи, гетероморфную — на растениях гречихи.

Определение типа опыления

Задание. Определить тип опыления у растений пшеницы ржи, гороха, гречихи и других культур.

Материал и оборудование. 1. Растения ржи, пшеницы и других культур в фазах колошения — цветения. 2. Пергаментные изоляторы 15 шт. 3. Нитки, вата, карандаш. 4. Пинцет.

Пояснения к заданию. Оплодотворение у растений — сложный процесс, ведущий к слиянию гамет. Ему предшествует ряд последовательных этапов: опыление, прорастание пыльцы на рыльце пестика, рост пыльцевых трубок в тканях пестика, проникновение их в зародышевый мешок. Тип опыления определяют по завязываемости семян при самоопылении и перекрестном опылении.

Выполнение задания. 1. 5 колосьев ржи (перекрестноопыляющееся растение) и 5 колосьев пшеницы (самоопыляющееся растение) районированных сортов через 1...3 дня после колошения изолировать пергаментными изоляторами и оставить для самоопыления.

Таблица 9. Завязываемость семян у ржи и пшеницы при разных способах опыления

Культура, сорт	Опыление	Число		Завязалось зерен	
		ко- лосьев	разви- тых цвет- ков	число	%
Озимая пшеница Мионовская 808	Естественное	5	256	256	100
	Принудительное самоопыление	5	232	232	100
	Внутрисортное скрещивание (принудительное опыление)	5	120	104	87
Озимая рожь Вятка 2	Естественное	5	290	275	95
	Принудительное самоопыление	5	315	3	0,9
	Внутрисортное скрещивание (принудительное опыление)	5	140	96	60

2. По 5 колосьев ржи и пшеницы отметить пергаментными этикетками и оставить для естественного опыления.

3. 5 колосьев ржи и 5 колосьев пшеницы предварительно кастрировать по методике, приведенной на с. 65,

провести опыление свежесобранной пылью с других растений того же сорта и изолировать пергаментными изоляторами.

4. Через 7...10 дней определить процент завязавшихся семян и записать в таблицу (табл. 9).

Анализируя полученные данные о завязывании семян, можно сделать вывод о том, что пшеница — самоопыляющееся растение: у нее одинаково хорошо завязываются семена как при принудительном, так и при естественном самоопылении. Рожь — перекрестноопыляющееся растение: у нее при принудительном самоопылении семена практически не завязываются.

По такой же методике можно изучить систему полового размножения и у других растений.

Определение типа генетической несовместимости по характеру прорастания пыльцы на рыльце пестика

Задание. Определить характер прорастания пыльцы на рыльце пестика у растений ржи и пшеницы в зависимости от способа опыления (см. с. 129; рис. 23).

Материал и оборудование. 1. Растения ржи и пшеницы до цветения. 2. Пинцет. 3. Предметные и покровные стекла. 4. Ацетокармин. 5. Микроскоп. 6. Спиртовка. 7. Спички.

Пояснения к заданию. Изучать характер прорастания пыльцы на рыльце пестика удобно у таких растений, рыльце которых состоит из небольшого числа слоев прозрачных клеток, как например у пшеницы, ржи, ячменя, земляники и других культур. Этим методом можно изучать характер прорастания пыльцы на рыльце пестика своего вида и других видов, выясняя степень их участия в процессе оплодотворения при отдаленной гибридизации и т. д.

Выполнение задания. 1. Проводят искусственное самоопыление 5...10 цветков растений изучаемого сорта. Для этого на рыльце пестика наносят пыльцу, взятую из тычинок того же цветка. Это можно сделать либо в поле, либо в лаборатории на цветках и соцветиях, срезанных и поставленных в воду.

2. Через 30...40 мин после опыления рыльца пестиков осторожно срезают ножницами и переносят на предметное стекло в каплю ацетокармина.

3. Рыльце пестика осторожно расправляют препаровальной иглой на предметном стекле, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом.

4. Подсчитывают в каждом поле зрения число пыльцевых зерен, образовавшихся на рыльце пестика и в ткани столбика длинные пыльцевые трубки, короткие пыльцевые трубки, а также число зерен, не проросших и лопнувших.

Т а б л и ц а 10. Прорастание пыльцевых зерен на рыльце пестика того же растения у ржи и пшеницы

Культура, сорт	Число пыльцевых зерен на рыльце пестика										Примечание
	всего	образующих пыльцевые трубки				не проросших		лопнувших			
		длинные		короткие		число	%	число	%		
		число	%	число	%						
Озимая рожь Вятка 2 (принудительное самоопыление)	282	0	0	37	13	193	69	52	18	Гаметофитная самонесовместимость	
Озимая пшеница Мироновская 808 (принудительное самоопыление)	136	46	34	30	22	49	36	11	8	Растения самосовместимы	
Рожь Вятка 2 × пшеница Мироновская 808	160	0	0	0	0	125	78	35	22	Межродовая несовместимость	
Пшеница Мироновская 808 × рожь Вятка 2	323	19	6	57	18	198	62	49	14	Частичная межродовая совместимость	

5. Следует обратить внимание, что значительная часть пыльцевых зерен пшеницы, взятых из своего же цветка, через 30...40 мин после опыления прорастает и образует длинные пыльцевые трубки, внедрившиеся в ткань рыльца пестика, что свидетельствует об отсутствии несовместимости. У ржи при опылении пыльцой, взятой из своего цветка или из цветков того же растения, про-

растают единичные пыльцевые зерна. У них образуются короткие изогнутые пыльцевые трубки, обычно не врастающие в ткань рыльца пестика, что свидетельствует о наличии самонесовместимости. Генетически установлено, что у ржи гаметофитная самонесовместимость.

6. Зарисовать пыльцевые зерна на рыльце пестика пшеницы и ржи.

7. Подсчитать число пыльцевых зерен на рыльце, в том числе образующих длинные и короткие пыльцевые трубки, не проросших и лопнувших. Данные занести в табл. 10.

Гетероморфная несовместимость

Задание. 1. Познакомиться со строением гетеростильных цветков гречихи. 2. Определить завязываемость семян у гречихи при различных типах внутрисортного переопыления.

Материал и оборудование. 1. Цветущие растения гречихи. 2. Марлевые салфеточки. 3. Пергаментные этикетки, карандаш.

Выполнение задания. 1. Внимательно рассмотреть строение цветков у гречихи и нарисовать их схемы. Они мелкие, собраны в кисти, сидят на длинных цветоносах. Цветки 5-раздельные, белые, розовые или красные, около 3 мм в диаметре; тычинок 8; пестик с 3 столбиками и 3 рыльцами. Цветки у гречихи двоякого строения: у одних растений с генотипом *ss* столбик пестика длинный, а тычинки короткие (цветки длинностолбчатые); у других растений с генотипом *Ss*, наоборот, столбик пестика короткий, а тычинки длинные, длиннее пестика (цветки короткостолбчатые). На каждом растении имеются цветки только одного типа. У длинностолбчатых цветков рыльца несколько мельче, у короткостолбчатых — крупнее.

2. Провести скрещивание по схеме, указанной в табл. 11.

Для принудительного самоопыления (варианты 1 и 2) оставить в кисти по 3...5 хорошо развитых бутонов, а недоразвитые бутоны и раскрытые цветки удалить, кисть изолировать марлевой салфеточкой. Всего в каждом варианте опыта изолировать по 20 цветков на 5 растениях.

В остальных вариантах опыта (табл. 11) произвести кастрацию цветков и опыление свежесобранной пылью. В кисти удалить раскрытые цветки и недоразвитые бутоны и оставить 3...5 хорошо развитых бутонов. Затем бутоны кастрировать, пинцетом раскрыть бутон и удалить все 8 тычинок. Кастрированные бутоны изолиро-

вать марлевой салфеточкой. Через 2...3 дня кастрированные цветки опылить свежесобранной пылью в соответствии с вариантом опыта. Кастрацию и опыление следует проводить в ранние утренние часы.

Длинностолбчатые кастрированные цветки с генотипом *ss* опылить пылью, собранной с других длинностолбчатых растений того же сорта (вариант 3). Короткостолбчатые цветки (генотип *Ss*) опылить пылью, собранной с короткостолбчатых цветков того же сорта (вариант 4).

Провести скрещивание растений, имеющих разные генотипы. Растения с длинностолбчатыми цветками и генотипом *ss* опылить пылью, собранной с растений, имеющих короткостолбчатые цветки и генотип *Ss* (вариант 5). Короткостолбчатые растения опылить пылью, собранной с длинностолбчатых растений (вариант 6).

3. Через 5...7 дней после опыления просматривают цветки и устанавливают завязываемость семян в зависимости от генотипов скрещиваемых растений. Данные заносят в таблицу (табл. 11).

Т а б л и ц а 11. Завязываемость семян у гречихи при разных способах опыления

Вариант скрещивания, генотипы родительских форм	Способ опыления	Кастри- ровано и опылено цветков	Завязало- сь семян	
			Число	%
1. Длинностолбчатый × длинностолбчатый (<i>ss</i> × <i>ss</i>)	Самоопыление принудительное	20	0	0
2. Короткостолбчатый × короткостолбчатый (<i>Ss</i> × <i>Ss</i>)	То же	20	0	0
3. Длинностолбчатый × длинностолбчатый (<i>ss</i> × <i>ss</i>)	Внутрисортовое скрещивание при принудительном опылении	20	2	10
4. Короткостолбчатый × короткостолбчатый (<i>Ss</i> × <i>Ss</i>)	То же	20	1	5
5. Длинностолбчатый × короткостолбчатый (<i>ss</i> × <i>Ss</i>)	»	20	16	80
6. Короткостолбчатый × длинностолбчатый (<i>Ss</i> × <i>ss</i>)	»	20	14	70

В некоторых случаях у гречихи завязываются бессемянные плоды, поэтому каждый плод следует проверить и в таблицу проставить число завязавшихся семян.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ (ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ) АНАЛИЗ

Гибридологическим анализом называется изучение наследования признаков и свойств у гибридов, полученных в результате скрещивания особей, различающихся по этим признакам и свойствам. Г. Мендель на основании наблюдений над гибридами гороха установил (1865 г.) закономерности наследования, которые применимы для всех организмов и легли в основу современного генетического метода исследований. При проведении гибридологического анализа необходимо соблюдать следующие условия.

1. Скрещиваемые растения, проверенные в течение 3...5 лет на гомозиготность по анализируемым признакам, должны четко различаться по немногим (1...2 парам) контрастным признакам.

2. У гибридов каждого поколения изучать только анализируемые признаки, а не всю совокупность их.

3. Проводить индивидуальный анализ потомства каждого растения в ряду поколений, начиная со второго.

4. Вести строгий количественный учет гибридных растений, различающихся по изучаемым признакам в каждом поколении.

При гибридологическом анализе пользуются общепринятыми символами. Скрещивание обозначают знаком умножения \times , материнское растение — знаком ♀ (зеркало Венеры), отцовское — ♂ (щит и копье Марса). Название материнского сорта обычно пишут на первом, а отцовского — на втором месте. Родительские организмы, взятые для скрещивания, обозначают латинской буквой P (parentes — родители). Гибридное потомство обозначают латинской буквой F (filii — дети). Цифрой, стоящей возле буквы F , обозначают поколение гибридов, например F_1 , F_2 . Потомство от скрещивания гомозиготных родительских форм P_1 и P_2 называют первым поколением; потомство от скрещивания растений F_1

между собой — F_2 . Начиная с F_2 обязательно ведут анализ гибридов по семьям — потомствам отдельных растений.

Техника скрещивания

Задание 1. Ознакомиться с изготовлением основных типов изоляторов. 2. Кастрировать и опылить по 5...10 цветков или соцветий растений, предназначенных для гибридологического анализа.

Материал и оборудование. 1. Растения скрещиваемых сортов в фазе бутонизации. 2. Ножницы. 3. Пинцет с острыми концами. 4. Скальпель. 5. Кисточка. 6. Низенькая скамеечка. 7. Баночки, пробирки, коробочки или пакетики для сбора пыльцы. 8. Изоляторы пергаментные или матерчатые. 9. Вата. 10. Нитки или мягкая проволока. 11. Спирт. 12. Колышки. 13. Этикетки. 14. Журнал скрещиваний.

Пояснения к заданию. Для скрещивания следует подбирать растения, проверенные в двух-трех поколениях на гомозиготность по изучаемым признакам; последние должны быть хорошо выражены и сравнительно мало изменчивы под влиянием условий среды. Чтобы обеспечить равновероятную встречаемость гамет при оплодотворении, особенно при получении потомств F_1 , F_2 , при проведении анализирующих скрещиваний кастрированные цветки следует опылять достаточным количеством пыльцы. Для получения достоверных данных анализ нужно проводить на обширном гибридном материале, следовательно, объем скрещиваний должен быть достаточно большим.

Вся работа по гибридизации должна проводиться тщательно, с соблюдением изоляции.

Во избежание переопыления каждый раз при перемене кастрируемого или опыляемого растения следует тщательно протирать инструмент и руки ватой, смоченной спиртом.

Выполнение задания. *Изготовление изоляторов.* Для большинства растений, опыляемых ветром, применяют пергаментные изоляторы. Их изготавливают, сшивая на швейной машине вдвойне загнутые края или склеивая не размокающим в воде клеем.

Для растений, опыляемых насекомыми, изоляторы сшивают в виде мешочков соответствующих размеров из марли или капрона. В зависимости от особенностей строения цветка и биологии цветения скрещиваемого растения в качестве изоляторов можно применять вату

или венчик самого цветка, скрепленный мягкими нитками (у крупноцветковых растений — хлопчатник, ке-наф и др.).

Размеры изоляторов зависят от величины и формы соцветия, от способа опыления соответствующей культуры. Чтобы в изолятор не попали насекомые, а также чтобы предохранить стебель от поломки, его под соцветием или цветком обертывают ватой, и изолятор в этом месте перевязывают ниткой или мягкой проволокой.

Техника скрещивания. Работа по скрещиванию состоит из трех операций: подготовки соцветия к скрещиванию, кастрации и опыления. Техника проведения каждой операции зависит от биологии цветения и оплодотворения данной культуры, особенностей строения стебля растения, соцветия и цветка. Для скрещивания берут наиболее развитые растения, а на них — наиболее развитые соцветия и цветки.

При подготовке соцветия к скрещиванию удаляют все недоразвитые и отцветшие цветки, оставляя бутоны, предназначенные для кастрации. Кроме того, удаляют все части соцветия и цветка, мешающие скрещиванию (обрезают ости у ржи, ячменя и пшеницы, удаляют венчик у льна и т. д.).

Кастрировать нужно тогда, когда пыльники в цветке еще не созрели, но уже достаточно развились, и их можно удалить из цветка, не повреждая пестика. В жаркую сухую погоду лучше это делать рано утром или вечером, чтобы рыльце цветка не подвергать неблагоприятному действию прямых солнечных лучей. После кастрации на цветок или на все соцветие надевают изолятор, на котором делают надпись с указанием культуры, сорта, даты кастрации, числа цветков и фамилии лица, проводившего кастрацию. Например:

♀ Озимая пшеница Ульяновка
кастрир. 28/VI, цветков 20
Л. Грачева

Для гибридологического анализа гибридные растения получают только при искусственном опылении. Процесс опыления заключается в нанесении на рыльце пестика материнского растения пыльцы отцовского растения. Опылять нужно тогда, когда пестик вполне созрел и готов к оплодотворению. Лучше всего это делать во время массового цветения отцовских растений. Пыльцу соби-

рают в баночки или пакетики непосредственно перед опылением, так как она довольно быстро теряет жизнеспособность. Техника нанесения пыльцы на рыльце пестика (опыление) зависит от особенностей строения цветка.

После опыления цветка или соцветия на изоляторе (или этикетке) дополняют запись, которая должна иметь следующий вид:

♀ Озимая пшеница Ульяновка кастрир. 28/VI, цветков 20 ♂ Лютеценс 116 опыл. 29/VI, цветков 20
Л. Грачева

Через 5..7 дней следует проверить результаты скрещиваний и данные записать в таблицу (табл. 12).

Т а б л и ц а 12. Журнал гибридизации

Комбинация		№ расте- ния	Дата		Число кастри- рован- ных цвет- ков	Завязалось зерен	
♀	♂		кастри- рации	опы- ления		число	%
Озимая пшеница Ульяновка	Лютеценс 116	1	28/VI	29/VI	20	16	80
.....							
Неистоци- мый 195	Горох Московский 559	1	6/VII	6/VII	50	36	72
						136*	
.....							

* В числителе — число бобов, в знаменателе — число семян.

Для получения гибридных растений второго поколения необходимо обеспечить строгое самоопыление. Если у самоопыляющегося растения наблюдается склонность к перекрестному опылению, все растения первого поколения данной комбинации следует поместить под групповой изолятор. У перекрестноопыляющихся растений изоляция гибридов первого поколения каждой комбинации строго обязательна. Групповые изоляторы можно изготовить из пергаменты или из плотной ткани, у которой отверстия меньше пыльцевых зерен изолируемого растения. Под пергаментный изолятор помещают одновременно 10..20 соцветий, под матерчатый — все растения данной комбинации.

Анализ гибридов первого (F_1) и второго (F_2) поколений при моногибридном скрещивании

Задание. 1. Ознакомиться с основными закономерностями наследования признаков при моногибридном скрещивании. 2. Усвоить основные обозначения и термины, используемые при гибридизации. 3. Изучить исходные (родительские) растения по анализируемому признаку. 4. Проанализировать растения гибридов первого поколения (F_1) и установить характер наследования изучаемого признака, а также выявить доминантный и рецессивный признаки. 5. Проанализировать растения гибридов второго поколения (F_2) и установить характер расщепления по данному признаку. 6. Определить теоретически ожидаемый и фактически полученный характер расщепления гибридов.

Материал. 1. 5 растений материнского и 5 растений отцовского сортов. 2. 3 растения гибридов с семенами первого поколения (F_1). 3. 3 растения гибридов с семенами второго поколения (F_2).

Пояснения к заданию. Моногибридным называют такое скрещивание, при котором родители отличаются по одной паре альтернативных признаков.

Г. Мендель, скрещивая формы гороха (*Pisum sativum* L.), отличающиеся одна от другой по одной паре признаков, например желтой и зеленой окраске семян, установил, что все семена первого поколения (F_1) имеют желтую окраску (рис. 12). Признак желтой окраски семян оказался доминантным. Зеленая же окраска семян в первом поколении не проявилась — она оказалась признаком рецессивным (*recessivus* — отступающий).

Высеяв семена первого поколения и получив урожай от самоопыления, Г. Мендель обнаружил, что семена гороха второго поколения (F_2) имели различную окраску: часть этих семян — желтую, другая часть — зеленую окраску. Подсчет показал, что желтых семян было приблизительно в 3 раза больше, чем зеленых. Таким образом, в F_2 произошло расщепление гибридных растений по окраске семян в отношении 3 : 1. Г. Мендель также обнаружил, что при посеве семян второго поколения (F_2) зеленые семена дали в потомстве растения только с зелеными семенами, желтые же семена F_2 дали при посеве в потомстве F_3 следующий результат: $\frac{1}{3}$ желтых семян — растения только с желтыми семенами, а остальные $\frac{2}{3}$ желтых семян имели в потомстве расщепление: $\frac{3}{4}$ желтых и $\frac{1}{4}$ зеленых семян. Отсюда был сделан вывод, что желтые семена F_2 в наследственном отношении различны, так как часть их дает констант-

ное желтосемянное потомство, а часть — расщепляющееся потомство (см. рис. 12). В генетике приняты термины генотип и фенотип. Генотипом называется совокупность наследственных факторов (генов) данного организма.

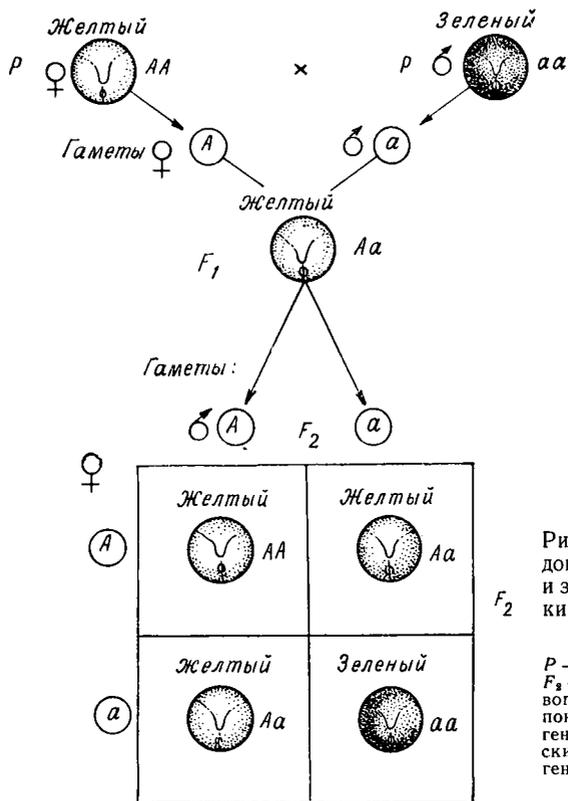


Рис. 12. Наследование желтой и зеленой окраски у семян гороха:

P — родители; F_1 , F_2 — гибриды первого и второго поколений; A — ген желтой окраски семян; a — ген зеленой окраски семян

Совокупность всех признаков и свойств организма, являющихся результатом взаимодействия генотипа с окружающей средой, называют фенотипом.

Исходя из предположения Г. Менделя о том, что каждый признак организма определяется наследственным фактором — геном, обозначая гены буквами латинского алфавита (прописными — доминантные и строчными — рецессивные), можно с их помощью записывать генотип растения. Парные контрастирующие при-

наки, которые обычно выявляются моногибридным расщеплением, обуславливаются аллельными генами.

Обозначив для гороха фактор желтой окраски семян буквой *A*, а фактор зеленой окраски — буквой *a*, мы можем записать генотип желтосемянного гороха как *AA*, зеленосемянного — *aa*. Такие формы, имеющие генотип *AA*, *aa*, *BB*, *bb* и т. д., не расщепляются в потомстве (константны) и называются гомозиготными. Формы, имеющие генотип *Aa*, *Bb* и т. д., расщепляются в потомстве и называются гетерозиготными.

Для анализа гибридов при моногибридном скрещивании можно использовать горох, пшеницу, ячмень и другие растения. Следует иметь для скрещивания 2 сорта гороха или другой культуры, отличающихся по одной паре признаков. В качестве таких сортов гороха кафедра генетики ЛГУ им А. А. Жданова рекомендует Московский 559, имеющий зеленые семена, и Неистощимый 195 с желтыми семенами.

Нужно обратить внимание на то, что при скрещивании растений гороха семена, созревшие на материнском растении в год скрещивания, являются гибридами первого поколения F_1 . Из этих семян при посеве вырастут гибридные растения первого поколения, а семена, которые созревают в бобах на этих растениях, будут семенами второго поколения F_2 .

Работу можно проводить в поле летом или в лаборатории зимой. Для занятий в лаборатории удобно приготовить специальные гербарные таблицы, окантованные, под стеклом. Результаты гибридологического анализа удобно записывать в таблицу (табл. 13).

Выполнение задания. 1. Вылущить бобы с растения материнского сорта, подсчитать число семян; убедиться, что все семена имеют желтую окраску.

2. Вылущить бобы с растения отцовского сорта, подсчитать число семян; убедиться, что все семена имеют зеленую окраску.

3. Вылущить бобы 3 растений с семенами первого поколения (F_1); убедиться, что семена имеют желтую окраску, и подсчитать число полученных семян. Определить, какая окраска (желтая или зеленая) доминантная и какая рецессивная.

4. Вылущить бобы 10 растений гороха с семенами второго поколения (F_2), подсчитать число желтых и зеленых семян в F_2 , вычислить отношение между ними.

Далее следует высчитать теоретически ожидаемое отношение желтых и зеленых семян в F_2 . Для этого можно воспользоваться решеткой Пеннета (см. рис. 12).

Таблица 13. Гибридологический анализ при моногибридном скрещивании гороха

Родительские сорта и гибриды	Проанализировано растений	Получено семян			Расщепление	
		Всего	В том числе		теоретический ожидаемое (3 : 1)	фактически полученное
			желтых	зеленых		
♀ Неистошимый 195	5	120	125	0	—	—
♂ Московский 559	5	118	0	118	—	—
F_1	3	46	46	0	—	—
F_2	10	154	110	44	116 : 38 (3 : 1)	110 : 44 (2,5 : 1)
F_2 (суммарные данные анализа, полученные всей группой студентов)	40	1760	1310	450	1320 : 440 (3 : 1)	1310 : 450 (2,9 : 1)

В случае моногибридного скрещивания расщепление в F_2 происходит в отношении 3 : 1 ($3/4$ желтых семян и $1/4$ зеленых). Это расщепление по фенотипу. В нашем примере (табл. 12) теоретически ожидаемое отношение 116 : 38.

5. Данные по расщеплению в F_1 и F_2 , полученные всеми студентами данной группы, суммировать и записать в таблицу (табл. 13). Обратит внимание, что чем больше число полученных семян, тем фактически полученное расщепление в F_2 ближе к теоретически ожидаемому.

Возвратное скрещивание

Задание. 1. Ознакомиться с понятием возвратного и анализирующего скрещивания. 2. Изучить расщепление по окраске семян гороха в потомстве от скрещивания гибрида F_1 с каждой из родительских форм. 3. На основании анализа характера расщепления убедиться в гибридном происхождении использованных в скрещивании семян F_1 , выявить их генотип.

Материал. 1. По одному растению каждой родительской формы — желтозерного (сорт Неистошимый 195) и зеленозерного (сорт Московский 559) гороха. 2. Семена F_1 с 3 растений. 3. 3...6 растений с семенами, полученными от опыления растений F_1 пыльцой желто-

зерной гомозиготной родительской формы. 4. 3...5 растений с семенами, полученными от опыления растений F_1 пыльной зеленозерной гомозиготной родительской формы.

Пояснения к заданию. Скрещивание гибрида с родительской формой, гомозиготной по изучаемой паре аллелей, называется возвратным скрещиванием — бек-кроссом. Потомство, полученное при таком скрещивании, обозначают $F_{\text{в}}$ (рис. 13, 14).

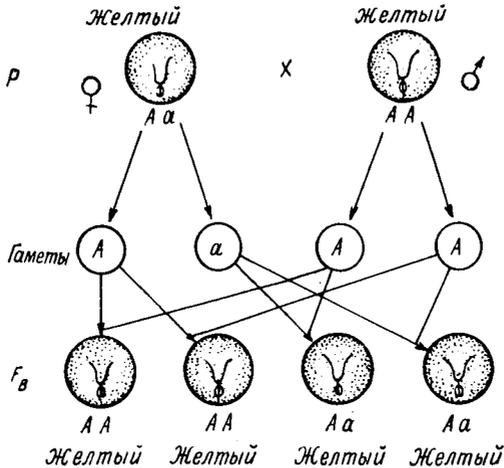


Рис. 13. Возвратное скрещивание гибрида F_1 с доминантной родительской формой:

P — родители (материнское растение — F_1 , отцовское — сорт с доминантным признаком); $F_{\text{в}}$ — поколение возвратного скрещивания (бек-кросса); A — ген желтой окраски; a — ген зеленой окраски семян

Возвратное скрещивание гибрида F_1 (рис. 13) с родительской формой, гомозиготной по доминантному аллелю (AA), дает растения двух генотипов — AA и Aa . В случае полной доминантности расщепления по фенотипу не произойдет; полученное потомство ($F_{\text{в}}$) не позволит выявить генотипическую структуру гибрида.

Скрещивание гибрида F_1 (рис. 14) с родительской формой, гомозиготной по рецессивному аллелю (aa), называемое анализирующим, позволяет выявить генотипическую структуру гибрида, т. е. установить, является ли данный организм гомозиготным или гетерозиготным. В этом случае также получится растения двух генотипов, но произойдет их расщепление и по

фенотипу в отношении 1 Aa : 1 aa . Полученный результат дает возможность утверждать, что для анализирующего скрещивания взята действительно гетерозиготная форма (Aa).

Для изучения анализирующего скрещивания можно использовать горох и другие растения. Удобно проводить изучение на сортах гороха Неистоимый 195, имеющего желтые семена, и Московский 559 с зелеными семенами. Выполняется работа в лаборатории.

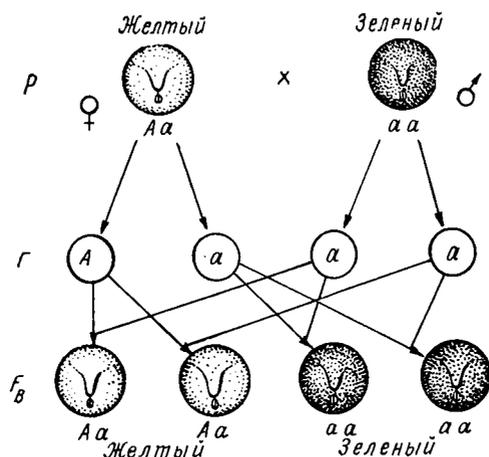


Рис. 14. Анализирующее скрещивание — возвратное скрещивание гибрида с рецессивной родительской формой:

P — родители (материнское растение — F_1 , отцовское растение — сорт с рецессивным признаком); F_1 — поколение бек-красса; A — ген желтой окраски семян; a — ген зеленой окраски семян

Выполнение задания. 1. Вылущить бобы родительских растений и определить окраску семян.

2. Вылущить бобы с 3 растений с семенами F_1 , сосчитать число семян, убедиться в их желтой окраске.

3. Вылущить бобы с семенами, полученными на растениях F_1 от скрещивания их с желтым гомозиготным родительским сортом, и сосчитать семена.

4. Вылущить бобы с семенами, полученными от скрещивания F_1 с зеленозерным гомозиготным родительским сортом; сосчитать число желтых и зеленых семян; полученные данные записать в таблицу (табл. 14). Отдельной строчкой внести в таблицу данные о результатах анализирующего скрещивания, полученных по большой группе растений. Обратит внимание на то, что при большом числе семян фактически полученное расщепление ближе к теоретически ожидаемому.

Таблица 14. Анализ результатов возвратного скрещивания (беккроса) у гороха (F_1 от скрещивания сортов Неистощимый 195 \times Московский 559)

Тип скрещивания	Число расте- ний	Получено семян			Расщепление по фенотипу	
		жел- тых	зеле- ных	всего	теорети- чески ожидае- мое	факти- чески полу- ченное
$F_1 \times$ Неистощимый 195	4	54	—	54	Нет	Нет
$F_1 \times$ Московский 559	4	33	25	58	1 : 1	1,32 : 1
$F_1 \times$ Московский 559	50	365	359	724	1 : 1	1,02 : 1

Анализ гибридов первого (F_1) и второго (F_2) поколений при дигибридном скрещивании

Задание. 1. Ознакомиться с основными закономерностями наследования признаков при дигибридном скрещивании. 2. Изучить исходные (родительские) растения по анализируемым признакам. 3. Проанализировать первое гибридное поколение (F_1) и установить характер наследования двух рассматриваемых признаков, выявить доминантные и рецессивные признаки. 4. Проанализировать второе гибридное поколение (F_2) и установить характер наследования изучаемых признаков. 5. Сделать запись в решетке Пеннета, определить теоретически ожидаемое расщепление в F_2 . 6. Рассчитать фактически полученное расщепление в F_2 .

Материал. 1. 5 растений материнского и 5 растений отцовского сортов. 2. Растения F_1 . 3. Растения F_2 .

Пояснения к заданию. Дигибридным называют такое скрещивание, при котором родительские формы отличаются одна от другой по двум парам контрастных признаков, и у гибридов учитываются только 2 пары признаков.

Г. Мендель использовал для гибридного скрещивания гомозиготные растения гороха, различавшиеся по двум парам признаков, например по окраске и форме семян. Было обнаружено, что при таком скрещивании расщепление по каждой паре признаков в отдельности происходит так же, как и при моногибридном скрещивании — в отношении 3 : 1, т. е. независимо от другой пары альтернативных признаков. В опыте Г. Менделя, в котором родительские формы отличались по окраске семян и по форме, в F_2 соотношение желтых и зеленых

семян составило 3,01 : 1, отношение числа гладких семян к морщинистым 2,96 : 1.

Для гибридологического анализа при дигибридном скрещивании можно использовать 2 сорта гороха, которые рекомендованы для анализа гибридов при моногибридном скрещивании, т. е. Московский 559, имеющий гладкие зеленые семена, и Неистошимый 195 с морщинистыми желтыми семенами. Можно использовать и другие виды растений, например многорядные и гладкоостые сорта ячменя Гейтуэй или Паркленд (Канада) и двурядный с зазубренными остями сорт Винер. Как и в случае анализа при моногибридном скрещивании, работа может быть выполнена летом в поле или в лаборатории зимой.

Теоретически ожидаемое расщепление в F_2 при дигибридном скрещивании можно рассчитать при помощи решетки Пеннета. Для этого следует предварительно выяснить генотип семян F_1 , от которых мы получаем потомство, а также генотипы родительских форм, использованных для получения семян F_1 . Если аллель, обуславливающий гладкую форму семян, обозначим буквой B , морщинистую — буквой b , аллель желтой окраски семян — буквой A и зеленой — буквой a , то генотипы родительских сортов и гибрида будут обозначены следующим образом: Неистошимый 195 — $AAbb$, Московский 559 — $aaBB$, F_1 — $AaBb$. Далее необходимо выписать все типы гамет, какие могут образоваться у гибридов F_1 : AB , Ab , aB и ab . Предположим, что у гороха в F_1 с равной вероятностью образуются перечисленные выше типы гамет как в мужских, так и в женских генеративных органах.

При построении решетки Пеннета слева по вертикали записывают типы женских гамет, сверху по горизонтали — типы мужских гамет (рис. 15). Все возможные комбинации, которые могут быть при оплодотворении, записывают на соответствующих пересечениях. На решетке Пеннета удобно подсчитать число генотипов и определить фенотипы F_2 с желтыми гладкими, желтыми морщинистыми, зелеными гладкими и зелеными морщинистыми семенами. Результаты подсчета дают теоретически ожидаемое расщепление семян F_2 по фенотипу (отношение 9 : 3 : 3 : 1).

Выполнение задания. 1. Вылущить бобы растений родительского сорта Неистошимый 195, подсчитать число семян. Убедиться, что все семена желтые морщинистые.

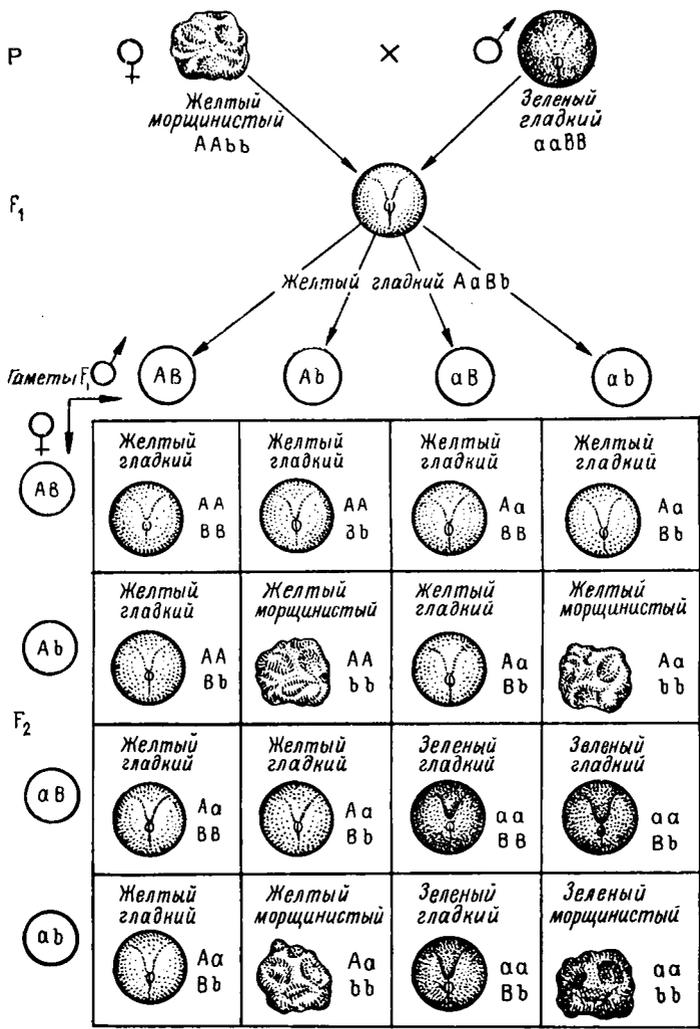


Рис. 15. Наследование формы и окраски семян у гороха:

P — родители; *F*₁ — гибрид первого поколения; *F*₂ — гибриды второго поколения; *A* — ген желтой окраски семян; *a* — ген зеленой окраски семян; *B* — ген, обуславливающий гладкую форму семян; *b* — ген, обуславливающий морщинистую форму семян

2. Вылущить бобы растений второго родительского сорта (Московский 559), подсчитать число семян; убедиться в том, что все семена зеленые гладкие.

3. Вылущить семена F_1 из бобов; убедиться, что все семена одинаковы по окраске (желтые) и по форме (гладкие). Записать в тетрадь, какие признаки по окраске и форме семян являются доминантными, какие — рецессивными.

4. Вылущить семена F_2 из бобов. Разделить все семена F_2 на 4 группы по сочетанию окраски и формы: желтые гладкие, желтые морщинистые, зеленые гладкие, зеленые морщинистые.

5. Сосчитать число семян в каждой группе, установить соотношение между числом семян в группах. Все полученные данные занести в таблицу (табл. 15).

Т а б л и ц а 15. Гибридологический анализ при дигибридном скрещивании гороха

Родительские сорта и гибриды	Проанализировано растений	Получено семян				Расщепление		
		Всего	В том числе			теоретически ожидаемое	фактически полученное	
			желтых гладких	желтых морщинистых	зеленых гладких			зеленых морщинистых
♀ Неистошимый 195	5	120	0	120	0	0	—	—
♂ Московский 559	5	100	0	0	100	0	—	—
F_1	5	70	0	0	0	0	—	—
F_2	10	112	60	24	20	8	9:3:3:1	7,5:3:2,5:1
F_2 (суммарные данные по всем семьям данной комбинации)	60	1440	807	268	273	92	9:3:3:1	8,77:2,91:2,96:1

6. Для выяснения поведения каждой пары аллелей в потомстве дигбрида следует каждую пару признаков учесть отдельно. Так как расщепление по каждой паре признаков происходит в отношении 3:1, можно ожидать, что из общего числа семян F_2 (1440) $3/4$ будут желтыми и $1/4$ зелеными. В нашем примере (табл. 15)

получено отношение 1075 (желтых) : 365 (зеленых), или 2,94 : 1, т. е. близкое 3 : 1. Подсчет числа гладких и морщинистых семян показывает, что и по этому признаку расщепление идет в отношении 3 : 1 (1080 : 360).

Полученные данные свидетельствуют о независимом наследовании двух пар признаков — окраски и формы семян гороха.

При этом гибридные семена второго поколения при дигибридном скрещивании по форме и окраске можно разделить на 4 группы: около $\frac{9}{16}$ семян F_2 будут желтые гладкие, около $\frac{3}{16}$ — желтые морщинистые, около $\frac{3}{16}$ — зеленые гладкие, $\frac{1}{16}$ — зеленые морщинистые. Таким образом, полученное расщепление близко к теоретически ожидаемому — 9 : 3 : 3 : 1.

Анализ гибридов при комплементарном взаимодействии генов

Задание. 1. Ознакомиться с комплементарным типом взаимодействия генов. 2. Изучить исходные (родительские) растения по рассматриваемому признаку. 3. Установить характер наследования признака в F_1 . 4. Установить характер наследования признака в F_2 ; выявить факт комплементарного взаимодействия генов. 5. Определить соответствие фактически полученного в F_2 расщепления теоретически ожидаемому.

Материал. 1. 20...40 растений или главных колосьев ячменя родительского сорта ГБ-18. 2. 20...40 растений или главных колосьев второго родительского сорта Винер. 3. 20...40 растений или главных колосьев гибридов первого поколения (F_1). 4. 80...100 и более растений или главных колосьев гибридов второго поколения (F_2).

Пояснения к заданию. При моно- и дигибридном скрещивании наблюдается взаимодействие аллельных генов. Однако в процессе развития организма происходит взаимодействие и неаллельных генов. Один из типов взаимодействия неаллельных генов — комплементарное действие генов. Комплементарными называют неаллельные гены, которые при совместном действии в гомозиготном или гетерозиготном состоянии вызывают развитие нового признака, отсутствовавшего у родителей. Например, две белоцветковые расы душистого горошка при их скрещивании дали растения F_1 с пурпурными цветками.

Во втором же поколении гибридов (F_2), полученном самоопылением F_1 , наблюдалось расщепление по окраске цветков на пурпурные и белые в отношении 9 : 7. Такой

тип наследования был объяснен следующим образом. Предположили, что каждая родительская форма несет разные доминантные неаллельные гены, оказывающие влияние на признак. Их генотипы можно записать как $AaBb$ и $aaBB$. Наличие в генотипе обоих доминантных генов как в гомо-, так и в гетерозиготном состоянии определяет появление пурпурной окраски цветков. Так как растения F_1 содержат оба доминантных гена ($AaBb$), то они имеют пурпурную окраску цветков. При самоопылении же в F_2 происходит расщепление таким образом: $\frac{9}{16}$ имеют оба доминантных гена (A и B), что обуславливает их пурпурную окраску, $\frac{6}{16}$ — по одному из двух доминантных генов (A или B) и $\frac{1}{16}$ — рецессивные гены, что обуславливает белую окраску цветков. Таким образом, $\frac{7}{16}$ растений имеют белую окраску цветков.

Такое объяснение экспериментально проверено и подтверждается при анализирующем скрещивании.

Для анализа комплементарного действия генов можно использовать 2 сорта ячменя — Голозерный безостый 18 (ГБ-18) селекции Л. Е. Ходькова и сорт Винер. Сорт ГБ-18 имеет безостый двухрядный колос. При скрещивании ГБ-18 с остистым сортом Винер растения F_1 имеют фуркатный колос, у которого вместо остей имеются трехлопастные придатки. В F_2 наблюдается расщепление на $\frac{9}{16}$ фуркатных, $\frac{3}{16}$ остистых и $\frac{4}{16}$ безостых.

Задание можно выполнять либо в поле во время легкой учебной практики, либо в лаборатории. Для занятий в лаборатории зимой готовят снопики из главных колосьев материнского и отцовского сортов, растений F_1 и F_2 . Для летних занятий растения родительских сортов и гибридов выращивают в гибридном питомнике на рядом расположенных делянках.

Выполнение задания. 1. Осмотреть колосья сорта ГБ-18 и убедиться в том, что колос у них безостый. 2. Осмотреть растения сорта Винер и убедиться, что колос у них остистый. 3. Осмотреть растения F_1 и убедиться, что они фуркатные — вместо остей на цветочных чешуях развиваются трехлопастные придатки.

4. Тщательно осмотреть растения F_2 и подсчитать число растений с фуркатными колосьями, с безостыми и остистыми. Данные занести в таблицу (табл. 16).

5. Вычислить теоретически ожидаемое и фактически полученное расщепление в F_2 по наличию и строению

остей. Рассмотрев полученные данные по характеру расщепления в F_2 , можно сделать вывод о комплементарном взаимодействии генов остистости у ячменя.

Таблица 16. Комплементарное взаимодействие генов у ячменя

Родительские сорта и гибриды	Число растений			Расщепление		
	всего	фуркатных	остистых	без-остых	теоретически ожидаемое	фактически полученное
♀ сорт ГБ-18	40	0	0	40	—	—
♂ сорт Винер	40	0	40	0	—	—
F_1 ГБ-18×Винер	20	20	0	0	—	—
F_2 ГБ-18×Винер	160	86	32	42	9 : 3 : 4	8,6 : 3,2 : 4,2

Полимерия

Задание. 1. Ознакомиться с понятием полимерия. 2. Изучить родительские растения кукурузы по числу рядов зерен в початках. 3. Изучить початки F_1 по числу рядов зерен. 4. Изучить початки F_2 по числу рядов зерен.

Материал. 1. 1...2 растения кукурузы материнского сорта. 2. 1...2 растения отцовского сорта. 3. 3...5 растений F_1 . 4. 10...20 растений F_2 .

Пояснения к заданию. Полимерией называется такое явление, при котором развитие данного признака обусловлено взаимодействием двух или нескольких пар однозначно действующих неаллельных генов. Такие гены называют полимерными или множественными и обозначают одной и той же буквой, но с разными цифровыми индексами. Например, при двух парах полимерных генов генотипы можно обозначить как $A_1A_1A_2A_2$ или $a_1a_1a_2a_2$, а двойная гетерозигота будет иметь генотип $A_1a_1A_2a_2$.

По данным Нильсона—Эле, открывшего явление полимерии в 1908 г., окраска зерна пшеницы обусловлена в ряде случаев двумя парами полимерных генов (рис. 16). Зерно с генотипом $A_1A_1A_2A_2$ будет красным, а с генотипом $a_1a_1a_2a_2$ — белым. Различие в интенсивности окраски зерен других генотипов обусловлено соотношением генов: чем больше доминантных генов, тем интенсивнее окраска.

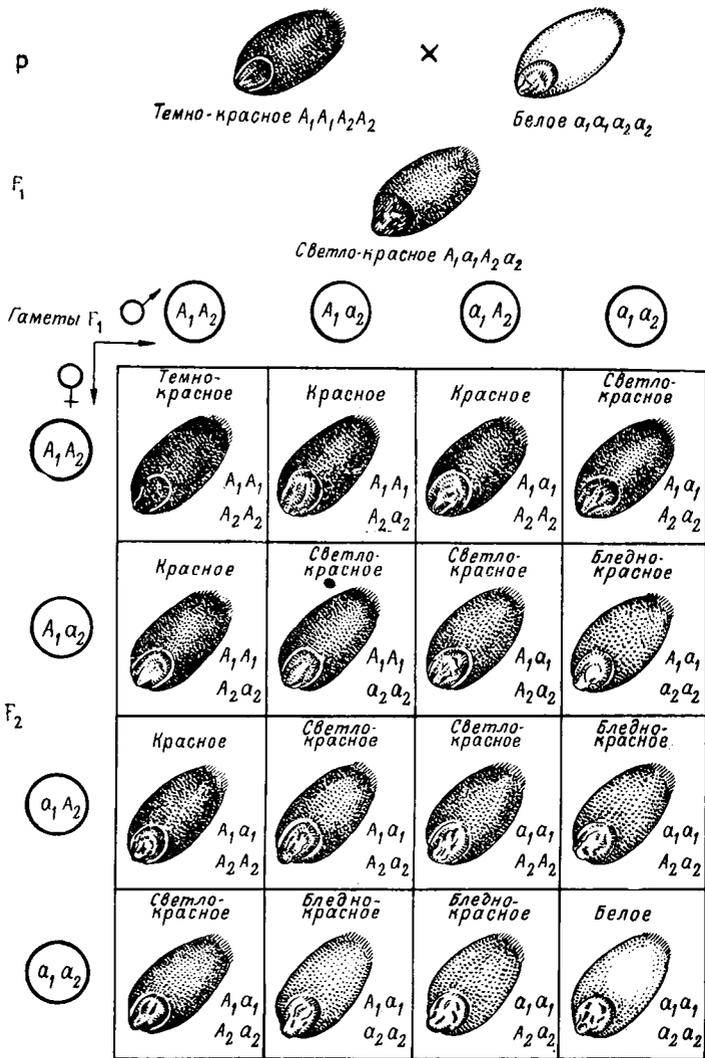


Рис. 16. Наследование окраски зерновки пшеницы при полимерном наследовании:

A_1 , a_1 и A_2 , a_2 — аллели двух полимерных генов, обуславливающих окраску семян (A_1 и A_2 — красную, a_1 и a_2 — белую)

В данном случае действие доминантных генов суммируется. Это так называемая кумулятивная полимерия.

Полимерия может быть некумулятивной, если каждый доминантный полимерный ген в отдельности оказывает такое же действие на развитие признака, как и сумма всех доминантных полимерных генов.

По типу полимерии наследуются такие хозяйственно важные признаки, как молочность скота, продолжительность вегетационного периода, длина колоса, длина початка кукурузы, число рядов зерен на початке и т. д. При полимерном наследовании признака нередко трудно в F_2 выявить четко различимые фенотипические группы: получается вариационный ряд изменчивости по данному признаку. Кроме того, изменчивость, вызванная полимерными генами, фенотипически трудноотличима от изменчивости модификационной, вызванной воздействием внешней среды, что затрудняет изучение полимерии.

Задание выполняется в лаборатории. Полученные данные вносят в таблицу (табл. 17).

Выполнение задания. 1. Осмотреть початки кукурузы материнского сорта с предполагаемым генотипом $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$. Сосчитать число рядов зерен на початке.

2. Осмотреть початки отцовского сорта с предполагаемым генотипом $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$. Сосчитать число рядов зерен на початке.

3. Сосчитать число рядов зерен у початков F_1 .

Т а б л и ц а 17. Анализ полимерного наследования числа рядов зерен на початке кукурузы

Родительские сорта и их гибриды	Осмотрено початков	Число рядов зерен						
		20	18	16	14	12	10	8
С ₁ × С ₂	6	6	—	—	—	—	—	—
F_1	6	—	—	—	—	—	—	6
F_1	10	—	—	—	10	—	—	—
F_2	65	1	6	15	21	14	7	1

4. Осмотреть початки F_2 , разделить их на группы по числу рядов. Данные внести в табл. 17. Сделать вывод о наличии или отсутствии полимерного наследования.

Анализ сцепления генов и составление генетических карт

Задание. 1. Ознакомиться с явлением сцепленного наследования. 2. Изучить исходные родительские растения кукурузы по анализируемым признакам окраски и формы зерна. 3. Изучить по этим же признакам растения F_1 . 4. Изучить растения F_2 по анализируемым признакам. 5. Установить характер наследования (наличие или отсутствие сцепления) изучаемых признаков. 6. Определить расстояние между изучаемыми генами.

Материал. 1. 1...2 початка гомозиготного растения кукурузы, имеющего окрашенные гладкие зерна. 2. 1...2 початка растения кукурузы, имеющего неокрашенные морщинистые семена. 3. 10...15 початков F_2 , полученных в результате анализирующего скрещивания.

Пояснения к заданию. Наблюдавшееся Бетсоном и Пеннетом отклонение от правила независимого комбинирования признаков у душистого горошка было объяснено в исследованиях Т. Г. Моргана на дрозофиле. Он установил, что независимое (менделевское) комбинирование признаков наблюдается в тех случаях, когда гены (например, A и B) локализованы в разных хромосомах.

Если же они расположены в одной хромосоме, то наследуются совместно, входят в одну группу сцепления. Такое полное сцепление часто нарушается в результате процесса кроссинговера. Так как частота (%) кроссинговера между двумя генами пропорциональна расстоянию между ними, определение этого расстояния сводится к определению частоты кроссинговера.

Для определения наличия сцепления и частоты кроссинговера проводят дигибридное анализирующее скрещивание, т. е. скрещивание дигибрида F_1 с формой, имеющей рецессивные признаки. У кукурузы для анализирующего скрещивания используют дигетерозиготу $CcSs$ (C — окрашенный эндосперм, c — неокрашенный, S — гладкий эндосперм, s — морщинистый). Результаты, полученные при таком скрещивании, вносят в таблицу (табл. 18).

В случае независимого комбинирования 2 генов при анализирующем скрещивании мы получили бы в F_2 по 25% каждого из 4 фенотипов. В данном же случае наблюдаются существенные различия в доле семян разных фенотипов, что свидетельствует о сцепленном наследовании. Расстояние между генами C и S определяется по суммарной доле рекомбинантов, т. е. кроссоверных

Таблица 18. Результаты кроссинговера в паре гомологичных хромосом у кукурузы по окраске и форме зерна

♀	♂	F ₁	Генотипы и фенотипы F _B (%)			
			не кроссоверные		кроссоверные	
$\frac{C S}{c s}$	$\frac{c s}{c s}$	$\frac{C S}{c s}$	$\frac{C S}{c s}$	$\frac{c s}{c s}$	$\frac{C s}{c s}$	$\frac{c S}{c s}$
Окрашенные гладкие	Не окрашенные морщинистые	Окрашенные гладкие	Окрашенные гладкие	Не окрашенные морщинистые	Окрашенные морщинистые	Не окрашенные гладкие
			48,2	48,2	1,8	1,8

зерен. В данном эксперименте кроссоверных зерен $1,8\% + 1,8\% = 3,6\%$. Так как в группах сцепления расстояние между генами выражается в процентах кроссинговера, то в этом случае расстояние между генами *C* и *S* (а также *c* и *s*) равно 3,6 единицы кроссинговера.

Статистическая обработка данных гибридологического анализа

Задание. 1. Ознакомиться со статистическим характером расщепления гибридов. 2. Научиться вычислять критерии соответствия χ^2 . 3. Определить соответствие фактического расщепления при моногибридном и дигибридном скрещивании теоретически ожидаемому. 4. Оценить влияние объема выборки на величину χ^2 .

Материал. 1. Данные по гибридологическому анализу при моногибридном и дигибридном скрещивании. 2. Таблица значений χ^2 (табл. 21).

Пояснения к заданию. Так как явление расщепления носит случайный характер, в экспериментальной работе возможно выявить соответствие фактически полученных в опыте данных теоретически ожидаемым соотношениям.

Чтобы оценить степень соответствия фактически полученных в опыте данных по расщеплению с теоретически ожидаемыми, в статистике используют метод хи-квадрат (χ^2). Вычислить χ^2 удобно пользуясь табл. 19 и 20, в которые вносятся данные по анализу моногиб-

ридного и дигибридного скрещиваний гороха. Порядок вычисления χ^2 виден из табл. 19 и 20*.

Таблица 19. Вычисления критерия χ^2 при моногибридном скрещивании гороха

Класс семян	Наблюдаемые данные O	Ожидаемые данные e	O - e	(O - e) ²	$\frac{(O - e)^2}{e}$
Желтые	110	116	-6	36	$\frac{36}{116} = 0,31$
Зеленые	44	38	6	36	$\frac{36}{38} = 0,95$
	$\Sigma = 154$	$\Sigma = 154$			$\Sigma = 1,26$

Зная значение χ^2 при моно- и дигибридном скрещивании, можно оценить статистическую достоверность расщепления в обоих случаях. Из формулы вытекает, что χ^2 будет тем меньше, чем меньше расхождение между фактически полученными и ожидаемыми данными (O—e). Указанное расхождение в одних случаях является результатом действия случайных причин, в других — характеризует действительно существующее различие между данными, теоретически ожидаемыми и полученными в опыте. Чтобы сделать правильный вывод о случайности или закономерности отклонения, полученные значения χ^2 сопоставляют с его значением в табл. 21.

Если полученное при расчете значение χ^2 не превышает значения его в таблице для соответствующей степени свободы, то различие между фактическими и теоретически ожидаемыми данными должно быть признано несущественным. Это свидетельствует о соответствии полученных в опыте данных теоретически ожидаемым. Если же χ^2 больше табличного, то в этом случае фактически полученные в опыте данные не соответствуют теоретически ожидаемым.

Критерий χ^2 вычисляют по формуле

$$\chi^2 = \sum (O - e)^2 / e = 0,31 + 0,95 = 1,26.$$

* Здесь и далее мы пользуемся символикой П. Ф. Рокицкого (Биологическая статистика. Минск, 1973).

Таблица 20. Вычисление критерия χ^2 при дигибридном скрещивании

Класс семян	Наблюдаемые данные O	Ожидаемые данные e при 9:3:3:1	$O - e$	$(O - e)^2$	$\frac{(O - e)^2}{e}$
Желтые круглые	516	540	-24	576	$\frac{576}{540} = 1,06$
Желтые морщинистые	192	180	12	144	$\frac{144}{180} = 0,80$
Зеленые гладкие	178	180	-2	4	$\frac{4}{180} = 0,02$
Зеленые морщинистые	74	60	14	196	$\frac{196}{60} = 3,27$
	$\Sigma = 960$	$\Sigma = 960$			$\Sigma = 5,15$

$$\chi^2 = \Sigma \frac{(O - e)^2}{e} = 5,15$$

Из табл. 21 следует, что величина χ^2 зависит от числа степеней свободы (df). Для уяснения понятия «степень свободы» достаточно привести простейший пример. Допустим, что имеется гибрид гороха, давший расщепление по окраске семян на 2 класса (фенотипа): 110 желтых семян и 44 зеленых. Их можно представить как сумму, в которой одно из слагаемых устанавливается свободно, а другое зависит от первого. В таком случае только одно слагаемое является свободным и, следовательно, степень свободы только одна. При трех фенотипических классах будет 2 степени свободы, при четырех — 3 степени свободы и т. д., при n классах $df = n - 1$.

Вероятность P в сельскохозяйственных исследованиях условно принимают равной 0,05. Это означает, что если вычисленное значение χ^2 не превышает табличного значения χ^2 , находящегося в графе с вероятностью 0,05, то фактически полученные данные соответствуют теоретически ожидаемым*.

* Метод χ^2 неприемлем, если число особей в каком-либо из теоретически рассчитанных классов меньше 5.

Таблица 21. Значения χ^2 при разных степенях свободы (по П. Ф. Рокитскому, с сокращением)

Число степеней свободы df	Вероятность P									
	0,99	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01
1	—	—	0,02	0,10	0,45	1,32	2,71	3,84	5,02	6,63
2	0,02	0,10	0,21	0,58	1,39	2,77	4,61	5,99	7,38	9,21
3	0,11	0,35	0,58	1,21	2,37	4,11	6,25	7,81	9,35	11,34
4	0,30	0,71	1,06	1,92	3,36	5,39	7,78	9,49	11,14	13,28
5	0,55	1,15	1,61	2,67	4,35	6,63	9,24	11,07	12,83	15,09
6	0,87	1,64	2,20	3,45	5,35	7,84	10,64	12,59	14,45	16,81
7	1,24	2,17	2,83	4,25	6,35	9,04	12,02	14,07	16,01	18,48
8	1,65	2,73	3,49	5,07	7,34	10,22	13,36	15,51	17,53	20,09
9	2,09	3,33	4,17	5,90	8,34	11,39	14,68	16,92	19,02	21,67
10	2,56	3,94	4,87	6,74	9,34	12,55	15,99	18,31	20,48	23,21

Если вычисленное значение χ^2 больше табличного значения, соответствующего вероятности 0,05, то фактически полученные данные не соответствуют теоретически ожидаемым и отклонение не случайно.

В рассмотренном выше примере при моногибридном скрещивании гороха χ^2 равен 1,26. Так как число классов (фенотипов) в этом случае равно двум (желтые и зеленые семена), то число степеней свободы df равно 1 (2—1). Из табл. 21 следует, что значение χ^2 , равное 1,26, соответствует вероятности 0,25, т. е. находится левее графы с вероятностью 0,05. Это означает, что фактически полученное расщепление вполне соответствует теоретически ожидаемому отношению 3 : 1. При дигибридном скрещивании вычисленное значение χ^2 равно 5,15 (см. табл. 20), число степеней свободы равно 3 (4—1). Из табл. 21 следует, что такое значение χ^2 также находится левее графы с вероятностью 0,05 (между $P = 0,10$ и $P = 0,25$). Это значит, что фактически полученное расщепление соответствует отношению 9 : 3 : 3 : 1.

Выше отмечалось, что величина χ^2 зависит от величины отклонения между фактически полученными и теоретически ожидаемыми величинами. Но и при одинаковых отклонениях величина χ^2 может оказаться различной в зависимости от величины выборки. Выборкой, или выборочной совокупностью, называется часть генеральной совокупности. Генеральная же совокупность включает теоретически всю совокупность особей, семян и т. д.

Зависимость χ^2 от величины выборки (числа проанализированных семян) видна из табл. 22.

Следовательно, при одинаковых отклонениях величина χ^2 значительно больше при малой выборке. При числе степеней свободы, равном при моногибридном расщеплении 1 (см. табл. 19), значение $\chi^2 = 1,257$ меньше табличного значения при вероятности 0,05. Значение же $\chi^2 = 4,36$ больше табличного значения χ^2 при той же вероятности 0,05. Это значит, что в первом случае при большой величине выборки фактически полученное расщепление вполне соответствует теоретически ожидаемому отношению (3 : 1). Во втором же случае при меньшей величине выборки фактически полученное расщепление не соответствует теоретически ожидаемому (3 : 1).

Т а б л и ц а 22. Зависимость χ^2 от величины выборки при моногибридном скрещивании гороха

Показатель	154*		44*	
	желтых	зеленых	желтых	зеленых
Число семян:				
фактически полученных O	110	44	27	17
теоретически ожидаемых при отношении 3 : 1 (ϵ)	116	38	33	11
Отклонение: $O - \epsilon$	-6	+6	-6	+6
$(O - \epsilon)^2$	36	36	36	36
$\frac{(O - \epsilon)^2}{\epsilon}$	0,31	0,947	1,09	3,27

$$\chi_1^2 = \sum \frac{(O - \epsilon)^2}{\epsilon} = 0,31 + 0,947 = 1,257$$

$$\chi_2^2 = \sum \frac{(O - \epsilon)^2}{\epsilon} = 1,09 + 3,27 = 4,36$$

* Величина выборки (число семян).

Отсюда вытекает необходимость для более четкого установления характера расщепления у гибридов анализировать большие выборки, т. е. большее число семян, растений.

Выполнение задания. Для выполнения настоящего задания необходимо использовать данные по моно- и дигибриднему скрещиванию.

В табл. 19 учащиеся вносят данные, полученные одним студентом в результате анализа растений F_2 при моногибридном скрещивании гороха, а также данные, полученные всей группой студентов, и вычисляют χ^2 для обоих случаев. Сравнивают обе величины χ^2 и убеждаются в том, что при большей выборке фактически полученное расщепление ближе к теоретически ожидаемому, чем при малой выборке.

Таким же образом, по данным одного студента и группы студентов, вычисляют величины χ^2 при дигибридном скрещивании (табл. 20). При анализе расщепления в F_2 соответствующие значения χ^2 сравнивают с их табличным значением и делают вывод о случайном или закономерном характере полученных отклонений.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Изменчивость проявляется в некоторых различиях между особями различных поколений и между родственными особями одного поколения. Изменчивость может быть наследственной (генотипической) и ненаследственной (модификационной). Генотипическая изменчивость может быть обусловлена рекомбинацией генов при гибридизации (см. с. 73), структурным изменением гена или хромосомы (мутация) или изменением числа хромосом (полиплоидия). Модификационная изменчивость возникает под влиянием условий внешней среды и является следствием адаптивной (приспособительной) реакции растения на изменяющиеся условия произрастания. Размах модификационной изменчивости, присущий данному сорту, определяется генотипом и называется нормой реакции.

МУТАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Мутациями называют наследственные изменения у отдельных особей, в результате которых организм приобретает новые признаки и свойства. Мутационные изменения могут затрагивать любые признаки и свойства организма.

Мутации могут быть спонтанными (возникающими в природе) и индуцированными, которые вызывает человек, воздействуя различными факторами, называемыми мутагенами. Различают следующие типы мутаций.

1. Генные мутации — наследственные изменения, ведущие к появлению новых аллелей и не связанные с цитологически доказуемыми перестройками хромосом.

2. Хромосомные мутации — изменения структуры хромосом вследствие их разрывов и перестроек.

3. Геномные мутации — кратные изменения целых хромосомных наборов (полиплоидия) или изменения числа хромосом в них (анеуплоидия).

4. Плазмонные мутации — изменения цитоплазматических наследственных компонентов.

Методы получения мутаций

Задание. 1. Ознакомиться с различными методами получения мутаций у растений. 2. Обработать мутагеном семена ячменя сорта Винер.

Материал и оборудование. 1. Семена ячменя сорта Винер. 2. Мутаген этиленмин. 3. Вытяжной шкаф. 4. Сосуд для обработки семян мутагеном.

Пояснения к заданию. Для успешного получения мутаций важно подобрать оптимальные для процесса мутирования условия (вид мутагена, его доза, физиологическое состояние организма и т. д.). Повышенные дозы мутагенов (как физических, так и химических) снижают долю хозяйственно-ценных мутаций. Оптимальные дозы мутагена специфичны не только для различных видов растений, но и для отдельных сортов.

Чаще всего воздействуют мутагеном на семена. Первое поколение растений, полученное из обработанных любым мутагеном семян, обозначается M_1 , второе поколение — M_2 и т. д. Методика получения мутаций дана в табл. 23.

Работать следует очень осторожно в вытяжном шкафу, так как мутагены представляют собой сильные яды. Обработываемых семян в каждом варианте должно быть столько, чтобы в поле выжило около 1000 растений.

Растения M_1 , выращенные из обработанных мутагеном семян, часто угнетены, частично или полностью стерильны, но среди них встречаются и внешне вполне нормальные. Для растений M_1 следует создавать наиболее благоприятные условия. Отбирают ценные мутанты во втором поколении (M_2), так как большинство мутаций, будучи рецессивными, выявляются лишь в M_2 .

У пшеницы, ячменя и других злаков в M_1 растения могут быть химерными, а колосья — генетически различными, и потому для получения семей M_2 семена каждого колоса M_1 высевают отдельно. Семена выявленных в M_2 мутантных растений высевают отдельно для проверки наследования измененных признаков в M_3 .

Таблица 23. Некоторые методы получения мутаций у растений

Культура	Метод обработки	Источник
Кукуруза	Семена в марлевых мешочках выдерживают в растворе этиленimina (0,05%-ном) в течение 24 ч, промывают (15..20 мин) в чистой воде и сразу высевают в поле	Лысиков В. Н., Бляндур О. В. Супермутагены. М., Наука, 1966
Картофель	Клубни обрабатывают: нитрозометилмочевинной в концентрации 0,012; 0,01; 0,006%, N-нитрозэтилмочевинной в концентрации 0,05; 0,016; 0,012%, диметилсульфатом в концентрации 0,05; 0,016; 0,25%. Во всех случаях время обработки 24 ч	Веселовский И. А., Храбров С. Е. — Генетика, № 8, 1966
Горох	Семена в марлевых мешочках помещают на 11..12 ч в растворы мутагенов (этиленимин), диэтилсульфат, диметилсульфат следующих концентраций: 0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,30%. Семена промывают 10..15 мин в сосуде и далее в водопроводной воде	Соболев Н. А. Супермутагены. М., Наука, 1966
Ячмень	Семена помещают в марлевые мешочки и замачивают в нитрозометилмочевине в концентрации 0,01; 0,008% в течение 18 ч, затем их подсушивают и высевают	Никифорова И. Л. Химический мутагенез и селекция. М., 1971
Томаты	Семена в марлевых мешочках замачивают в нитрозэтилмочевине в концентрации 0,05 или 0,025% в течение 18 ч, подсушивают и высевают в теплице Нижнюю часть неукорененных черенков погружают в 0,02 0,04%-ный раствор этиленimina. Время обработки до поглощения 0,4..0,5 мг мутагена на 1 г массы черенка 10..24 ч. Далее промывка и укоренение в почве	Виденин К. Ф., Родионов В. К. Химический мутагенез и селекция. М., 1971 Жданов Н. В. Химический мутагенез. М., 1974

Для обнаружения так называемых малых мутаций, т.е. мутаций по количественным признакам, часто фенотипически не отличимых, семена отдельных растений M_2 высевают для получения M_3 , а затем растения M_3 подвергают биометрической обработке по соответствующим показателям. В результате этого удается выделить малые мутации, которые имеют большую ценность, так как они касаются таких количественных признаков, как урожайность, белковость, масличность и др. Отбирают лучшие по малым мутациям семьи, начиная с M_4 . Желательно в M_2 иметь 400...500 семей. Семян, подвергаемых воздействию мутагена, должно быть в 2...3 раза больше, чем семей в M_2 , поскольку растения в M_1 частично гибнут.

Мутабельность сортов различна и зависит от их наследственных особенностей. В качестве исходного материала для получения хозяйственно-ценных мутаций рекомендуется использовать районированные сорта.

В работах Н. Н. Зоз с мягкими пшеницами появились такие формы с рецессивными признаками, как компактоиды, эректоиды, скверхеды, крупноколосые, спельтоиды, рыхлоколосые, остистые, безостые, полустистые, раннеспелые, позднеспелые и др.

Выполнение задания. 1. Отобрать из семян суперэлиты ячменя сорта Винер 3 пробы по 500 зерен.

2. Приготовить растворы мутагена N-нитрозометилмочевины 2 концентраций — 0,01 и 0,008%.

3. Поместить две порции семян в раствор мутагена соответствующей концентрации, третью — замочить в воде.

4. Через 18 ч семена промыть в проточной воде и подсушить.

5. Семена всех вариантов одновременно высеять в поле.

6. Данные об обработке семян следует занести в таблицу (табл. 24).

Т а б л и ц а 24. Обработка семян N-нитрозометилмочевинной

Культура, сорт	Воздействие мутагена при концентрации			Продолжительность обработки, ч	Примечания
	0,008%	0,01%	Вода		
Ячмень Винер				18	

Т а б л и ц а 25. Частота рецессивных мутаций в M_2 мягкой пшеницы после воздействия химическими мутагенами, %

Сорт	Воздействие раствором							
	N-нитрозоэтилмочевинны при концентрации			этиленimina при концентрации				
	0,05%	0,07%	0,1%	0,04%	0,05%	0,06%	0,08%	0,1%
Украинка	39,6	30,8	20,5	10,0	12,5	—	—	—
Белоцерковская 198	53,3	—	11,0	10,9	22,9	28,0	27,0	18,9
Московская 2453-	50,0	45,7	—	—	—	10,4	16,0	24,9
ППГ 599	56,2	26,8	28,9	17,0	8,7	19,5	33,0	25,0
ППГ 186	33,6	48,4	78,9	21,8	25,1	26,9	31,5	16,0
ППГ 1723	25,0	—	—	16,0	22,1	12,8	—	—

Данные табл. 25 свидетельствуют о том, что различные сорта пшеницы дают различную частоту мутаций при одинаковых концентрациях мутагена.

Изучение структурных изменений хромосом

Задание. 1. Ознакомиться с типами структурных изменений хромосом и методами их изучения. 2. Определить митотическую активность в меристеме корешков лука-багуна после обработки мутагеном и сравнить с контролем. 3. Установить наличие и процент aberrаций хромосом у мутантов. 4. Определить типы aberrаций.

Материал и оборудование. 1. Препараты срезов корешков лука-багуна (контрольных и с хромосомными aberrациями). 2. Микроскоп, рисовальный аппарат.

Пояснения к заданию. Структурным изменениям хромосомы предшествует ее разрыв, при котором получаются два «клеяких» конца. Такие «клеякие» концы способны соединиться с любым другим (но только «клеяким») концом. Если соединяются концы, возникшие при одном разрыве, восстанавливается целостность хромосомы — структурных изменений не происходит. В случае же соединения концов, возникших при разных разрывах, получается новое сочетание участков хромосом, т. е. появляются структурные изменения хромосом.

Характер хромосомных aberrаций зависит от состояния хромосомы в момент воздействия мутагенного фактора. Если хромосома находится в состоянии оди-

ночной нити (период G_1 интерфазы, анафаза, а также телофаза митоза), то в период S интерфазы она удваивается и aberrация сохраняется в обеих хроматидах, т. е. возникают хромосомные aberrации.

Если мутаген действует на хромосому, находящуюся в состоянии двойной нити (период S и G_2 интерфазы, профазы и метафаза митоза), aberrация может произойти в каждой нити отдельно. В этом случае возникают так называемые хроматидные aberrации.

Различают внутри- и межхромосомные aberrации. К внутрихромосомным относятся делеции, инверсии и дупликации (рис. 17).

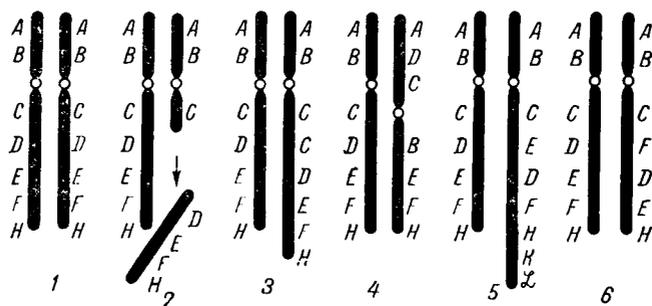


Рис. 17. Типы внутрихромосомных aberrаций (перестроек):

1 — исходная пара гомологичных хромосом; 2 — делеция — потеря участка $DEFH$; 3 — дупликация участка C ; 4 — инверсия участка BCD ; 5 — транслокация участка KL ; 6 — инсерция участка DEF

Делеция (нехватка) — выпадение участка хромосомы, содержащего один или несколько генов. В случае утери хромосомой концевой участка возникает концевая делеция — дефиценсия, при утере внутреннего участка — интерстициальная делеция.

Инверсия возникает в результате разрыва хромосомы в двух местах одновременно с сохранением внутреннего участка, который воссоединяется с поворотом на 180° . Инверсия может быть парацентрической, если оба разрыва происходят в одном плече хромосомы, или перичцентрической, если разрыв происходит по обе стороны от центромеры (в обоих плечах одновременно).

Дупликация — удвоение одного и того же участка хромосомы содержащего одни и те же гены.

Межхромосомными aberrациями называют структурные изменения, затрагивающие одновременно две

или более негомологичные хромосомы. К таким структурным изменениям хромосомы относятся транслокации.

Транслокация — обмен участками между негомологичными хромосомами.

Изучение хромосомных aberrаций можно проводить двумя методами — метафазным и анафазным. Метафазный метод заключается в анализе aberrаций в метафазе



Рис. 18. Анафаза митоза в меристематической клетке зародышевого корешка ячменя после воздействия мутагена (образование моста)

митоза. Он довольно точен, но в связи с тем, что у многих растений хромосомы распознавать в метафазе трудно, его используют лишь для объектов, имеющих четко различные хромосомы, например скерды (*Crepis capillaris*). Анафазный метод предусматривает анализ хромосомных aberrаций в анафазе митоза. Чаще всего они представляют собой мосты (рис. 18) и фрагменты. Их образование можно, например, представить так, что при разрыве обеих хроматид в результате репликации образуются две сестринские хромосомы с разрывом в одном и том же месте. В дальнейшем при соединении концов сестринских хромосом, как правило, получаются две новые хромосомы: одна без центромеры (ацентрическая), другая с двумя центромерами (дичентрическая). В анафазе

митоза дицентрическая хромосома одновременно тянется к обоим полюсам, образуя мост. Ацентрическая хромосома (фрагмент) располагается случайно и в дальнейшем элиминируется. В описанном случае происходят дупликация и деления одновременно. Если в анафазе образуются не мосты, а лишь бесцентромерные фрагменты, значит, налицо структурные изменения типа делений. Удобный объект для изучения хромосомных aberrаций — проросшие семена лука-батуна, ячменя и других растений, предварительно обработанные химическими мутагенами или облученные γ -лучами в соответствующей дозе.

Изучение хромосомных aberrаций следует проводить в самом начале прорастания корешков, на первых митотических делениях клеток меристемы.

Выполнение задания. 1. Семена лука-батуна замачивают на 50 ч при температуре 24° С. К этому времени корешки обычно достигают длины 5 мм.

2. Часть проросших семян облучают γ -лучами в соответствии с вышеописанной методикой. Через 20 ч их фиксируют и готовят давленные препараты для анализа клеток на первых митозах.

3. Другую часть семян с проросшими корешками фиксируют уксусным алкоголем, окрашивают ацетокармином и готовят давленные препараты.

4. Определить общее число анафаз с aberrациями, а также типы aberrаций на 5 препаратах, не менее чем в 10...20 полях зрения в каждом.

5. Полученные данные следует занести в таблицу (табл. 26).

Т а б л и ц а 26. Частота и тип перестроек хромосом

Мутаген, доза, концентрация, %	Тип aberrаций					Общее число анализированных	Анафазы с перестройками	
	Мосты	Мост с одним фрагментом	Мост с двумя фрагментами	Одиночные фрагменты	Пары фрагментов		Число	%
Контроль Этиленмин 0,01	4	0	0	27	7	884	33	3,7 ± 0,63
	12	2	1	141	25	893	135	15,1 ± 1,20

6. Сравнить митотическую активность в меристеме корешков после обработки мутагенами и без обработки (методику см. с. 11).

Описание мутантов

Задание. 1. Ознакомиться с типами индуцированных мутантов.
2. Описать мутанты ячменя в M_1 и M_2 в сравнении с нормальными растениями данного сорта.

Материал. 1. Растения ячменя M_1 . 2. Растения ячменя M_2 .
3. Растения исходного сорта.

Пояснения к заданию. В результате воздействия на ячмень химическими и другими мутагенами могут возникнуть разнообразные мутации; это могут быть



Рис. 19. Мутанты пшеницы сорта Белоцерковская 198:
1 — исходный сорт Белоцерковская 198; 2, 3, 4 — мутанты этого сорта

хлорофилльные изменения различного типа (например, *albina* — листья лишены зеленой окраски, *xantha* — золотистая окраска листьев, *striata* — на листьях имеются светлые бесхлорофилльные полосы, *maculata* — на листьях светлые бесхлорофилльные пятна); изменения морфологических признаков — появление среди двурядных ячменей мутаций с многорядным колосом, у пшеницы — изменения длины остей, окраски колоса, его плотности (рис. 19) и т. д. Изменения могут касаться

и таких признаков, как устойчивость к полеганию, к болезням, скороспелость, продуктивность растений, масса 1000 зерен и т. д.

Хлорофилльные мутанты можно иногда наблюдать уже в M_1 . Другие мутации можно чаще обнаружить в M_2 и M_3 . Описание мутантов ячменя в M_1 , M_2 и M_3 и т. д. можно дать в виде таблицы (табл. 27).

Таблица 27. Спектр мутирования ярового ячменя в M_2
(мутаген — этиленмин 0,05%-ный)

Сорт	Число измененных растений, % от числа просмотренных		Типы новообразований, % к числу мутировавших растений							
			по строению соломины			по колосу			по длине вегетационного периода	
	семян	растений	высокорослые	низкорослые	с толстой соломиной	с высокой плотностью	стерильные	многократные	позднеспелые	скороспелые
Винер	6,2	0,7	6	17	29	16	2	4	22	4

Выполнение задания. Выявление мутаций требует очень тщательного просмотра каждого растения на корню, а также подробного анализа растений в лаборатории.

ПОЛИПЛОИДИЯ

Каждому виду растений и животных свойственно определенное число хромосом. Однако в результате нарушения клеточного деления число хромосом может измениться. Явление изменения числа хромосом в клетке называется полиплоидией, а полученные растения — полиплоидами. Если набор хромосом увеличивается кратно гаплоидному числу, то такое явление называется аутополиплоидией. Например, аутополиплоидом будет тетраплоидная рожь ($4n = 28$), тетраплоидная гречиха ($4n = 32$), триплоидная сахарная свекла ($3n = 27$) и т. д.

Аллополиплоидом (аллоплоидом) называется полиплоидный организм, полученный в результате умножения наборов хромосом межвидовых или межродовых гибридов. Если удвоены гаплоидные наборы хромосом двух видов или родов, то такие аллополиплоиды называют амфидиплоидами (АД). Например, ржано-пшеничный амфидиплоид (АД) имеет 56 хромосом: 42 хромосомы мягкой пшеницы (21×2) и 14 хромосом ржи (7×2).

Растения, у которых число хромосом не кратно гаплоидному, называются анеуплоидами, или гетероплоидами; в их клетках содержится на 1, 2, 3 и т. д. хромосом больше или меньше диплоидного набора.

Например, у анеуплоидов мягкой пшеницы число хромосом может быть 40 или 41 вместо $2n = 42$.

Изменение числа хромосом вызывает у растений изменение морфологических признаков и биологических свойств. Например, у тетраплоидных растений гречихи клетки, листья, плоды, семена крупнее, чем у растений исходного диплоидного сорта.

Методы получения полиплоидов у растений

Задание. 1. Ознакомиться с наиболее широко применяемыми методами получения полиплоидов. 2. Провести колхицинирование проростков ржи. 3. Высадить полученные проростки в ящики. 4. Подсчитать число хромосом на временных или постоянных препаратах, приготовленных из точек роста проростков.

Материал и оборудование. 1. Семена ржи. 2. Чашка Петри диаметром 8...10 см. 3. Раствор колхицина (концентрация 0,25%). 4. Ящик с почвой. 5. Микроскоп. 6. Препарат (постоянный или временный), приготовленный из точки роста проростка, выросшего из колхицинированного семени.

Пояснения к заданию. Методов получения полиплоидных растений довольно много. Большая часть методов основана на использовании колхицина — вещества из группы алкалоидов. Добывают его из растения — безвременника осеннего (*Colchicum autumnale* L.). Слабые растворы этого вещества парализуют процесс образования тянущих нитей веретена. Поэтому в митозе хромосомы не расходятся к полюсам, клетка не делится, и образуется ядро с удвоенным ($2n \times 2$) набором хромосом. Если на образовавшиеся тетраплоидные клетки продолжать воздействие колхицином, то могут возникнуть октоплоидные клетки. Но обычно такое увеличение числа хромосом снижает жизнеспособность клеток и может привести их к гибели.

Для получения полиплоидов используют 0,1...0,25%-ный водный раствор колхицина, которым обрабатывают прорастающие семена или верхушки молодых побегов, находящиеся в состоянии интенсивного деления клеток.

Следует избегать попадания раствора колхицина на корни, так как это ослабляет растения.

При обработке растений с длинным подсемядольным коленом (например, проростки гречихи) используют следующий метод. В чашке Петри на фильтровальной бумаге проращивают семена, разложив их по периметру чашки. Когда проростки достигнут длины 4...6 см, чашку с проростками вставляют в другую, большего диаметра, в которую наливают 0,05%-ный раствор колхицина. Проростки пригибают таким образом, чтобы семядоли и конус нарастания находились в растворе колхицина, налитого в чашку большего диаметра. Через 12...24 ч их вынимают, прополаскивают в воде и сажают в почву.

Полиплоидные растения можно получать и другим методом. На молодые проростки, почки, побеги накладывают ватный тампон, смоченный колхицином. Для этого пинцетом осторожно отодвигают в стороны молодые листочки и между ними вкладывают как можно глубже ватный тампон, чтобы он находился в непосредственной близости от точки роста. Лучше всего тампон вкладывать вечером и следить, чтобы он все время находился во влажном состоянии. Ежедневно тампон смачивают раствором колхицина. Через 2...5 дней вату снимают и верхушки побегов промывают водой. Рост обработанных побегов приостанавливается, они сильно утолщаются, появляются толстые мясистые листья. Через 2...4 нед рост побега возобновляется.

При колхицинировании значительная часть растений погибает; это нужно учитывать и брать для опыта семена и проростки в достаточном количестве.

Полиплоиды можно получать также с помощью аценафтена. Он действует слабее, не вызывает у обработанных побегов такой сильной депрессии в росте, как колхицин. Аценафтен слабо растворим в воде, поэтому растения обрабатывают им следующими способами.

1. Семена покрывают влажной фильтровальной бумагой, на которую сверху насыпают порошок аценафтена. Семена выдерживают таким образом 2...4 дня, а затем высаживают в поле.

Т а б л и ц а 28. Методы получения полиплоидов с помощью колхицина

Метод	Процесс обработки	Примечания
<p>Проращивание семян в растворе колхицина 0,05...0,30%</p>	<p>Сухие или предварительно замоченные до набухания в воде семена проращивают в растворе колхицина в течение 3...10 дней (сухие) или 4...48 ч (наклонувшиеся). Затем семена промывают в воде и высаживают в грунт</p>	<p>Сильно повреждаются зародышевые корни. Метод применим при наличии большого количества семян</p>
<p>Обработка проростков раствором колхицина в концентрации 0,01...0,25%</p>	<p>Проростки ржи, пшеницы, ячменя и других злаков, а также клевера, гречихи, льна погружают верхушками в раствор колхицина на 0,5...4 ч. Растения укрепляют на сетке корнями вверх. Корни покрывают влажной фильтровальной бумагой. Обработанные проростки промывают водой и высаживают в грунт</p>	<p>Обеспечивается хорошая приживаемость растений. Успешно применяют при полиплоидизации семян отдаленных гибридов</p>
<p>Обработка конуса нарастания побега раствором колхицина в концентрации 0,2...0,5%</p>	<p>На верхушечную почку побега наносят пипеткой раствор колхицина в течение 5...7 ч. Можно накладывать ватные тампоны, смоченные раствором колхицина, в течение 3...5 сут. Затем верхушечную почку промывают водой</p>	<p>Успешно применяют при работе с картофелем, многолетними двудолными растениями</p>
<p>Трансплантационный метод. Раствор колхицина в концентрации 0,1...0,2%</p>	<p>Побег срезают и помещают срезанную часть стебля в сосуд с раствором колхицина на 2...5 сут. Затем побег прививают на подвой, не обработанный колхицином</p>	<p>Используют для бобовых и других культур. Подвой обеспечивает нормальный рост и развитие колхицинированного побега</p>
<p>Воздействие колхицином в концентрации 0,01...0,2% на корни растений</p>	<p>Молодые растения выкапывают, корни отмывают и погружают в раствор колхицина на 12 ч, затем на 6...12 ч в проточную воду и так чередуют обработку с промывкой в течение 3...7 сут. Затем растения высаживают в грунт</p>	<p>Успешно применяют при работе со злаковыми, гречихой, томатами и др.</p>

Метод	Процесс обработки	Примечания
Воздействие колхицином в концентрации 0,01...0,025% на срезанные соцветия	Побег срезают в период заложения спорогенной ткани, стбель расщепляют и помещают в раствор колхицина на 5...7 сут, после чего основание побега тщательно промывают и помещают в слабый водный раствор, содержащий необходимые питательные вещества	Свекла, крестоцветные и другие культуры
Инъекция раствором колхицина концентрации 0,025...0,1%	Медицинским шприцем в узел кушения или корневую шейку вводят раствор колхицина. Обработку повторяют в течение нескольких дней	Успешно применяют при работе со злаковыми и другими культурами

2. Молодые сеянцы, выращенные в горшках в теплице, прикрывают химическим стаканом, смазанным внутри ланолином, на который насыпано 2...4 г аце-нафена. Через день стакан снимают.

Наиболее широко применяемые методы получения полиплоидов у различных видов культурных растений приведены в табл. 28. Для получения тетраплоидных растений ржи можно использовать метод проращивания семян в растворе колхицина.

Выполнение задания. 1. В чашке Петри на фильтровальной бумаге прорастить в течение 2...3 дней семена ржи районированного сорта.

2. Когда колеоптиль достигнет 2...4 мм длины, поместить проростки в 0,1...0,25%-ный водный раствор колхицина. Для этой цели в чистую чашку Петри, имеющую диаметр на 1...2 см меньше, чем фильтровальная бумага, на которой проращиваются семена, наливают раствор колхицина.

Бумагу с проростками вынимают из чашки Петри и перевертывают таким образом, чтобы верхушки проростков оказались в растворе колхицина; корни прикрывают сверху бумагой, чтобы они не высохли.

3. Через 2 ч проростки вынуть из раствора колхицина, промыть дистиллированной водой, высадить в ящик и поставить в теплицу.

4. Через 30 дней отобрать тетраплоидные растения. Они отличаются толстыми мясистыми листьями, неправильными искривленными побегами.

5. Подсчитать число хромосом в кончике листа побега и проверить плоидность отобранных растений на временных или постоянных препаратах, приготовленных по обычной цитологической методике (см. с. 19). Определение числа хромосом в клетках диплоидного и тетраплоидного растений может быть темой самостоятельного занятия.

Изучение микроспорогенеза и описание пыльцы у диплоидной и тетраплоидной ржи

Задание. 1. Приготовить временные ацетолакмоидные или ацетокарминовые препараты из пыльников диплоидной и тетраплоидной ржи, находящейся на VI и VII этапах органогенеза. 2. Изучить микроспорогенез у диплоидной и тетраплоидной ржи. 3. Измерить и описать пыльцевые зерна ди- и тетраплоидной ржи.

Материал и оборудование. 1. Зафиксированные по Карнуа и хранящиеся в 70%-ном спирте колосья ди- и тетраплоидной ржи (часть колосьев должна быть зафиксирована во время микроспорогенеза, часть — за 1 день до цветения). 2. Ацетокармин. 3. Микроскоп с окуляр-микрометром. 4. Предметные и покровные стекла. 5. Пинцет. 6. Стеклянная палочка. 7. Спиртовка. 8. Фильтровальная бумага. 9. Рисовальный аппарат.

Пояснения к заданию. У тетраплоидных растений наблюдаются нарушения в ходе мейоза. У диплоидов в хромосомном наборе материнской клетки микроспоры каждая хромосома имеет своего гомолога, с которым она и конъюгирует, образуя бивалент. У тетраплоидов в клетках содержится 4 гомологичные хромосомы, поэтому процесс конъюгации пар хромосом в профазе мейоза у них протекает не всегда нормально. При этом конъюгируют 3 или 4 гомологичные хромосомы (вместо 2 гомологичных), либо конъюгация отсутствует, в результате чего после мейоза образуются микроспоры, содержащие гаплоидное число хромосом. Нарушение мейоза у тетраплоидных растений довольно часто обуславливает образование нежизнеспособных пыльцевых зерен и зародышевых мешков, поэтому у них снижается семенная продуктивность. Но часть пыльцевых зерен получается нормальной, жизнеспособной. Они значительно крупнее, чем пыльцевые зерна исходных диплоидных форм (рис. 20).

У триплоидных растений, которые обычно получают при скрещивании тетраплоидов с диплоидами, в хромосомных наборах археспориальных клеток содержится по 3 гомологичные хромосомы. У таких растений еще чаще, чем у тетраплоидов, происходит нарушение мейоза и образуются нежизнеспособные микроспоры, поэтому триплоиды частично фертильны, а иногда бесплодны. В связи с этим при выращивании тетраплоидных

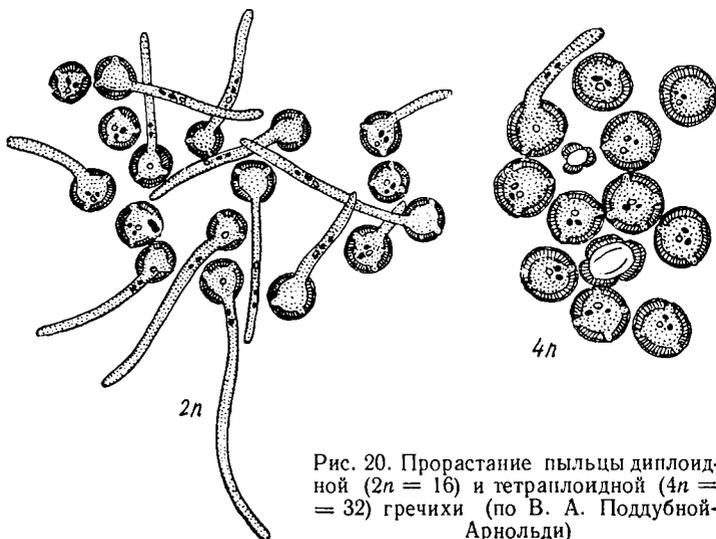


Рис. 20. Проращение пыльцы диплоидной ($2n = 16$) и тетраплоидной ($4n = 32$) гречихи (по В. А. Поддубной-Арнольди)

растений для получения семенного материала следует тщательно соблюдать пространственную изоляцию их от диплоидных растений того же вида.

Выполнение задания. 1. Пинцетом из зачаточного колоса тетраплоидной ржи на VI этапе органогенеза извлечь по одному пыльнику из цветков, расположенных в нижней, средней и верхней частях колоса.

2. Положить пыльники на предметное стекло, раздавить их стеклянной палочкой и удалить все лишние ткани.

3. На полученный мазок нанести каплю ацетокармина, накрыть покровным стеклом и слегка подогреть на спиртовке (не доводя до кипения). Аналогичным образом приготовить ацетокарминовый препарат из пыльников диплоидной ржи.

4. Рассмотреть каждый препарат под микроскопом и зарисовать все фазы мейоза. Особое внимание следует обратить на наличие в анафазах I и II делений отстающих одиночных хромосом и на образование добавочных микроядер в диадах, тетрадах и полиадах микроспор.

5. Приготовить ацетокарминовые временные препараты из зрелых пыльников ди- и тетраплоидной ржи.

6. Подсчитать под микроскопом в трех-четырех полях зрения у ди- и тетраплоидных растений число жизнеспособных пыльцевых зерен (жизнеспособные пыльцевые зерна содержат вегетативное ядро и 2 спермия). Записать полученные данные в табл. 29.

7. Пользуясь окуляром-микрометром, измерить диаметр жизнеспособных пыльцевых зерен у ди- и тетраплоидных растений и записать полученные данные в табл. 29.

Т а б л и ц а 29. Характеристика пыльцы диплоидной и тетраплоидной ржи

Сорт	Плоидность	Число пыльцевых зерен в четырех полях зрения			Диаметр пыльцевого зерна, мкм
		Всего	В том числе стерильных		
			Число	%	
Петкус Вайве (тетра-Петкус)	Диплоидная	191	7	4	14,3
	Тетраплоидная	154	58	38	18,1

8. Пользуясь рисовальным аппаратом или окулярной сеткой, зарисовать и описать пыльцу ди- и тетраплоидной ржи.

Аналогичное задание по изучению пыльцы можно выполнить у ди- и тетраплоидной гречихи, у ди-, три- и тетраплоидной сахарной свеклы, у амфидиплоидов и у других растений. Более крупные пыльцевые зерна являются достоверным признаком, по которому можно определить, что изучаемое растение действительно является тетраплоидным.

Описание и определение продуктивности тетраплоидных растений в сравнении с диплоидными

Задание. Описать по морфологическим и хозяйственным признакам 10 растений тетраплоидной и диплоидной ржи.

Материал и оборудование. 1. По 20 растений диплоидной и тетраплоидной ржи, гречихи или другой культуры; желательно, чтобы диплоидная рожь была тем сортом, из которого была получена тетраплоидная форма. 2. Линейка. 3. Весы.

Пояснения к заданию. Обычно тетраплоидные растения отличаются от растений исходного диплоидного сорта по количественным признакам (рис. 21). Тетраплоиды имеют несколько более мощное развитие, однако высота их бывает такой же, как и у диплоидной формы, а иногда, например у ржи и ячменя, даже ниже. Листья у тетраплоидов крупнее, имеют бóльшие толщину, размеры устьиц и их площадь, пыльцевые зерна крупнее. В большинстве случаев у полиплоидов увеличиваются размеры цветка, толщина лепестков и интенсивность их окраски. У ржи, гречихи и других растений плоды и семена тетраплоидных растений бывают крупнее, чем диплоидных, но число завязавшихся семян бывает меньше. Поэтому при определении продуктивности растений следует обязательно определять череззерницу. Для этого подсчитывают все нормально развитые цветки в соцветии, а затем из их числа — незавязавшиеся. Процент цветков, в которых зерна не завязались, от общего числа нормально развитых цветков и будет определять череззерницу. Обычно у тетраплоидной ржи череззерница составляет от 15 до 40%.

Выполнение задания. 1. Начертить в тетради таблицу для анализа растений по элементам структуры урожая (табл. 30).

Т а б л и ц а 30. Характеристика растений диплоидной и тет

Сорт	Число хромосом	Высота растения, см	Кустистость		Главный		
			общая	продуктивная	Длина, см	Число колосков	
Петкус Вайве (получен из сорта Петкус)	$2n = 14$ $4n = 28$						

2. Провести анализ 10...20 растений диплоидной и тетраплоидной ржи по основным элементам структуры урожая.

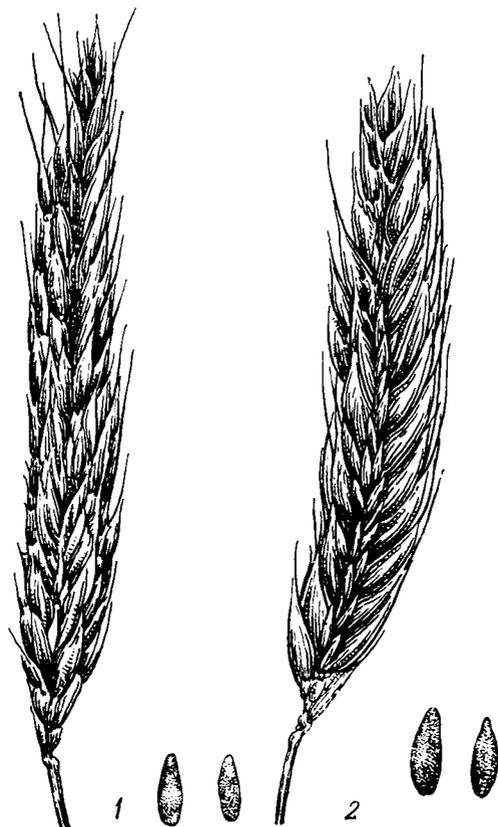


Рис. 21. Колосья диплоидной (1) и тетраплоидной (2) ржи

раплоидной ржи по основным элементам структуры урожая

колос		Число зерен с 1 растения	Через-зерница, %	Масса, г		Морфологические особенности
Плотность	Число зерен в колосе			1000 зерен	зерен с 1 растения	

3. Полученные данные обработать статистически и определить степень достоверности отличий по количественным признакам структуры урожая тетраплоидных растений от растений исходного диплоидного сорта.

4. В примечании указать основные отличия диплоидных и тетраплоидных растений ржи по хозяйственно-ценным и по морфологическим признакам.



Рис. 22. Тритикале

Морфолого-биологическая характеристика тритикале

Задание. 1. Описать по морфологическим признакам несколько форм тритикале в сравнении с растениями районированного сорта пшеницы и исходного или районированного сорта ржи. 2. Определить основные элементы структуры урожая у тритикале в сравнении с растениями ржи и пшеницы; особое внимание обратить на озерненность колоса.

Материал и оборудование. 1. 20 растений каждой из изучаемых форм тритикале. 2. По 20 растений районированных сортов ржи и пшеницы. 3. Линейка. 4. Весы.

Пояснения к заданию. Тритикале — межродовой ржано-пшеничный гибрид с удвоенным числом хромосом, амфидиплоид (АД), одна из форм аллополиплоидии. В настоящее время ведется большая работа по созданию тритикале на базе лучших отечественных и зарубежных сортов ржи и пшеницы. Если тритикале получают путем скрещивания твердой пшеницы (*Triticum durum* L.), имеющей $2n = 28$ хромосом, и ржи (*Secale cereale* L) $2n = 14$, то растения содержат 42 хромосомы (гексаплоидные тритикале). Тритикале, полученные от скрещивания мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.), имеющей $2n = 42$ хромосомы, и ржи $2n = 14$, содержат 56 хромосом и называются октоплоидными. Как 42-, так и 56-хромосомные тритикале могут быть озимыми и яровыми. В первых поколениях тритикале наблюдается сильная череззерница, вызываемая нарушениями в мейозе и образованием анеуплоидных растений. В процессе селекции (Шульдин А. Ф., 1970, 1976) удается создать высоко-

продуктивные формы, представляющие несомненный интерес для селекции. Тритикале имеют четко выраженные морфологические признаки, по которым они отличаются от растений ржи и пшеницы (рис. 22). Колосковые чешуи ржаного типа, но более длинные и широкие с хорошо выраженным килем и длинным килевым зубцом. В каждом колоске содержится 3...5 нормально развитых цветков. Наружная цветковая чешуя ржаного типа, несет длинную ость, особенно у первого и второго цветка. Зерновка крупная, пшеничного типа. Колос длинный, плотный или средней плотности, содержит 24...30 колосков. Соломина толстая, различной длины, обычно сильно опушена под колоском.

Описание и определение продуктивности растений тритикале проводят по той же методике, которая используется для описания тетраплоидных растений (см. с. 108, табл. 30).

Для занятий можно использовать яровые формы тритикале Bruin 3, Bronco 90, Armadillo 135, Armadillo T909, Armadillo PP-21 и др., имеющие четко выраженные морфологические особенности. Особое внимание следует обратить на озерненность колоса (табл. 31).

Таблица 31. Озерненность колоса яровых гексаплоидных тритикале (по данным А. А. Кудрявцевой, 1977)

Тритикале	Число			Количество завязавшихся зерен в колосе	
	колосков в колосе	цветков в колоске	нормально развитых цветков в колосе	штук	%
Bruin 3	18,6	3,4	66,6	55,9	83,9
Bronco 90	17,9	3,5	63,4	55,8	88,0
Armadillo 135	18,7	3,2	60,7	47,4	77,7
Ленинградка	15,5	3,6	55,8	53,1	95,0

Изучение мейоза и определение фертильности пыльцы у тритикале

Задание. 1. Внимательно рассмотреть постоянные препараты мейоза тритикале. 2. Подсчитать число бивалентов и унивалентов в метафазе I. 3. Определить характер расхождения хромосом к полюсам в анафазе I. 4. Приготовить временные препараты пыльцы, окрасить ее ацетокармином, определить процент фертильных пыльцевых зерен и их размеры. 5. Просмотреть характер прорастания пыльцы на рыльце пестика своего цветка (рис. 23).

Материалы и оборудование. 1. Постоянные препараты мейоза у тритикале, пшеницы и ржи. 2. Зафиксированные и хранящиеся в 70%-ном спирте зрелые пыльники и колосья тритикале в фазе цветения. 3. Микроскоп. 4. Предметные стекла, покровные стекла. 5. Ацетокармин. 6. Окуляр- и объект-микрометры.

Пояснения к заданию. Причиной высокой череззерности у тритикале является нарушение мейоза, в частности процесса конъюгации хромосом (рис. 23) в профазе

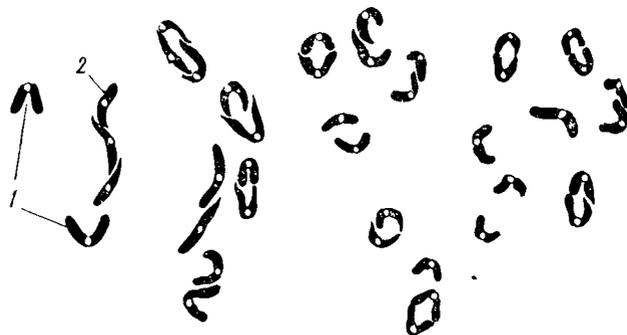


Рис. 23. Характер нарушений мейоза у тритикале:

1 — униваленты; 2 — тривалент

I мейоза. В кариотипе гексаплоидных тритикале ($2n = 42$) объединяются хромосомы различных геномов пшеницы — AA , BB и ржи — RR , а у октоплоидных пшеницы — AA , BB , DD и ржи — RR , поэтому наряду с бивалентными в профазе I мейоза образуются униваленты, триваленты и тетраваленты (рис. 23).

Изучение процесса мейоза у тритикале проводят в метафазе и анафазе первого деления. В метафазе I наблюдаются правильно расположенные по экватору микроспороцита биваленты и беспорядочно разбросанные по периферии клетки униваленты, число которых сравнительно легко подсчитать.

Обычно у пшеницы и ржи в M_1 образуются кольцевые биваленты. У тритикале хромосомы некоторых бивалентов бывают соединены в районе небольших концевых участков и располагаются на одной прямой. Такие биваленты получили название рыхлых, или открытых.

В анафазе I наблюдаются отстающие хромосомы, неравномерно расходящиеся к полюсам. Отстающие

хромосомы часто являются причиной образования анеуплоидных растений тритикале. Исследованиями В. В. Хвостовой и Ф. М. Шкутиной (1966) показано, что у тритикале геном *R* (ржи) в процессе мейоза обособляется и хромосомы этого генома либо неравномерно расходятся к полюсам, либо имеют собственное веретено деления,

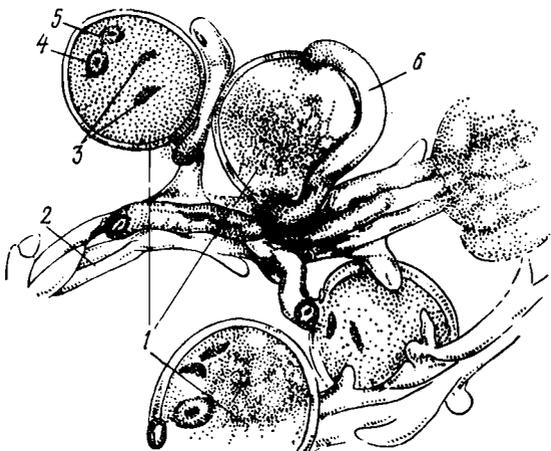


Рис. 24. Прорастание пыльцы на рыльце пестика тритикале:

1 — пыльцевые зерна; 2 — рыльце пестика; 3 — спермии; 4 — вегетативное ядро; 5 — пора; 6 — пыльцевая трубка

в результате чего в АI может наблюдаться образование трех полюсов деления, а в некоторых случаях — двух метафазных пластинок в одной клетке. Такие нарушения мейоза обуславливают формирование аномальных диад и тетрад.

Анализ зрелой пыльцы путем окрашивания ее ацетокармином показывает, что фертильность пыльцы у тритикале довольно высокая. Наблюдения за прорастанием пыльцевых зерен на рыльце пестика свидетельствуют об отсутствии генетической самонесовместимости у яровых гексаплоидных тритикале (рис. 24).

Выполнение задания. 1. Внимательно изучить постоянные препараты мейоза у тритикале. Особое внимание обратить на профазу I и на процесс конъюгации хромосом.

2. В метафазе I подсчитать в 3...5 полях зрения общее число микроспорозитов, число клеток, имеющих

Т а б л и ц а 32. Особенности мейоза и фертильность

Сорт, тритикале	Число микро			
	Метафаза I			
	21 бивалент	20 бивалентов, 2 унивалента	18 бивалентов, 3 унивалента, 1 тривалент	16 бивалентов, 4 унивалента, 2 тривалента
В. С. Грацер	141	24	12	3
Jenk 60	265	46	14	8
6ТА 472	186	64	36	5
Ленинградка	224	5	0	0

21 бивалент, а также различное сочетание бивалентов, унивалентом и тривалентов. Данные записать в табл. 32.

3. В начальной стадии анафазы I определить число клеток с нормальным (21 и 21) расхождением хромосом, число клеток с отстающими хромосомами, с мостами, число тетрад с микроядрами и другими нарушениями. Данные занести в табл. 32.

4. Приготовить временный ацетокарминовый препарат из 5...6 зрелых пыльников тритикале. В 10 полях зрения сосчитать общее число пыльцевых зерен, число фертильных и стерильных. Данные занести в табл. 32. Измерить диаметр 20 фертильных пыльцевых зерен.

5. Приготовить временный ацетокарминовый препарат 5 опыленных рылец пестиков тритикале. Подсчитать число пыльцевых зерен, образующих длинные, короткие пыльцевые трубки, непроросших и лопнувших. Данные занести в таблицу (см. с. 60, табл. 10).

6. Сделать заключение об особенностях мейоза, степени фертильности пыльцы и характере прорастания пыльцевых зерен на рыльце пестика тритикале.

Методика выделения анеуплоидных растений у пшеницы

Задание. 1. Детально познакомиться с кариотипом пшеницы и историей создания серии анеуплоидных линий. 2. Познакомиться с методикой выделения анеуплоидных растений. 3. Приготовить цитологический препарат и подсчитать число хромосом в клетках анализируемого растения.

Материал и оборудование. 1. Семена анеуплоидной линии. 2. Термостат для проращивания семян. 3. Чашка Петри, фильтровальная бумага, дистиллированная вода для проращивания семян.

пыльцы у яровых гексаплоидных тритикале

спороцитов			Число тетрад с нарушениями	Число пыльцевых зерен		
Анафаза I				всего	фертильных	стерильных
Нормальное расхождение	Отстающие хромосомы	Мосты				
132	15	2	15	1474	1338	136
126	34	4	26	1282	1225	57
143	26	13	8	1746	1658	88
185	3	1	1	1547	1495	52

4. Кассеты для хранения проросших семян, корешки которых взяты для подсчета хромосом. 5. Насыщенный водный раствор монобромнафталина для предобработки корешков. 6. Ледяная или 96%-ная уксусная кислота. 7. 1н. раствор HCl. 8. Реактив Шиффа. 9. 50%-ная соляная кислота. 10. 45%-ная уксусная кислота.

Пояснения к заданию. Анеуплоидами называются растения, имеющие число хромосом, не кратное гаплоидному. Они могут возникать разными путями: при скрещивании диплоидов с гаплоидами, в потомстве триплоидов, в потомстве растений, имеющих мутации по мейозу, и т. д. Во всех случаях могут образоваться гаметы с наборами хромосом $n-1$ и $n+1$, при слиянии которых в процессе оплодотворения образуются зиготы, содержащие числа хромосом, равные $2n-1$, $2n-2$, $2n+1$ и $2n+2$. Организм с набором хромосом $2n-1$ называется моносомиком, $2n-2$ — нуллисомиком, $2n+1$ — трисомиком и $2n+2$ — тетрасомиком. Организмы, имеющие лишние хромосомы двух разных гомологичных пар ($2n+1+1$), называются двойными трисомиками. Двойные моносомики ($2n-1-1$) встречаются редко, они часто погибают.

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. — полигеномный полиплоид, содержит три генома, каждый из которых происходит от разных диплоидных видов: геном *AA* — от предков диплоидного вида *T. boeoticum*, геном *BB* — от одного из видов *Aegilops*, геном *DD* — близок к виду *Aeg. squarrosa*. Полиплоиды — сложные объекты для генетического анализа, поэтому для определения групп сцепления и идентификации генов с хромосомами используют анеуплодию. Анеуплоидные

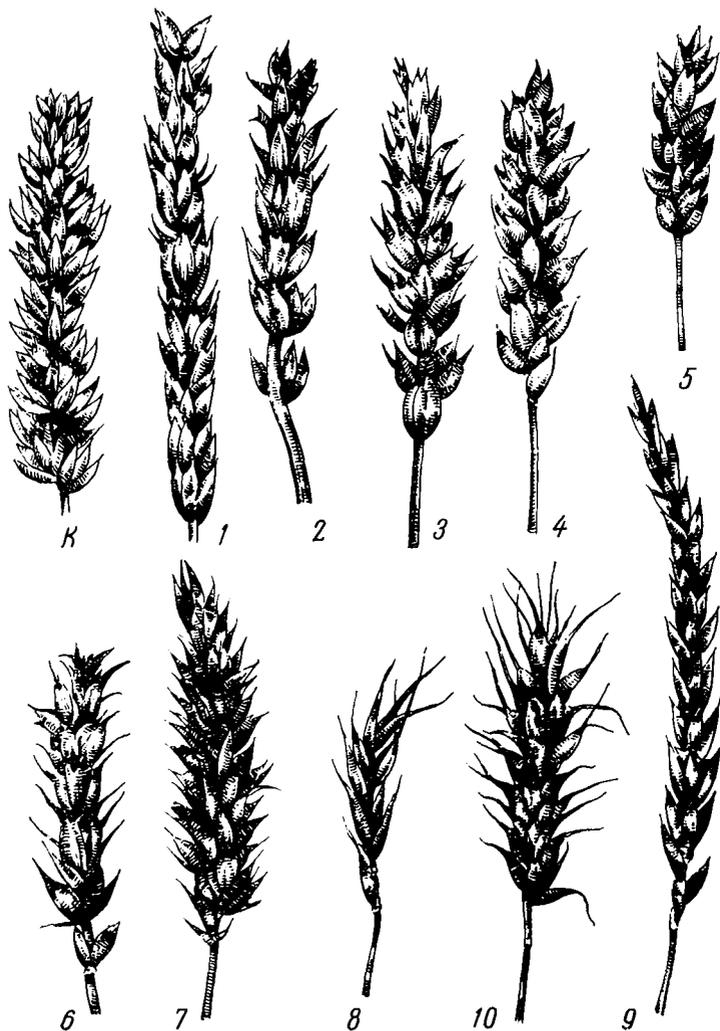
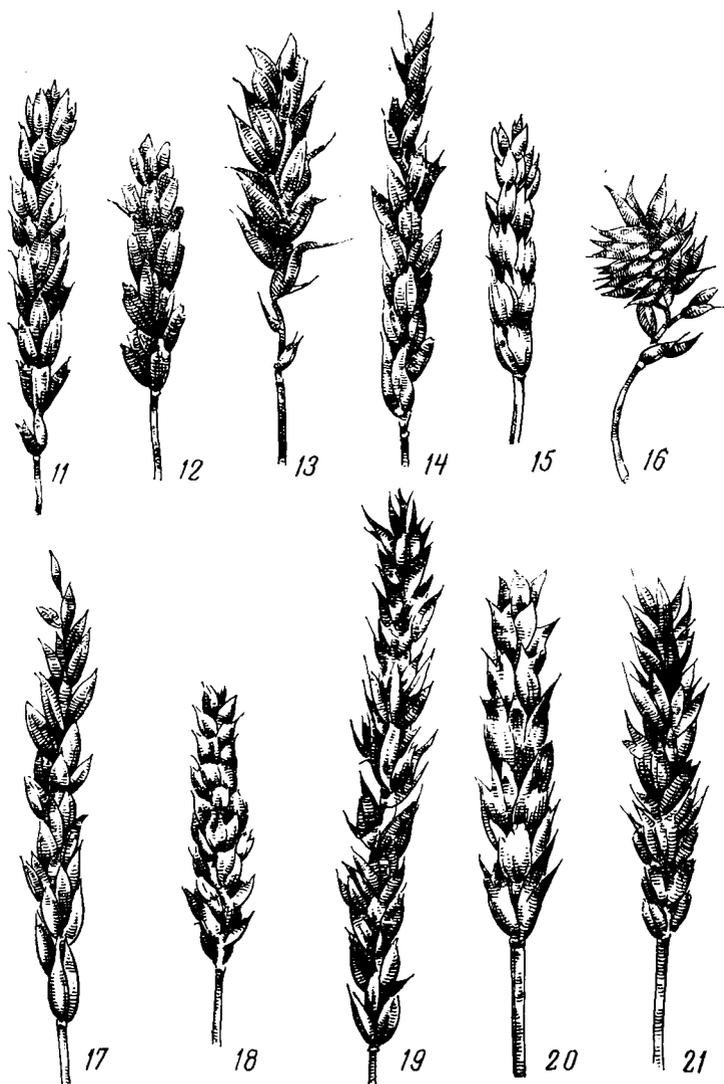


Рис. 25. Колосья нормального диплоидного растения (K) и 21 нул отсутствующей паре



лисомика сорта пшеницы Чайниз Спринг (номера соответствуют гомологичным хромосом)

растения можно использовать также в селекции для получения межсортовых замещенных линий и создания дополненных и замещенных линий с добавлением к хромосомному набору пшеницы хромосом другого вида или замещением одной из пар хромосом пшеницы парой хромосом другого вида или рода.

Используя анеуплодию, Э. Сирс, М. Окамото, Р. Райли и др. установили, что 21 пара хромосом пшеницы представлена 7 гомеологичными группами. Каждый член гомеологичной группы обладает взаимозаменяемой генетической функцией, т. е. сходной с функциями соответствующих хромосом данной группы. Например, хромосома 2*A* компенсирует нуллисомик по хромосоме 2*D* или 2*B*. Такие хромосомы называются гомеологичными. Таким образом, каждая пара гомеологичных хромосом способна частично восстанавливать нормальный фенотип в нуллисомно-тетрасомном состоянии.

Получение полного набора анеуплоидных форм по всем парам гомологичных хромосом является длительным процессом.

Впервые полные серии моносомиков, нуллисомиков и тетрасомиков были получены Э. Сирсом у мягкой пшеницы Чайниз Спринг в 40—50-х годах из потомства гаплоидов и триплоидов.

У нуллисомиков мягкой пшеницы наблюдается изменчивость по морфологическим признакам колоса, но ни один из них не достигает мощности развития и продуктивности нормального диплоидного растения Чайниз Спринг (рис. 25). Многие из них стерильны. Потомство нуллисомиков было бы удобно получать от самоопыления; оно обычно стабильно, но не все нуллисомики фертильны. Моносомики образуют пыльцевые зерна и яйцеклетки с набором хромосом, равным n и $n - 1$. Поэтому при самоопылении они расщепляются на дисомики $2n$, моносомики и нуллисомики. Для моносомного анализа нужны растения $2n - 1$ и $2n - 2$, их ежегодно выделяют из потомства каждой моносомной линии на основании подсчета числа хромосом в зародышевом корешке семени (рис. 26).

Цитологические препараты для этой цели готовят, используя различные модификации методики, разработанной Кембриджским институтом селекции растений (Великобритания).

Выполнение задания. 1. Прорастить семена в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25° С в течение 24 ч. Затем наклюнувшиеся семена перенести в холодильник с температурой 3...5° С на 8...10 ч.

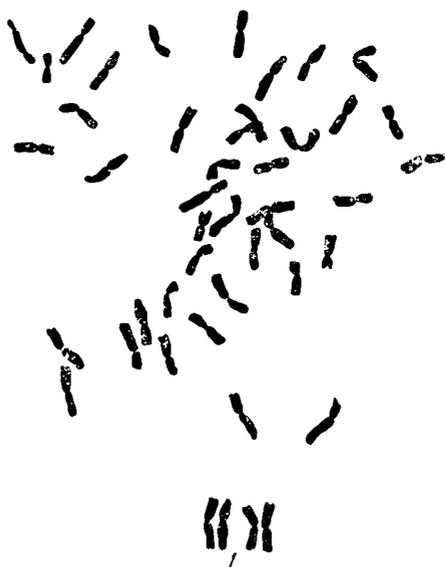
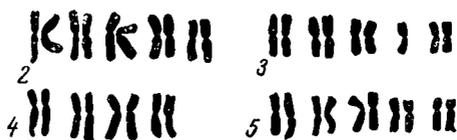


Рис. 26. Кариотип моносомной по хромосоме 6А линии сорта пшеницы Чайнис Спринг ($2n = 41$)



Из холодильника семена на ночь вновь перенести в термостат с температурой 25 °С. Такое чередование температуры создает условия для более интенсивного митотического деления в зоне меристемы зародышевого корешка.

2. В 9...10 ч утра у проростков от корешка длиной 1 см отрезают кончики длиной 3...4 мм и помещают в насыщенный раствор монобромнафталина на 5 ч, затем в 0,2...0,1%-ный раствор колхицина на 4 ч.

3. Проросшие зерновки и отрезанные от них корешки нумеруют и регистрируют под одним и тем же номером в лабораторном журнале. Под этим же номером про-

росшая зерновка должна быть высажена в поле или в горшок в теплице.

Для предобработки, фиксации и окрашивания используют специальные штативы, в которых устанавливают 21 ряд пробирок (по числу моносомных линий) по 10 в каждом ряду (по числу взятых для подсчета числа хромосом зерновок в каждой линии). В каждой пробирке производят предобработку, фиксацию и окрашивание одного корешка.

4. Фиксируют корешки в ледяной или 96%-ной уксусной кислоте 5 мин.

5. Для гидролиза корешки помещают в 1 н. (10%-ный) раствор соляной кислоты (HCl) и переносят в термостат с температурой 60° С на 12 мин (продолжительность гидролиза уточняют в процессе работы).

6. Корешки помещают в реактив Шиффа (см. с. 34) на 15...30 мин, затем на 1...2 мин в 45%-ный раствор уксусной кислоты для промывки.

7. Окрашенные корешки переносят на предметное стекло в каплю 45%-ной уксусной кислоты, отрезают ярко окрашенную зону деления, разрезают ее на несколько частей. Каждую часть ставят перпендикулярно плоскости стекла, накрывают покровным стеклом и легким постукиванием спичкой равномерно распределяют клетки в один слой. Для приготовления постоянного препарата корешки следует давить на предметном стекле не в уксусной кислоте, а в сахарном сиропе (см. с. 18).

8. Под микроскопом при объективе $\times 40$ и окуляре $\times 15$ подсчитывают хромосомы и выделяют моносомные растения. Среди анализируемых потомств моносомных линий частота появления моносомиков, как правило, колеблется в пределах от 53 до 86%.

9. После подсчета числа хромосом оставляют только те зерновки, в клетках которых содержится 41 хромосома. Все моносомные растения высаживают в горшочки или в поле и используют для работы.

Использование нуллисомных и моносомных линий пшеницы для идентификации генов с соответствующей хромосомой

Задание. 1. Познакомиться с методикой нуллисомного генетического анализа. 2. Проанализировать по основным элементам структуры урожая растения серии моносомных линий сорта Чайлиз

Спринг. 3. Дать морфологическое описание растений моносомной серии линий сорта Чайниз Спринг.

Материал и оборудование. 1. Растения (гербарий или растущие в поле или теплице растения). 2. Линейка. 3. Карандаш, тетрадь.

Пояснения к заданию. Для генетического анализа используется нуллисомный метод. Наиболее четко характерные отличия каждой нуллисомной линии проявляются по признакам колоса (рис. 25). Если признак определяется доминантным геном или доминантными генами и отсутствует пара хромосом, в которых они находятся, то данный признак не реализуется. Так, например, у сорта Чайниз Спринг хромосома 1A (XIV) несет доминантный ген, определяющий окраску семян. У нуллисомных по этой паре хромосом растений семена имеют белую окраску. Хромосомы 4B (VIII) и 6B (X) несут доминантные гены, подавляющие развитие остей. Нуллисомники по этим парам хромосом имеют длинные ости.

Нуллисомники по разным хромосомам различаются по морфологии колоса: по плотности колоса, по наличию дополнительных колосков на уступе колосового стержня, по опушенности чешуй (нуллисомик 1A—XIV), по длине и толщине колоса, размерам пыльников, степени мужской стерильности и др. Но нуллисомные растения имеют меньшую жизнеспособность и нередко погибают, многие стерильны, поэтому использовать их в работе затруднительно, и генетический анализ, как правило, проводят на моносомных линиях.

Моносомники, выращенные в благоприятных условиях, трудно отличить от дисомных растений, за исключением моносомной линии 5A (IX), которая имеет спельтоидный колос, и линии 5D (XVIII), отличающейся позднеспелостью. Как видно из табл. 34, моносомники не имеют существенных отличий от дисомных растений, так как одна из пары хромосом присутствует и, кроме того, гомеологичные хромосомы других геномов до некоторой степени компенсируют одну отсутствующую хромосому.

По высоте растения-моносомники разных хромосом различаются незначительно. Моносомники по хромосомам 3D и 4D — низкорослые растения, моносомники 5A, 5B, 5D, 1D и 4B более высокорослы, чем дисомники.

Т а б л и ц а 33. Основные элементы структуры урожая у моносомных линий яровой пшеницы сорта Чайниз Спринг

Обозначение отсутствующей хромосомы	Высота растения, см	Число колосков в колосе	Плотность колоса	Число зерен в колосе	Масса, г	
					зерна с 1 колоса	1000 зерен
1 A	83	20	23	56	2,3	42,5
4 A	81	18	29	33	1,1	32,5
5 A	104	21	25	48	1,6	32,6
6 A	87	20	29	50	2,1	41,3
7 A	87	19	29	46	1,7	37,5
1 B	83	20	28	42	1,3	32,3
2 B	95	22	29	35	1,5	42,9
3 B	88	19	29	55	1,9	36,0
4 B	97	19	32	40	1,7	42,5
5 B	102	21	32	30	0,8	28,3
6 B	78	17	28	96	1,4	31,2
7 B	92	20	27	41	1,4	34,9
1 D	98	23	28	42	1,5	37,7
2 D	79	21	28	38	1,6	41,9
3 D	68	15	26	52	1,7	32,8
4 D	68	14	24	25	0,9	36,5
5 D	110	21	29	49	1,5	31,3
7 D	85	18	29	38	1,2	29,2
Нормальное растение 2n=42	90	20	25	54	2,0	36,8

Выполнение задания. 1. В фазу восковой спелости описать моносомные растения каждой линии из серии Чайниз Спринг. Следует обратить внимание на то, что утрата одного гомолога хромосом 4B и 5B приводит к увеличению плотности колоса, а растения моносомиков 3D и 4D низкорослы.

2. Провести анализ растений в пределах каждой линии и полученные данные вписать в таблицу (табл. 33). Следует обратить внимание на то, что наиболее сильное отклонение по массе зерна с 1-го колоса наблюдается у моносомных растений по хромосомам 4A, 5B, 6B, 4D и 7D, при отсутствии гомолога хромосом 5B и 7D снижается масса 1000 зерен.

Моносомный анализ гибридов

Задание 1. Получить гибриды F_1 и F_2 серии моносомных линий с изучаемым сортом. **2.** Проанализировать полученные гибриды и определить линии, от скрещивания с которыми наблюдается резкое отклонение в расщеплении от теоретически ожидаемого.

Материал. 1. Серия моносомных линий сорта Чайниз Спринг, 2. Сорт, обладающий изучаемым признаком. 3. Гибриды F_1 и F_2 .

Пояснения к заданию. Если путем осмотра и анализа фенотипов нуллисомиков и моносомиков в сравнении с фенотипами нормальных растений нельзя идентифицировать ген с соответствующей хромосомой, то используют моносомный анализ F_1 , F_2 , F_3 от скрещивания серии моносомных линий Чайниз Спринг с гомозиготным по изучаемому признаку сортом. При анализе гибридов выделяют потомство той моносомной линии, у которого по этому признаку наблюдается расщепление, сильно отклоняющееся от теоретически ожидаемого. Это значит, что ген, обуславливающий данный признак, локализован в данной хромосоме.

Если изучаемый сорт имеет рецессивную аллель, а моносомик — доминантную, то анализ можно провести и в F_1 . В F_1 все растения, у которых хромосомы, определяющие данный признак, представлены в двойной дозе, будут доминантны по этому признаку. Растения, у которых эта хромосома находится в моносомном состоянии (моносома), будут двух типов. Они расщепляются в отношении 1 : 1, как при обычном анализирующем скрещивании. Именно в этой хромосоме и будет локализован изучаемый ген. Если изучаемый признак количественный, то растения гибридов F_1 , моносомные по хромосомам, в которых локализованы данные гены, будут достоверно отличаться от остальных (табл. 34).

В тех случаях, когда моносомик несет рецессивный ген, а изучаемый сорт — доминантный, анализ проводят по второму поколению. Для этого гибриды F_1 самоопыляют, F_2 анализируют по фенотипическому проявлению гена и выявляют моносомную линию, в которой наблюдается сильное отклонение в расщеплении от теоретически ожидаемого. Ген будет локализован в той хромосоме, у которой в моносомном состоянии четко проявилось отклонение от теоретически ожидаемого расщепления.

Для проведения этого задания удобно изучить какой-либо четко выраженный признак, например наличие лигулы у пшеницы. Лигула находится в месте отгиба листовой пластинки от влагалища (рис. 27). Безлигульные формы пшеницы были найдены Н. И. Вавиловым в 1916 г., и он установил доминантный характер лигульности. Впервые локализацию этого гена методом моно-

сомного анализа осуществила Т. В. Лебедева. Скрещивание дисомных растений дает расщепление в F_2 при соотношении растений с лигулой и растений без лигулы 15 : 1, что свидетельствует о сложном дигибридном наследовании этого признака.

Т а б л и ц а 34. Число дней от всходов до колошения у моносомных ярово-озимых гибридов первого поколения (Rajki E., Rajki S., 1969)

Моносомки по хромосоме	Чайниз Спринг × F_1		Ген, определяющий озимый образ жизни
	Ранняя 12 *	Мионовская 808 *	
1A (XIV) **	77	83	Отсутствует
2A (II)	89	88	Ген слабого действия
3A (XII)	74	82	Отсутствует
4A (IV)	89	90	Ген слабого действия
5A (IX)	104	98	Основной ген
6A (VI)	83	83	Отсутствует
7A (XI)	81	86	»
1B (I)	79	84	»
2B (XIII)	81	88	»
3B (III)	84	92	Ген слабого действия
4B (VIII)	77	84	Отсутствует
5B (V)	80	87	»
6B (X)	84	87	»
7B (VII)	78	84	»
1D (XVII)	83	84	»
2D (XX)	82	81	Ген слабого действия
3D (XVI)	77	86	Отсутствует
4D (XV)	81	84	Ген слабого действия
5D (XVIII)	109	126	Основной ген
6D (XIX)	84	84	Отсутствует
7D (XXI)	74	82	»
Дисомик (Чайниз Спринг)	78	86	»

* Мионовская 808 и Ранняя 12 не колосились.

** Римскими цифрами обозначены хромосомы, пронумерованные по их величине.

Для скрещивания следует взять серию моносомных линий сорта Чайниз Спринг и безлигульную форму К-31289 (из коллекции ВИРа).

Выполнение задания. 1. Проанализировать F_1 . Все растения первого поколения имеют хорошо выраженные лигулы, что указывает на доминантный характер этого признака.

2. Проанализировать F_2 от скрещивания дисомных растений. Например, из 152 анализируемых растений

139 оказалось с лигулой и 13 растений — без лигулы. Это соответствует теоретически ожидаемому расщепле-

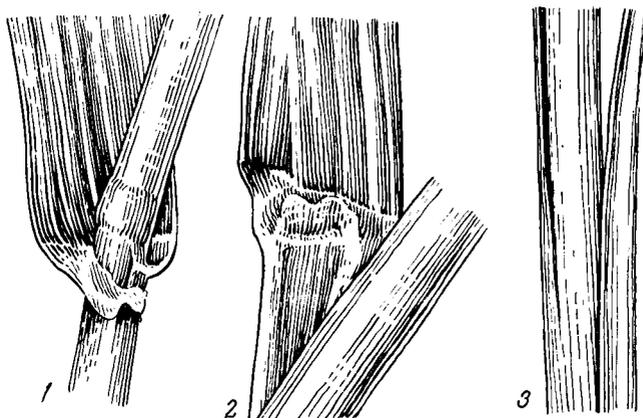


Рис. 27. Листовая пластинка пшеницы в месте отгиба ее от влагалища:

1 — с лигулой и ушками; 2 — с лигулой без ушек; 3 — без лигулы и без ушек

нию 15 : 1 ($\chi^2 = 1,38$) и указывает на то, что данный признак обусловлен двумя генами. Гомозиготный сорт Чайниз Спринг имеет генотип $Lg_1Lg_1Lg_2Lg_2$, а безлигульная форма — $lg_1lg_1lg_2lg_2$.

Т а б л и ц а 35. Расщепление F_2 гибридов Чайниз Спринг \times К-31289 по признаку лигульности

Обозначение хромосомы моносомной линии	Число растений F_2		χ^2 (15 : 1)
	с лигулой	без лигулы	
Контроль (нормальные растения)	139	13	1,38
2 A	16	7	22,45 *
4 A	48	3	0,018
6 A	112	10	0,80
1 B	143	11	0,27
4 B	59	7	2,15
5 D	114	17	10,4*
6 D	104	7	0,007

* Моносомные линии по хромосомам 2 A и 5 D, в которых локализованы гены лигульности.

3. Для определения хромосом, в которых локализован ген лигульности, следует провести анализ гибридов от скрещивания К-31289 с каждой моносомной линией (табл. 35). В нашем примере почти по всем анализируемым линиям наблюдается расщепление, соответствующее теоретически ожидаемому (15 : 1). Исключения составляют моносомные линии по хромосомам 2*A* и 5*D*. У гибридов с ними наблюдается отклонение в расщеплении от теоретически ожидаемого. Следовательно, именно в этих хромосомах и локализованы гены, определяющие наличие или отсутствие лигул.

МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Формирование того или иного фенотипа, т. е. особи с определенными признаками и свойствами, обусловлено, с одной стороны, генотипом этой особи, а с другой — условиями среды, в которой протекает развитие организма. Фенотипическую изменчивость, вызванную воздействием условий среды, называют модификационной изменчивостью.

Размах модификационной изменчивости зависит от условий и от реакции организма, которая определяется его наследственностью и зависит от проявления действия генов. Организм может характеризоваться большей или меньшей степенью изменчивости различных его признаков. У пшеницы, например, наиболее изменчивы количественные признаки — высота растения, кустистость, масса зерен с растения. Степень проявления этих признаков зависит от сроков посева, площади питания растений, удобрения и т. д. Наименее изменчивы плотность колоса, масса 1000 зерен и др.

Известно, что при характеристике растения обычно различают признаки качественные и количественные. К качественным признакам относятся такие, по которым особи отчетливо различаются. Например, семена гороха бывают желтыми или зелеными. Однако имеется много так называемых количественных признаков, т. е. таких признаков, которые у различных особей отличаются лишь по степени выраженности. К количественным признакам относятся высота растения, длина колоса, число колосков в колосе, масса семян и т. д. По таким признакам особи нельзя отчетливо различать, как это делается по признакам качественным. Поскольку коли-

ческие признаки в наибольшей степени подвержены модификационной изменчивости под влиянием окружающей среды, то даже в группе особей с одинаковым генотипом отдельные особи будут отличаться одна от другой: растения будут более или менее высокие, с различным числом колосков в колосе и т. д.

Изменчивость называют прерывистой, если особи отличаются одна от другой не меньше чем на единицу (число зерен в колоске, число колосков в колосе и т. д.). Изменчивость называют непрерывной, если по данному признаку особи отличаются одна от другой как на единицы, так и на доли единицы (длина колоса, масса зерна с растения и т. д.).

При изучении закономерностей модификационной изменчивости по количественным признакам используется статистический метод. При таком анализе необходимо соблюдать следующие условия.

1. Материал должен быть генетически однородным.
2. Растения должны быть выращены в одинаковых условиях.
3. Изменения и подсчеты должны производиться с одинаковой точностью.
4. Наблюдения должны быть многократными, т. е. анализировать следует большое число растений.

Растения, у которых статистически изучают данный признак, называются выборкой.

Статистический анализ модификационной изменчивости

Задание. 1. Ознакомиться с понятиями модификационной изменчивости. 2. Построить вариационный ряд числа колосков. 3. Вычислить основные показатели вариационного ряда.

Материал. 1. 100 продуктивных стеблей от растений, представляющих собой потомство одного растения пшеницы (линию). 2. 100 продуктивных стеблей от растений, представляющих собой потомство одного растения ржи (семью).

Пояснения к заданию. Для статистического анализа модификационной изменчивости изучаемого признака следует построить вариационный ряд и вычислить основные его показатели.

Построение вариационного ряда. В качестве примера построения вариационного ряда может служить такой важный и четко выраженный элемент структуры урожая, как число колосков в главном колосе пшеницы. С этой

целью у каждого из 100 растений в главном колосе подсчитывают число колосков и получают варианты — значения изучаемого признака, которые обозначают буквой X :

20, 18, 17, 22, 19, 19, 20, 21, 20, 21, 18, 19, 17, 22, 21, 18, 18, 20, 19, 21, 21, 19, 20, 18, 21, 20, 19, 19, 17, 20, 22, 18, 21, 19, 18, 21, 20, 18, 19, 18, 20, 21, 21, 18, 19, 21, 18, 20, 22, 17, 19, 20, 19, 18, 21, 20, 20, 19, 17, 22, 19, 20, 18, 19, 19, 20, 20, 17, 19, 21, 20, 19, 20, 18, 22, 20, 19, 19, 20, 20, 20, 17, 19, 18, 21, 20, 19, 19, 19, 20, 17, 18, 22, 18, 20, 20, 19, 20, 19, 20.

Полученные варианты располагают в порядке их возрастания (или убывания). Так, в вышеприведенном примере число колосков в колосе варьирует от 17 до 22, и в возрастающем порядке они записаны в таблицу (табл. 36). Числа, указывающие, сколько раз повторяется каждое значение признака у данного вариационного ряда, называется частотой и обозначается буквой f .

Т а б л и ц а 36. Два вариационных ряда, характеризующих озимую пшеницу сорта Боровичская по числу колосков в колосе и по длине колоса

Число колосков в колосе (варианты X)	Число колосьев (частоты f)	Длина колоса (варианты X), см	Число колосьев (частоты f)
17	8	6,3 ... 7,2	3
18	17	7,3 ... 8,2	5
19	26	8,3 ... 9,2	8
20	28	9,3 ... 10,2	12
21	14	10,3 ... 11,2	9
22	7	11,3 ... 12,2	9
		12,3 ... 13,2	2
		13,3 ... 14,2	2
$n = \sum f = 100$			$n = \sum f = 50$

Таким образом, вариационный ряд представляет собой такой ряд данных, в котором указаны значения варьирующего признака в порядке возрастания или убывания и их частоты.

Из представленных данных видно, что чаще всего встречаются варианты, находящиеся в середине, реже — крайние варианты.

Имея вариационный ряд (например, число колосков в колосе), можно получить количественную характеристику изучаемого признака. Для этого необходимо вы-

числить следующие статистические показатели: среднюю арифметическую, стандартное отклонение (или среднее квадратное отклонение), ошибку средней арифметической и коэффициент вариации, или изменчивости.

Вычисление средней арифметической. Средняя арифметическая характеризует величину признака всей совокупности изучаемых растений и обозначается \bar{x} . Вычислять среднюю арифметическую вариационного ряда по формуле.

$$\bar{x} = \sum fX/n,$$

где \bar{x} — средняя арифметическая;

f — частота встречаемости варианты;

X — варианта;

\sum — знак суммы;

n — сумма частот, т. е. общий объем выборки.

Для подсчетов следует воспользоваться таблицей (табл. 37). В рассмотренном примере среднее арифметическое значение равно 19,4 колоска. Близкая к этому значению величина наиболее характерна для данной выборки растений.

Т а б л и ц а 37. Вычисление среднего арифметического значения числа колосков в колосе озимой пшеницы сорта Боровичская

Число колосков в колосе X	Число колосьев f	Xf	$X - \bar{x}$	$(X - \bar{x})^2$	$(X - \bar{x})^2 f$
17	8	136	-2,4	5,76	46,08
18	17	306	-1,4	1,96	33,32
19	26	494	-0,4	0,16	4,16
20	28	560	0,5	0,36	10,08
21	14	294	1,6	2,56	35,84
22	7	154	2,6	6,76	47,32
$n = \sum f = 100$		1944	—	—	176,80

$$\bar{x} = \frac{\sum Xf}{n} = \frac{1944}{100} = 19,44; \bar{x} = 19,44 \text{ колоска}$$

Вычисление стандартного отклонения. Среднее арифметическое не отражает степени изменчивости признака у данной группы особей, сорта и т. д. Для характеристики изменчивости используют стандартное (среднее квадратическое) отклонение. Оно обозначается буквой σ ;

Меньше всего варьирует число колосков в главном колосе ($C_v = 6,9\%$). Наиболее изменчивый признак — масса зерна с одного растения ($C_v = 43,8\%$). Следовательно, число колосков в колосе мало изменяется под воздействием внешних условий; масса же зерна с растения и число семян в главном колосе в большей степени зависят от условий произрастания и подвержены сильной изменчивости.

Вычисление ошибки средней арифметической. Ошибка средней арифметической обозначается $S_{\bar{x}}$. Она показывает теоретические пределы средней арифметической генеральной совокупности.

Ошибку средней арифметической вычисляют по формуле

$$S_{\bar{x}} = \sigma / \sqrt{n}.$$

В нашем примере $S_{\bar{x}} = \pm 1,34 : \sqrt{100} = \pm 0,13$ колоска, т. е. ошибка средней арифметической равна $\pm 0,13$ колоска.

После вычисления $S_{\bar{x}}$ можем сказать, что сорт пшеницы, изучавшийся нами, имеет среднее число колосков $19,4 \pm 0,13$.

Т а б л и ц а 38. Изменчивость элементов структуры урожая пшеницы

№ п.п.	Культура, сорт	Изучаемые признаки	Статистические показатели				
			\bar{x}	σ	C_v	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
1	Пшеница озимая, сорт Боровичская	Число колосков в главном колосе	19,4	1,34	6,9	0,13	$19,4 \pm 0,13$
		Число зерен в главном колосе	41,0	8,00	19,5	0,80	$41 \pm 0,80$
		Масса зерна с одного растения и т. д.	3,2	1,40	43,8	0,14	$3,2 \pm 0,14$

Данные, полученные в результате статистического изучения тех или иных признаков, заносят в таблицу (табл. 38).

Выполнение задания. 1. На посеве элиты районированного сорта озимой или яровой пшеницы или другой культуры взять без выбора 100 растений.

2. Провести анализ отобранных растений по основным элементам структуры урожая. Определить высоту растений, продуктивную кустистость, длину колоса, число колосков в колосе, число зерен в колосе.

3. Составить вариационные ряды для каждого из указанных элементов структуры урожая.

4. Для каждого из элементов вычислить среднюю арифметическую \bar{x} , стандартное отклонение σ , коэффициент вариации C_v и ошибку средней арифметической $S_{\bar{x}}$.

5. Сравнить степень изменчивости различных признаков и сделать вывод о размахе модификационной изменчивости каждого из них.

6. Провести статистический анализ 100 растений ржи в указанном для пшеницы порядке, сравнить модификационную изменчивость пшеницы и ржи.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Процесс развития растения от посеянного семени до образования новых семян называют онтогенезом. В процессе онтогенеза происходит реализация наследственной информации, закодированной в молекуле ДНК, и у растений закономерно изменяется строение каждого органа.

В ходе онтогенеза растений осуществляются 3 основных процесса: 1) рост; 2) развитие; 3) дифференцировка тканей и морфогенез, т. е. развитие органов и признаков. Причем все эти процессы происходят на основе сложнейших биохимических и физиологических реакций, протекающих в клетках растений. Онтогенез есть реализация генотипа при определенном комплексе факторов внешней среды.

Ф. М. Куперман на основе глубокого анализа большого экспериментального материала разработала стройное учение о процессе формирования органов у растений в их онтогенезе. Процесс формирования органов в онтогенезе называется органогенезом. По Ф. М. Куперман, от посеянного семени до образования новых семян растение проходит 12 этапов органогенеза (рис. 28).

У злаков, например у пшеницы, I этап проходит в фазу всходов. На этом этапе конус нарастания морфо-

логически еще не дифференцирован, у его основания закладываются листовые зачатки.

II этап органогенеза проходит в фазе 2-го, реже 3-го листа. На этом этапе происходит дифференциация

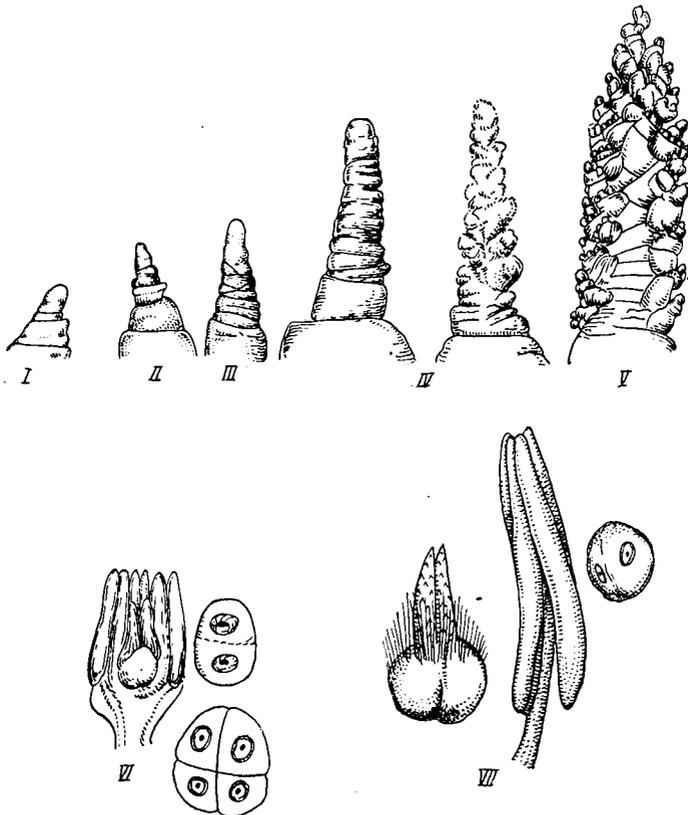


Рис. 28. Органогенез у пшеницы (по Ф. М. Куперман):

I...VII — этапы органогенеза

конуса нарастания на узлы, укороченные междоузлия зачаточного стебля и зачаточные стеблевые листья. В пазухах листовых валиков формируются конусы нарастания боковых побегов.

III этап органогенеза проходит рано весной после появления 3...4-го листа. Он характеризуется вытягиванием конуса нарастания и сегментацией его нижнего участка на зачаточные членики будущего соцветия. Чем

дольше растения озимой и яровой пшеницы задерживаются на III этапе, тем больше формируется сегментов и тем с большим числом колосков будет колос.

IV этап органогенеза проходит в фазу кушения — начала выхода в трубку. На этом этапе происходит ветвление осей соцветия. В зачаточном соцветии закладываются цветочные бугорки.

V этап органогенеза проходит в фазу начала выхода в трубку. На этом этапе формируются цветки в соцветии: закладываются чашелистики и лепестки венчика, тычиночные и пестичные бугорки, происходит дальнейшая дифференциация тычиночных и пестичных бугорков. В конце V этапа в пестичном бугорке обособляются завязь и выросты плодолистиков, из которых впоследствии развиваются рыльца и столбики. В тычиночном бугорке в конце V этапа образуются короткая толстая тычиночная нить и 4-гнездные пыльники. В гнездах пыльников обособляется первичный археспорий.

VI этап проходит также в фазу выхода в трубку. На этом этапе идет дальнейшее формирование тычинок и пестиков. В тычинках образуются четырехслойные стенки пыльников. Археспорий, вначале состоящий из двух рядов крупных клеток с большими ядрами, образует материнские клетки микроспор. Заканчивается VI этап органогенеза, когда в тычинках и пестиках образуются микро- и макроспоры.

Ф. М. Куперман считает, что неблагоприятные условия для роста и развития растений на этом этапе органогенеза (особенно высокие температуры в сочетании с низкой относительной влажностью воздуха и дефицитом влаги в почве) вызывают деформацию пыльцевых зерен и недоразвитие зародышевого мешка. У пшеницы это приводит к белоколосице, бесплодию, образованию стерильных цветков, что резко снижает урожай.

VII этап органогенеза проходит в конце фазы выхода в трубку. У злаковых он начинается в момент первого деления ядра в пыльце и зародышевом мешке. На этом этапе у пшеницы вначале формируется восьмиядерный зародышевый мешок, затем в нем образуются яйцовый комплекс (яйцеклетка и две синергиды), полярные ядра и клетки-антиподы. У пшеницы, гороха и ряда других культур образование и созревание зародышевого мешка заканчиваются обычно за 3...5 дней до раскрытия цветка. Гаметогенез в пыльце у ряда культур протекает несколько

позже, чем в зародышевом мешке. Например, у пшеницы образование вегетативной и генеративной клеток, а затем и спермиев в пыльце происходит, когда уже заканчивается формирование и созревание зародышевого мешка на VIII этапе органогенеза.

VIII этап обычно совпадает с фазой бутонизации, колошения или выметывания метелки. На VIII этапе заканчивается формирование и созревание мужского и женского гаметофитов.

IX этап — это цветение, оплодотворение и образование зиготы.

X этап — формирование плодов и семян. Семена и плоды к концу этапа достигают размера и формы, присущих растениям данного вида и сорта.

XI этап органогенеза проходит в фазу молочной спелости. В этот период происходит налив семян, накопление в них запасных питательных веществ.

XII этап протекает в конце фазы восковой спелости и заканчивается в фазу полной спелости. В это время накопленные питательные вещества переходят в запасное состояние.

Каждому сорту в условиях данной климатической зоны свойственна более или менее определенная продолжительность каждого этапа органогенеза, определяемая генотипом. Увеличение продолжительности того или иного этапа органогенеза при прочих оптимальных условиях дает возможность увеличить у растений число органов, которые на данном этапе формируются. Как указывает Ф. М. Куперман (1977), органы, отстающие в своем развитии на 2...3 этапа органогенеза, постепенно дегенерируют, поэтому потенциальная продуктивность соцветия всегда больше реальной.

Определение потенциальной продуктивности колоса пшеницы (метод Ф. М. Куперман)

Задание. 1. Отпрепарировать конус нарастания яровой пшеницы. 2. Определить по состоянию конуса нарастания и соцветия, на каком этапе органогенеза находится растение. 3. Зарисовать конус нарастания и соцветие на I...VIII этапах органогенеза. 4. Подсчитать число заложившихся на VI этапе и число нормально развитых на VIII этапе колосков и цветков в главных колосьях 5 растений. 5. Определить потенциальную продуктивность изучаемого сорта.

Материал и оборудование. 1. Растения на I...XII этапах органогенеза, 2. Микроскоп, 3. Лупа, 4. Препаровальные иглы, 5, Пред-

менные стекла. 6. Покровные стекла. 7. Стекланные палочки.
8. Дистиллированная вода.

Пояснения к заданию. В процессе органогенеза закладываются и развиваются основные элементы продуктивности — колоски и цветки в колосках. На VI этапе органогенеза, когда в колосе начинается мейоз, все колоски и цветки, отстающие в своем развитии, дегенерируют. Таким образом, потенциальная продуктивность растения всегда реализуется неполностью. Сорты высокоинтенсивного типа обладают большей потенциальной продуктивностью и полнее ее реализуют (рис. 29).

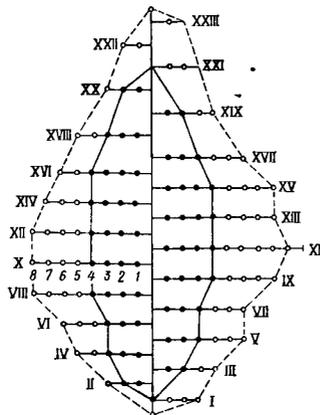


Рис. 29. Схематическое изображение реальной и потенциальной продуктивности колоса пшеницы:

I...XXIII — колоски; I...8 — цветки в колосках; от 1 до 8 — зона нереализованной продуктивности

независимо от степени их дифференциации. Данные записать в табл. 39.

4. Подсчитать число нормально развитых колосков и цветков в гербарном материале у 10 растений того же сорта на XII этапе. Данные записать в табл. 39.

5. Высчитать в процентах реализацию потенциальной продуктивности растениями данного сорта по формуле

$$\text{Реализация потенциальной продуктивности} = \frac{\text{Реальная продуктивность}}{\text{Потенциальная продуктивность}} \cdot 100.$$

Выполнение задания. 1. Отпрепарировать конусы нарастания у растений пшеницы, зафиксированных на I...VII этапах органогенеза в 70%-ном спирте или в 3%-ном формалине.

2. Внимательно просмотреть под лупой и тщательно зарисовать конус нарастания на каждом этапе.

3. Отпрепарировать конус нарастания у 10 растений на VI этапе органогенеза и подсчитать число заложившихся колосков и цветков в колосе, независимо от степени их дифференциации. Данные записать в табл. 39.

Т а б л и ц а 39. Потенциальная и реальная продуктивность главного колоса у растений пшеницы в онтогенезе

Сорт, гибрид	№ растения	Этап органогенеза				Реализация потенциальной продуктивности, %
		VI, заложилось		XII, нормально развилось		
		колосков	цветков	колосков	цветков	
Мирововская 808	1 10	23	130	19	62	48
		21	136	18	56	43
Среднее по сорту						

6. Нарисовать схему колоса данного сорта (рис. 29) и показать на ней заложившиеся цветки и колоски, отметить нормально развитые и показать зону нереализованной потенциальной продуктивности.

ИНБРИДИНГ И ГЕТЕРОЗИС

И н б р и д и н г — принудительное самоопыление перекрестноопыляющихся растений.

Инбредным вырождением (депрессией) называется снижение жизнеспособности и продуктивности растений вследствие инбридинга. При инбридинге завязывается меньшее число семян — 0,3...5% от числа опыленных цветков; из таких семян вырастают менее жизнеспособные, с низкой семенной продуктивностью растения. Среди них бывают карлики, альбиносы, растения с недоразвитыми стерильными соцветиями и т. д. При повторном применении самоопыления разница между самоопыленными линиями одного и того же сорта резко увеличивается, а растения в пределах одной самоопыленной линии становятся более или менее однотипными, но продуктивность их уменьшается. В 5...7-м поколении потомство одной самоопыленной линии практически становится константным. Потомство инбридинга и самоопыленные линии обозначают латинской буквой *I*, а число поколений, в которых повторялся инбридинг, — стоящей снизу около нее цифрой: однократное самоопыление I_1 , двукратное I_2 и т. д. Сами по себе самоопыленные инбредные линии не используются в производстве из-за их низкой продуктивности, но широко применяются в селекции на гетерозис.

Гетерозис — явление более мощного развития гибридов по сравнению с родительскими формами (сортами, линиями) и стандартным сортом: растения дают больший урожай зеленой массы, плодов и семян, более скороспелы и высокорослы, чем стандартный сорт.

Причины гетерозиса и инбредного вырождения объясняются различно. Наибольшее признание получила гипотеза Дж. Шелла и Е. Иста, которая объясняет эффект гетерозиса как результат взаимодействия между неаллельными доминантными генами. Другая гипотеза, получившая название гипотезы сверждоминирования, объясняет эффект гетерозиса взаимодействием между доминантным и рецессивным аллелями одного локуса, т. е. как результат гетерозиготности. Наиболее резко гетерозис выражен у гибридов первого поколения. Во втором и последующих поколениях продуктивность гибридных растений, как правило, снижается. При этом следует иметь в виду, что не при любом скрещивании гибриды имеют более высокую мощность, чем родительские формы. Процесс подбора и оценки сортов и инбредных линий, дающих при скрещивании высокопродуктивное потомство, получил название селекции на комбинационную способность.

Явление гетерозиса используют в производстве как средство повышения урожайности ряда сельскохозяйственных культур. Особенно широкое распространение получили гибриды кукурузы, а также сахарной свеклы, томатов, лука, табака, мака и других культур.

В связи с открытием мужской цитоплазматической стерильности (ЦМС) появилась возможность получать гибридные семена при свободном опылении цветков без предварительной кастрации.

Принудительное самоопыление у перекрестноопыляющихся культур

Задание. 1. Провести принудительное самоопыление кукурузы, ржи или любой другой культуры и получить семена.

Материал и оборудование. 1. Растения ржи, кукурузы или другой перекрестноопыляющейся культуры во время цветения. 2. 30 пергаментных изоляторов размером 4 × 10. 3. 10 изоляторов 50 × 15 см. 4. Бумажные этикетки. 5. Баночки или пакетики для сбора пыльцы. 6. Пинцет.

Пояснения к заданию. Принудительное самоопыление для получения инбредных линий — широко распространенный прием в селекции кукурузы и ряда других культур.

Методика его довольно проста. У растений с обоеполыми цветками, например у ржи, соцветия за 1...2 дня до цветения изолируют пергаментными изоляторами на все время цветения. Через 7...10 дней, когда в соцветии отцветут все цветки, а неоплодотворенные пестики станут нежизнеспособными, изолятор снимают и подсчитывают число завязавшихся семян.

Для лучшего завязывания семян при инбридинге цветки можно опылять смесью пыльцы своего растения с пыльцой растений других родов и даже семейств. Так, у ржи к пыльце своего растения можно добавить пыльцу пшеницы, у кукурузы — подсолнечника и других растений. В этом случае семян завязывается несколько больше, чем при опылении только собственной пыльцой.

У раздельнополых однодомных растений принудительное самоопыление женских соцветий производят пыльцой мужского соцветия, срезанного с того же растения. Например, у кукурузы за 2...3 дня до цветения изолируют початки и метелки; в день массового появления нитей опыляют початок пыльцой мужского соцветия своего же растения. Затем початок и метелку изолируют и через 1...2 дня опыление повторяют, так как цветки в початке цветут неодновременно. А. Е. Коварский и М. И. Боровский в Кишиневском сельскохозяйственном институте разработали новый метод самоопыления кукурузы. Он заключается в том, что стебель у основания метелки слегка скручивают, пригибают к початку и закрывают метелку и початок в один общий изолятор. Изолятор делают из пергаментной бумаги в виде рукава размером 50 × 15 см. В один конец изолятора вставляют согнутую метелку, в другой — початок. После этого концы изоляторов привязывают к стеблю шпагатом. В этом случае пыльца опыляет нити початка по мере их появления без вмешательства человека.

Семена от каждого самоопыленного соцветия на следующий год высевают на отдельной делянке для получения первого поколения самоопыленной (инбредной) линии. Инбредные линии I_1 , в которых имеются маложизненные растения, а также растения, сильно пораженные болезнями и вредителями, в дальнейшей работе не используются. В лучших самоопыленных линиях растения снова самоопыляют и повторяют такое самоопыление в последующих 3...5 поколениях. Затем растения каждой отобранной линии размножают на изолированном уча-

стке уже при свободном опылении в пределах одной линии.

Занятия проводят во время летней учебной практики на ржи, кукурузе или другой культуре.

Выполнение задания. 1. За 1...2 дня до цветения изолировать пергаментными изоляторами 20 колосьев ржи районированного или любого другого сорта.

2. За 2...3 дня до цветения метелки кукурузы у заранее подобранных для самоопыления 10 растений заключить вместе с початками в общий изолятор, как это описано выше.

3. Отметить пергаментными этикетками 10 колосьев ржи того же сорта и 5 растений кукурузы и оставить их для естественного опыления.

4. Во время цветения ржи цветки предварительно изолированных 5 колосьев опылить смесью пыльцы своего растения и пшеницы.

5. Во время массового выхода рылец из кроющих листьев початков кукурузы опылить рыльца смесью пыльцы своего растения и подсолнечника.

6. У 3...5 цветков ржи и 5...10 цветков кукурузы каждого варианта опыления отрезать ножницами рыльца пестиков, поместить их в каплю ацетокармина на предметное стекло и рассмотреть под микроскопом. Зарисовать и определить характер прорастания пыльцевых зерен при инбридинге, а также при опылении смесью пыльцы и при естественном опылении (см. с. 110; рис. 23).

Т а б л и ц а 40. Завязываемость зерен при инбридинге у озимой ржи Вятка 2 и у кукурузы сорта Стерлинг

Способ опыления	Число опыленных цветков	Завязалось зерен	
		Число	%
<i>Озимая рожь сорта Вятка 2</i>			
Перекрестное (естественное)	423	395	93,4
Пыльцой своего цветка (инбридинг)	858	6	0,7
Смесью пыльцы своего цветка и пшеницы	334	50	14,6
<i>Кукуруза сорта Стерлинг</i>			
Перекрестное (естественное)	528	503	95,3
Пыльцой своего растения (инбридинг)	460	144	31,3
Смесью пыльцы своего растения и подсолнечника	620	277	44,7

7. После созревания определить процент завязавшихся зерен при инбридинге и данные записать в табл. 40. У ржи определяют число зерен, завязавшихся во всех колосьях, у кукурузы — в среднем на 1 початок.

Описание и определение продуктивности инбредных линий, простых и двойных гибридов кукурузы

Задание. 1. Описать по морфологическим и хозяйственно-ценным признакам по 3...5 растений инбредных линий кукурузы, простых гибридов, а также двойного межлинейного гибрида.

Материал и оборудование. 1. Растения инбредных линий и гибридов кукурузы. 2. Линейка. 3. Весы.

Пояснения к заданию. У кукурузы в производственных посевах используют различные типы гибридов — межсортовые, сортолинейные, простые, двойные и трехлинейные. Гибриды, полученные в результате скрещивания инбредных линий, называют межлинейными. Широко районирован простой межлинейный гибрид Краснодарский 303 ТВ, сортолинейный гибрид Буковинский 3ТВ. Наиболее широко распространены двойные межлинейные гибриды кукурузы ВИР 42МВ, ВИР 156ТВ, ВИР 67ТВ, Краснодарский 440М и др. Двойные гибриды получают путем скрещивания четырех самоопыленных линий. Например, двойной гибрид ВИР 42 получают в результате скрещивания линий ВИР 44, ВИР 38, ВИР 40 и ВИР 43. В этом случае самоопыленные линии вначале скрещивают попарно и получают гибриды Светоч (ВИР 40 × ВИР 43) и Слава (ВИР 44 × ВИР 38). Затем скрещивают между собой эти простые гибриды и получают семена двойного межлинейного гибрида ВИР 42; эти семена высевают на производственных полях колхозов и совхозов.

Прибавка урожая от посева гибридных семян кукурузы в результате гетерозиса примерно 20...25%.

Занятие по изучению растений инбредных линий и гибридов кукурузы следует проводить во время учебной летней практики перед уборкой.

Это занятие можно проводить и зимой на лабораторно-практических занятиях. В этом случае для анализа берут линии или гибриды первого поколения кукурузы или растений других видов.

Выполнение задания. 1. Начертить в тетради таблицу (табл. 41) анализа растений по элементам структуры урожая.

Т а б л и ц а 41. Продуктивность растений инбредных линий, простых гибридов и двойного межлинейного гибрида В И Р 42

Инбредная линия или гибрид	Высота расте- ния, см	Длина почат- ка, см	Число		Масса, г		Число листьев на стебле
			рядов зерен в почат- ке	зерен в ряд- ке	1000 зерен	почат- ка	
Линия:							
ВИР 38	120	10	16	20	200	70	16
ВИР 40	140	13	16	30	250	120	17
ВИР 43	130	15	14	30	250	130	17
ВИР 44	130	14	14	30	250	130	15
Простой гибрид:							
Слава (44× ×38)	200	20	10	45	250	200	18
Светоч (40× ×43)	150	18	17	40	250	200	18
Двойной гибрид ВИР 42 (Сла- ва×Светоч)	230	25	16	50	250	250	18

2. Провести анализ по 3...5 растениям линий, простых и двойных межлинейных гибридов кукурузы.

3. Вывести средние показатели элементов структуры урожая и указать основные отличия растений инбредных линий и гибридов.

Определение общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности сортов и линий

Задание. 1. Познакомиться с методикой и определить ОКС и СКС у гибридов кукурузы, ржи, сахарной свеклы или другой культуры.

Материал и оборудование. 1. Делянки с растениями F_1 . 2. Весы. 3. Линейка. 4. Тетрадь.

Пояснения к заданию. Это задание выполняется в виде курсовой или дипломной работы и включает получение семян F_1 методом топкросса, поликросса или диаллельных скрещиваний; посев гибридных семян в контрольном питомнике или сортоиспытании; проведение всего комплекса наблюдений и учетов за растениями, их уборка, учет урожая и основных элементов его структуры.

Можно данное задание выполнять и во время лабораторно-практических занятий. В этом случае студентам выдаются таблицы (табл. 42) с данными урожайности

гибридов F_1 , полученных методом топкросса, поликросса и в диаллельных скрещиваниях.

Оценку сортов и линий в селекции на гетерозис у кукурузы и других растений дают по общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности. Общую комбинационную способность определяют методом топкросса или поликросса. Она дает возможность определить ценность большого числа сортов или линий в селекции на гетерозис, так как наблюдается высокая положительная корреляция между проявлением гетерозиса у данной линии в простых гибридах при диаллельных скрещиваниях (специфическая комбинационная способность), в топкроссе и поликроссе (общая комбинационная способность).

У кукурузы для определения общей комбинационной способности чаще всего используют метод топкросса, когда все изучаемые линии берутся в качестве материнских, высеваются чередующимися рядами с отцовским сортом-тестером и опыляются им. При этом большое значение имеет выбор тестера. Обычно используют сорт, гибрид или гибридную популяцию с широкой наследственной основой. Часто общую комбинационную способность определяют при скрещивании с 2...3 тестерами.

Метод поликросса (множественного опыления) используют для определения ОКС у ржи, люцерны, клевера и у других культур. На специальном изолированном участке на отдельных делянках высевают несколько сортов или несколько клонов лучших растений одного сорта, ОКС которых необходимо определить. В результате их переопыления завязываются гибридные семена. Гибриды F_1 представляют собой поликроссные синтетические гибриды. Лучшие из них оценивают по СКС, кроме того, лучшие синтетические гибриды в виде синтетической гибридной поликроссной популяции используют в производстве.

Как при работе методом топкросса, так и поликросса оценку ОКС каждого сорта или линии дают по продуктивности гибридов F_1 . ОКС определяют следующим образом: суммируют урожайность гибридов всех сортов или линий, вычисляют среднюю по данному топкроссу, затем определяют отклонение урожайности данного гибрида от средней урожайности в центнерах с 1 га или в процентах. Таким образом, показателем ОКС является отклонение урожайности гибрида данного сорта или ли-

нии от средней урожайности гибридов всех сортов или линий данного топкросса.

Т а б л и ц а 42. Общая комбинационная способность сортов белокочанной капусты (отцовский сорт-опылитель Золотой гектар 1432)

Материнский сорт или линия	Масса с делянки, кг			ОКС	Гетерозис, %		
	F_1	материнского P_1	отцовского P_2		истинный	конкурсный	гипотетический
Капорка	71	53	61				
Йерсей Квин	74	55	61				
Вараждинско	70	37	61				
Линия № 2 (вр. К-796)	88	36	61				
Самонесовместимая линия (вр. К-606)	82	42	61				
Стандарт—Номер первый грибовский	62	—	—				

Т а б л и ц а 43. Определение истинного, конкурсного и гипотетического гетерозиса у гибридов F_1 ржи

Гибриды F_1	Масса зерна в пересчете на 1 га, ц			Гетерозис, %		
	F_1	материнского сорта	отцовского сорта	истинный	гипотетический	конкурсный
Стальрог × Вятка	64,4	43,6	51,6			
Вятка × Стальрог	46,7	51,6	43,6			
Доминант × Вятка	59,2	35,8	51,6			
Вятка × Доминант	54,6	51,6	35,8			
Хайнес Хелькорн × Тацинская голубая	27,4	28,4	45,3			
Тацинская голубая × Хайнес Хелькорн	38,9	45,3	28,4			
Кунгс II × Московский карлик	45,1	34,8	23,0			
Московский карлик × Кунгс II	32,9	23,0	34,8			
Стандарт—Вятка	51,6	—	—			

Например, ОКС сорта Капорка = ($\Sigma A : 5$) — A_K , где A_K — урожайность F_1 гибрида Капорка \times Золотой гектар 1432, а $\Sigma A : 5$ — средняя урожайность всех гибридов белокочанной капусты (табл.42).

Специфическую комбинационную способность (СКС) линии или сорта определяют методом диаллельных скрещиваний по величине гетерозиса в одной конкретной гибридной комбинации. Специфическую комбинационную способность обычно определяют у небольшого числа линий, предварительно отобранных по общей комбинационной способности.

Для оценки СКС определяют гетерозис гипотетический, истинный и конкурсный (табл. 43).

1. Гетерозис гипотетический (%):

$$G_{\text{гип}} = \frac{F_1 - [(P_1 + P_2) : 2]}{(P_1 + P_2) : 2} 100 = \frac{F_1 - P_{\text{ср}}}{P_{\text{ср}}} 100.$$

2. Гетерозис истинный (%):

$$G_{\text{ист}} = \frac{F_1 - P_{\text{лучший}}}{P_{\text{лучший}}} 100.$$

3. Гетерозис конкурсный (%):

$$G_{\text{конк}} = \frac{F_1 - \text{стандарт}}{\text{Стандарт}} 100.$$

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МУЖСКАЯ СТЕРИЛЬНОСТЬ

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) является примером наследования признаков, обусловленных цитоплазматическими генами. Она наследуется через цитоплазму яйцеклетки материнского сорта и имеет четко выраженное фенотипическое проявление: микроспоры или пыльцевые зерна дегенерируют на разных стадиях своего развития и к моменту цветения бывают стерильными. Цитоплазматическая мужская стерильность широко распространена среди цветковых растений. Она возникает либо вследствие мутаций цитоплазмы (кукуруза, лук, сахарная свекла и др.), либо при развитии ядра одного вида в цитоплазме другого при межвидовой гибридизации (пшеница).

Цитоплазматическая стерильность устойчиво передается из поколения в поколение по материнской линии. Растения — источники ЦМС можно использовать в качестве материнской формы для создания стерильных аналогов сортов и линий, обладающих высокой комбинационной способностью.

Цитоплазма, обуславливающая стерильность пыльцы, получила название ЦИТ^S (стерильная цитоплазма), а цитоплазма растений с фертильной пыльцой — ЦИТ^N (нормальная цитоплазма). Проявление мужской стерильности зависит не только от ЦИТ^S, но и от ядерных генов, локализованных в хромосомах. Доминантный ген *Rf* подавляет реализацию ЦИТ^S.

ЦИТ^S может проявить свое действие только в присутствии рецессивных генов *rfrf*. Если растения имеют ЦИТ^S и генотип *RfRf* или *Rfrf*, то такие растения будут иметь нормально развитую пыльцу. В последующие годы было установлено, что система ЦИТ^S — *Rf* носит сложный характер, имеется несколько ядерных генов — *Rf*₁, *Rf*₂ и т. д., действие которых в значительной степени зависит от генов-модификаторов.

Дегенерация пыльцы у стерильных аналогов пшеницы

Задание. 1. Познакомиться с методикой создания стерильных аналогов сортов или линий. 2. Проанализировать растения стерильного аналога по морфологическим признакам и элементам структуры урожая. 3. Изучить процесс дегенерации мужского гаметофита.

Оборудование и материал. 1. Растения стерильных аналогов пшеницы. 2. Растения исходного отцовского сорта. 3. Пыльнички, зафиксированные в фазу цветения пшеницы. 4. Линейка, весы, пакеты. 5. Микроскоп. 6. Предметные и покровные стекла. 7. Ацетокармин. 8. Пинцет.

Пояснения к заданию. Стерильные аналоги сортов и линий создаются методом многократного беккрасса, во время которого источник ЦМС, а затем гибриды из поколения в поколение опыляются пыльцой того сорта или той линии, стерильный аналог которых создается. Так, например, у пшеницы источниками ЦМС являются *Triticum timopheevi*, *T. timonovum* и другие виды. Межвидовые гибриды мягкой или твердой пшеницы с видами — источниками ЦМС обладают четко выраженной мужской стерильностью, но обычно несут ряд нежелательных свойств и признаков: пленчатость, ломкость колоса, позднеспелость и др. Поэтому лучшие растения, отобранные среди F_1 , опыляют пыльцой заранее подобранного сорта мягкой или твердой пшеницы, обладающего высокой комбинационной способностью (Безостая 1, Мироновская 808, Саратовская 29 и др.). Такое опыление повторяют в 4...5 поколениях и каждый раз отбирают растения с ЦМС, но по морфологическим признакам и по продуктивности типичные для отцовского сорта (рис. 30); обычно к 5 поколению создается стерильный аналог сорта. В последующих поколениях размножение стерильного аналога может осуществляться только при опылении пыльцой исходного отцовского сорта, который является закрепителем мужской стерильности. Характерной особенностью стерильных аналогов является деген-

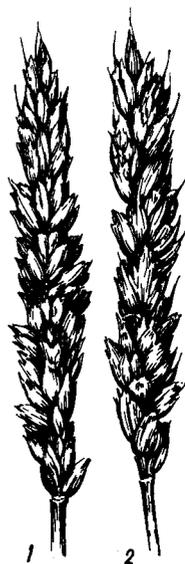


Рис. 30. Сорт озимой пшеницы Безостая 1 (1) и ее стерильный аналог (2)

нерация пыльцевых зерен. Мейоз и микроспорогенез протекает нормально, дегенерация начинается после выхода микроспор из тетрады. Большая часть пыльцевых зерен дегенерирует в фазе одноядерной микроспоры. В не-

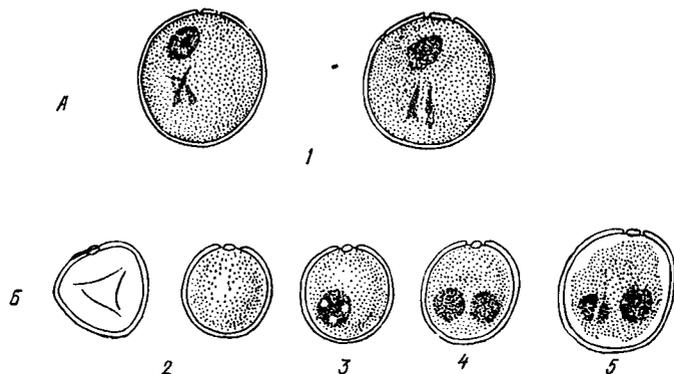


Рис. 31. Пыльцевые зерна в фазу цветения у сорта Мироновская 808 (А) и его стерильного аналога (Б):

1 — нормально развитое пыльцевое зерно; 2...5 — пыльцевые зерна, прекратившие развитие на разных этапах микрогаметогенеза

которых пыльцевых зернах начинается гаметогенез, но только единичные пыльцевые зерна прекращают свое развитие в фазе второго деления (табл. 44; рис. 31).

Т а б л и ц а 44. Степень развития пыльцевых зерен у стерильного аналога сорта озимой пшеницы Мироновская 808

Сорт, аналог	Пыльцевые зерна					Всего про- смотрено	% стериль- ных
	без цито- плазмы	без ядра	содержат ядра				
			1	2	3		
Мироновская 808	0	0	18	4	0	1446	1,5
Стерильный аналог	322	216	1043	68	26	1675	100

Данное задание может быть выполнено в виде самостоятельной работы или на занятиях в период летней учебной практики, или на гербарном и фиксированном материале на лабораторно-практических занятиях. Это занятие проводится на пшенице, но оно может быть выполнено на кукурузе, сорго и другой культуре.

Выполнение задания. 1. Описать растения исходного отцовского сорта пшеницы по основным морфологическим признакам (табл. 45).

2. Внимательно рассмотреть растения стерильного аналога данного сорта, описать их по морфологическим признакам. В примечании указать степень сходства и отличия растений стерильных аналогов и исходного сорта.

3. Проанализировать по 20 растений исходного сорта и стерильного аналога по основным элементам структуры урожая. Полученные данные обработать статистически и определить степень идентичности этих показателей. При этом следует учитывать, что у стерильного аналога семена завязываются при свободном ветроопылении, поэтому число завязавшихся зерен в колосе и на растении, масса их, а также масса 1000 зерен могут значительно отличаться от исходного сорта.

Т а б л и ц а 45. Морфологические признаки стерильного аналога сорта озимой пшеницы Мироновская 808

Сорт, аналог	Разновидность	Стерильность пыльцы, %	Высота растения, см	Главный колос			Форма колосковых чешуй	Примечание
				длина, мм	число колосков	плотность		
Мироновская 808	Субэригроспермум	1,5						Стерильный аналог имеет те же морфологические признаки, что и Мироновская 808
Стерильный аналог	То же	100						Растения отличаются меньшей высотой и 100%-ной стерильностью пыльцы

4. Приготовить временные ацетокарминовые препараты пыльцы в период начала цветения и подсчитать число одноядерных, двухъядерных и трехъядерных пыльцевых зерен, а также пыльцевых зерен без цитоплазмы и без ядер. Определить их процент и сделать заключение о степени стерильности пыльцы и характере дегенерации.

В период летней учебной практики особое внимание следует уделить биологии цветения стерильных аналогов.

ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦИЙ

Популяция представляет собой совокупность особей одного вида, занимающих определенный ареал, свободно скрещивающихся друг с другом, имеющих общее происхождение, генетическую основу и в той или другой степени изолированных от других популяций данного вида.

Генетика популяций — раздел генетики, изучающий закономерности, определяющие генетическую структуру популяции, т. е. генотипический состав популяции, или частоту встречаемости в ней особей, имеющих то или другое сочетание аллельных генов — AA , Aa или aa , а также частоту встречаемости аллелей A и a . Генетическая структура популяции того или иного вида зависит от ряда факторов, в том числе и от способа размножения и опыления. Растения и животные большинства видов размножаются половым путем при свободном скрещивании. Такое размножение обуславливает гетерозиготность популяции в результате непрерывной рекомбинации гамет. Генетическая структура свободно скрещивающейся популяции может оставаться неизменной, т. е. быть в состоянии равновесия, либо претерпевать изменения.

Самоопыление встречается у сравнительно небольшого числа видов растений. При самоопылении обычно сохраняется равное соотношение гомозиготных генотипов и из поколения в поколение уменьшается процент гетерозиготных особей.

Одним из понятий генетики популяций является частота гена, и при анализе обычно оперируют не особью (растением, животным), а частотой (концентрацией) аллеля, так как в популяции имеется определенная связь между частотами аллелей A и a и частотой особей с генотипами AA , Aa и aa . Вся генетическая информация (система генов), заключенная в популяции, называется ее генофондом. Для упрощения анализа структуры по-

пуляции принято рассматривать не всю генетическую информацию популяции, а одну пару аллелей, например A — доминантный и a — рецессивный аллель.

Определение частоты генотипов в популяции по числу соответствующих фенотипов

Задание. 1. Познакомиться с законом Г. Харди и В. Вайнберга. 2. Определить частоту генотипов AA , Aa и aa в популяции озимой ржи Вятка 2 численностью 10 000 растений. В популяции 400 растений имеют всходы без антоциановой окраски.

Пояснения к заданию. Г. Харди и В. Вайнберг в 1908 г. установили закон, которому подчиняется частота распределения гомозигот и гетерозигот в свободно скрещивающейся популяции, и выразили его в виде алгебраической формулы. Согласно этой формуле частота каждого аллеля одного гена в популяции распределяется в соответствии с формулой бинома Ньютона $(p + q)^2 = 1$, или $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Закон Харди и Вайнберга гласит: в неограниченно большой популяции при отсутствии факторов, изменяющих концентрацию генов, при свободном скрещивании особей, отсутствии отбора и мутирования данных генов и отсутствии миграции численные соотношения генотипов AA , aa и Aa остаются из поколения в поколение постоянными.

Этот закон дает возможность определить вероятность содержания AA , Aa и aa в свободно скрещивающейся популяции.

Условия, при соблюдении которых действует этот закон, практически невозможны ни в одной реально существующей популяции, поэтому закон Харди и Вайнберга следует рассматривать как закон, применимый для идеальной (модельной) популяции, с которой можно сопоставить конкретные природные и экспериментальные популяции.

Выполнение задания. 1. Найти частоту аллелей A и a в данной популяции. По условию задания безантоциановые растения, имеющие генотип aa (q)², встречаются с частотой 4% (400 растений из 10 000). По формуле Харди и Вайнберга определяем частоту аллеля a : $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

В нашем примере $q^2 = 0,04$, следовательно $q = \sqrt{0,04} = 0,2$.

Частота аллеля A (p) вычисляется по формуле $p = 1 - q = 1 - 0,2 = 0,8$.

2. Частота гетерозиготных особей с генотипом Aa в соответствии с формулой Харди и Вайнберга равняется $2pq = 2 \cdot 0,2 \cdot 0,8 = 0,32$.

3. Частота генотипов AA равна $p^2 = (0,8)^2 = 0,64$.

Таким образом, в равновесной популяции озимой ржи сорта Вятка 2 соотношение частот генотипов будет следующее: $AA = 0,64$, $Aa = 0,32$ и $aa = 0,04$.

По такой же схеме можно вычислить в популяции соотношение частот и для других генотипов ржи данного сорта, а также и для любой другой перекрестноопыляющейся культуры, у которой известна частота фенотипов с рецессивными признаками.

Генетическое равновесие в свободноскрещивающейся популяции

Задание. 1. Определить генетическую структуру популяции озимой ржи сорта Вятка 2 по одной паре аллелей, если в ней содержится 70% растений, не имеющих антоциановой окраски в фазу всходов. 2. Определить равновесное состояние данной популяции, если в ней вследствие неблагоприятных условий переэпимовки частота рецессивного аллеля будет составлять 0,4. 3. Определить генетическую структуру популяции в 1...3 поколениях.

Пояснения к заданию. Генетическая структура популяции в F_1 и последующих поколениях может измениться, если в результате стихийного бедствия или других причин элиминируется случайно большая группа особей, и это приведет к изменению частот аллелей. Такая исходная популяция неустойчива, и в F_1 в ней устанавливается генетическое равновесие при измененной структуре. Это равновесие сохраняется и в последующих поколениях. Например, в популяции озимой ржи Вятка 2 частоты генотипов по признаку антоциановой окраски всходов находятся в следующих соотношениях: $AA = 0,10$, $Aa = 0,20$, $aa = 0,70$. Вследствие неблагоприятной переэпимовки данной популяции частоты аллелей не соответствуют теоретически ожидаемым и будут составлять $p = 0,6$, $q = 0,4$. В F_1 установятся новые частоты генотипов, которые сохраняются и во всех последующих поколениях (табл. 46).

Таким образом, в рассматриваемом примере в популяции ржи сорта Вятка 2 во всех поколениях сохраняется соотношение генотипов с антоциановой окраской всхо-

Т а б л и ц а 46. Состояние равновесия в популяции при свободном скрещивании

Поколение	Частота генотипов			Частота аллелей генов	
	AA	Aa	aa	pA	qa
Исходное	0,10	0,20	0,70	0,6	0,4
F_1	0,36	0,48	0,16	0,6	0,4
F_2	0,36	0,48	0,16	0,6	0,4
F_3	0,36	0,48	0,16	0,6	0,4
n	p^2	$2pq$	q^2	0,6	0,4

дов (гомозигот) $AA = 0,36$, гетерозигот $Aa = 0,48$ и с зеленой окраской всходов $aa = 0,16$. При этом сохраняется частота гена $A—p = 0,6$ и частота гена $a—q = 0,4$.

Аналогичным образом могут быть составлены задания по установлению равновесия в популяциях различных сортов ржи с учетом таких признаков, как окраска зерновки, наличие опушения под колосом, наличие воскового налета и др. Кроме популяций ржи, могут быть использованы популяции таких перекрестноопыляющихся растений, как клевер красный, гречиха и др. При составлении задания можно в исходной популяции брать различные соотношения частот генов ($p = 0,2, q = 0,8, p = 0,7, q = 0,3$ и т. д.) и различных частот генотипов в исходной популяции. Сумма частот генотипов равняется 1 и сумма частот генов тоже должна равняться 1.

Выполнение задания. 1. Найти частоты генотипов в F_1 популяции. Пользуясь формулой Харди—Вайнберга, определяем частоту генотипа $aa: q^2 = 0,16$. Затем определяем частоту генотипа $AA: p^2 = 0,36$. Частота генотипа $Aa: 2pq = 2 \cdot 0,16 \cdot 0,36 = 0,48$.

2. Вычислить частоты аллелей $F_1: p = 0,6, q = 0,4$.

3. Определить генетическую структуру F_2 и F_3 данной популяции. Данные записать в табл. 46.

Динамика популяций у перекрестноопыляющихся культур при полной элиминации рецессивных гомозигот

Задание. 1. Ознакомиться с причинами, нарушающими равновесие популяции. 2. Определить изменение соотношения генотипов в поколениях ржи при полной элиминации рецессивных гомозигот,

Пояснения к заданию. Равновесие в популяции может нарушаться под влиянием таких факторов, как мутационная изменчивость, отбор, увеличение или уменьшение численности разных фенотипов в популяции и др. Причем наибольшее значение имеет отбор.

Динамика популяции выражается в изменении соотношения разных генотипов в поколениях. Генофонд популяции может пополняться новыми мутациями. Этот процесс возникновения и накопления мутаций называется мутационным давлением. Например, мутирование аллеля A в аллель a или наоборот может нарушить равновесие в популяции, т. е. изменить соотношение генотипов AA , Aa и aa . Каждая вновь возникшая мутация подвергается действию отбора, т. е. все особи, у которых возникает мутация, снижающая жизнеспособность или плодовитость, могут полностью или частично элиминироваться. Если возникшая мутация доминантна, то все обладающие ею особи подвергаются действию отбора в F_1 . Если мутация рецессивна, то она подвергается действию отбора только в гомозиготном состоянии. В этом случае мутантные рецессивные аллели могут накапливаться в популяции в гетерозиготном состоянии. Поэтому элиминация рецессивных гомозигот не ведет к исчезновению рецессивных особей в популяции: в каждом последующем поколении рецессивные гомозиготы будут появляться вновь из гетерозигот Aa в результате их расщепления.

При выполнении данного задания в качестве примера может быть рассмотрена популяция озимой ржи, у которой частота доминантного аллеля $p = 0,5$, частота рецессивного аллеля $q = 0,5$, а гомозиготное состояние рецессивного гена ff обуславливает полную стерильность цветков.

Доминантный аллель F как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии обуславливает нормальное развитие фертильных цветков. В этом случае коэффициент отбора (коэффициент элиминации), обозначаемый буквой S , для рецессивных гомозигот ff равняется 1, т. е. эти гомозиготы в каждом поколении бесплодны, не завязывают семян.

Согласно заданию в исходной популяции частоты доминантного и рецессивного аллелей равны и составляют $p = 0,5$ и $q = 0,5$.

При $S = 1$ частота генов в популяции вычисляется по формуле $q_n = q/(1 + nq)$, где n — поколение, для которого ведется расчет.

Для удобства расчетов следует вычислить не частоты генотипов, а процент особей с соответствующим генотипом (табл. 47).

Выполнение задания. 1. Вычислить процент особей с генотипами FF , Ff , ff в исходной популяции при $S = 1$ и $q = 0,5$. Данные занести в табл. 47, умножив предварительно на 100, чтобы перевести их в проценты. Расчет ведется по формуле $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, или $(0,5)^2 + (2 \cdot 0,5 \cdot 0,5) + (0,5)^2 = 1$.

Т а б л и ц а 47. Динамика изменения соотношения генотипов в популяции при полной элиминации рецессивных гомозигот ($S = 1$)

Поколение	Частота		% особей с генотипом		
	доминантного гена p	рецессивного гена q	$ff (q^2)$	$Ff (2pq)$	$FF (p^2)$
Исходное	0,500	0,500	25,00	50,00	25,00
1	0,667	0,333	11,12	44,44	44,44
2	0,750	0,250	6,25	37,50	56,25
3	0,800	0,200	4,00	32,00	64,00
4	0,833	0,167	2,78	27,78	69,44
5	0,857	0,143	2,04	24,51	73,44
6	0,875	0,125	1,56	21,88	76,56
7	0,889	0,111	1,20	19,74	79,03
8	0,900	0,100	1,00	18,00	81,00
9	0,909	0,091	0,83	16,54	82,63
10	0,917	0,083	0,69	15,22	84,09
20	0,955	0,045	0,20	8,60	91,20
n	$p_n = 1 - q_n$	$q_n = \frac{1}{1 + nq}$	q_n^2	$2p_nq_n$	p_n^2

Следовательно, в исходной популяции будет следующее соотношение генотипов: 25% FF , 50% Ff и 25% ff .

2. Вычислить частоту гена f в популяции первого поколения q_1 по выше приведенной формуле: $q_1 = 0,5 : [1 + (1 \cdot 0,5)] = 0,5 : 1,5 = 0,333$.

3. Определить частоту гена F : $p_1 = 1 - q_1 = 1 - 0,333 = 0,667$.

4. Определить процент растений с генотипами FF , Ff и ff в популяции первого поколения. Вычисление проводят по формуле $p^2 + 2pq + q^2 = 1$; $(0,667)^2 + (2 \cdot 0,667 \cdot 0,333) + (0,333)^2 = 1$; $0,444 + 0,444 + 0,112 = 1$.

Следовательно, в популяции первого поколения содер­жится особей с генотипами FF 44,4%, Ff — 44,4% и с ff — 11,2%.

5. Таким же образом вычислить частоты доминант­ного и рецессивного генов и определить процент особей с генотипами FF , Ff и ff во втором, третьем и послед­ующих поколениях. Как видно из табл. 47, при полной элиминации рецессивных гомозигот с генотипом ff в каж­дом поколении соотношение генотипов в популяции из­меняется: к 20-му поколению численность доминантных гомозигот FF возрастает с 25 до 91,2%, численность рецессивных гомозигот ff уменьшается с 25 до 0,2%. Численность гетерозигот Ff тоже уменьшается в поко­лениях с 50 до 8,6%, но уменьшение их идет медлен­нее, чем рецессивных гомозигот.

По такому же типу могут быть построены задания для других признаков у ржи, кукурузы, гречихи, кле­вера и прочих перекрестноопыляющихся культур.

Динамика популяций у перекрестноопыляющихся культур при неполной элиминации рецессивных гомозигот

Задание. 1. Определить изменение соотношения особей с различ­ными генотипами в поколениях при элиминации 50% рецессивных гомозигот ($S = 0,5$). 2. Определить процент особей с рецессивным признаком в поколениях в зависимости от значения коэффициента отбора.

Пояснения к заданию. Коэффициент отбора S для рецессивных гомозигот не всегда равен единице, чаще бывает меньше. Это означает, что рецессивные гомози­готы элиминируются не полностью, а лишь частично. В этом случае частоту рецессивного гена q вычисляют, суммируя значение q предшествующего поколения с величиной изменения частоты рецессивного гена за одно поколение Δq . Эту величину вычисляют по формуле $\Delta q = [Sq^2(1 - q)] : (1 - Sq^2)$.

В качестве объекта для изучения динамики популяции при неполной элиминации рецессивных гомозигот можно взять популяцию озимой ржи, содержащую мутантные карликовые растения, продуктивность которых в два раза меньше, чем у нормальных растений.

Ген D обуславливает развитие растений, имеющих нормальную высоту, ген d в гомозиготном состоянии

определяет карликовость растения. При частоте доминантного гена $p = 0,8$ и частоте рецессивного гена $q = 0,2$ исходное соотношение генотипов в популяции составляет $0,64DD; 0,32Dd; 0,04dd$, т. е. 4% растений в популяции — карликовые мутанты.

Выполнение задания. 1. Вычислить Δq , т. е. изменение частоты рецессивного гена d за первое поколение. Для этого в приведенную выше формулу подставить численные значения S и q : $\Delta q = [Sq^2(1 - q)] : (1 - Sq^2) = -0,5(0,2)^2(1 - 0,2) : (1 - 0,5)(0,2)^2 = -0,016 : 0,98 = -0,0163$.

2. Вычислить q_1 (т. е. частоту q для первого поколения). Для этого сложить q исходной популяции и Δq , т. е. $0,2$ и $-0,0163$: $q_1 = 0,2 + (-0,0163) = 0,2 - 0,0163 = 0,1837$.

3. Вычислить p_1 . Так как $p_1 + q_1 = 1$, то $p_1 = 1 - q_1 = 1 - 0,1837 = 0,8163$.

4. Вычислить частоты генотипов DD , Dd и dd для первого поколения.

В соответствии с формулой Харди и Вайнберга $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ получим следующие частоты генотипов: $DD - 0,6635$, $Dd - 0,3028$, $dd - 0,0337$. Если выразить эти величины в процентах, то частоты генотипов соответственно будут равны: $DD - 66,35\%$, $Dd - 30,28\%$, $dd - 3,37\%$. Полученные данные занести в табл. 48.

Таблица 48. Изменение соотношения генотипов в популяции ржи при коэффициенте отбора $S = 0,5$

Поколение	Частота рецессивного гена, q	% особей с генотипом			Частота доминантного гена, p
		dd	Dd	DD	
Исходное	0,2000	4,00	32,00	64,00	0,8000
1	0,1837	3,37	30,28	66,35	0,8163
2	0,1694	2,87	28,14	68,99	0,8306
...					
10					

5. Вычислить частоты генотипов DD , Dd и dd для второго поколения. Для этого следует вычислить Δq : $\Delta q = [-Sq_1(1 - q_1)] : (1 - Sq_1^2) = [-0,5 \cdot 0,1837^2 \times (1 - 0,1837)] : (1 - 0,5 \cdot 0,1937^2) = -0,014 : 0,98 = -0,0143$.

Зная Δq , вычисляем q_2 : $q_2 = q_1 + \Delta q = 0,1837 - 0,0143 = 0,1694$. Отсюда $P_2 = 1 - 0,1694 = 0,8306$.

В соответствии с формулой Харди — Вайнберга вычисляют частоты генотипов: $DD = 0,6899$, $Dd = 0,2814$, $dd = 0,02870$. Частоты этих же генотипов (в процентах) будут равны: $DD - 68,99\%$, $Dd - 28,14\%$, $dd - 2,87\%$. Таким же образом вычисляют частоты генотипов для F_3 , F_4 и последующих поколений.

6. Вычислить частоту рецессивного аллеля и процент особей с генотипом dd при различных коэффициентах отбора — 0,70; 0,30; 0,10; 0,01. Порядок вычисления такой же, какой описан в пп. 4 и 5. Полученные данные следует записать в табл. 49.

Т а б л и ц а 49. Влияние коэффициента отбора на изменение частоты рецессивных растений карликовой ржи

Поколение	% растений с рецессивным признаком			
	$S = 0,70$	$S = 0,30$	$S = 0,10$	$S = 0,01$
Исходное	4,0	4,0	4,0	4,0
1				
2				
3				
· · · · ·				
10				

Обратить внимание на то, что чем больше значение S , тем быстрее в поколениях снижается частота рецессивных особей.

ДРОЗОФИЛА КАК ОБЪЕКТ ИЗУЧЕНИЯ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И ИЗМЕНЧИВОСТИ

Ряд разделов генетики — хромосомная теория наследственности, определение пола, множественный аллелизм, мутагенез и др. — разработаны на дрозофиле (плодовой, или укусной, мухе). Дрозофила — удобный объект для теоретических исследований. Она легко размножается в лабораторных условиях, имеет короткий цикл развития, плодовита, обладает четко выраженными морфологическими признаками. Благодаря большому числу спонтанных и индуцированных мутантных рас, часто характеризующихся четким проявлением измененных признаков, и небольшому числу хромосом она может служить модельным объектом при проведении ряда лабораторных работ со студентами.

Биология развития дрозофилы. Дрозофила (*Drosophila melanogaster*) — небольшая серая муха, длина тела которой около 3 мм, с ярко-красными глазами, с нормально развитыми крыльями, превышающими длину тела. Питается ферментируемыми фруктами или овощами. В лаборатории ее разводят на специальной питательной среде (см. с. 159).

Яйцо дрозофилы длиной около 0,5 мм, снабжено двумя отростками, при помощи которых оно держится на поверхности среды. Самки откладывают яйца вскоре после оплодотворения. В благоприятных условиях каждая самка откладывает до 50...80 яиц в сутки, а всего в течение 3...4 сут она может отложить более 200 шт.

В лабораторных условиях личинки появляются из яиц через 20...24 ч после оплодотворения. Личиночный период состоит из трех возрастов. Первый и второй возраста заканчиваются линьками, третий — окукливанием, которое начинается примерно через 4 сут после вылупления из яйца.

Первое время после вылупления из яйца личинки находятся на поверхности среды, затем уходят вглубь,

интенсивно питаются, а перед окукливанием покидают среду, перестают питаться и некоторое время ползают по стенкам стаканчика или пробирки. Затем они становятся неподвижными, значительно сокращаются в длину и приобретают характерную для куколки форму. В состоянии куколки они находятся примерно 4 сут. За это время разрушаются личиночные органы, за исключением гонад и нервной системы, и формируются органы взрослой мухи. В конце стадии куколки сквозь оболочку

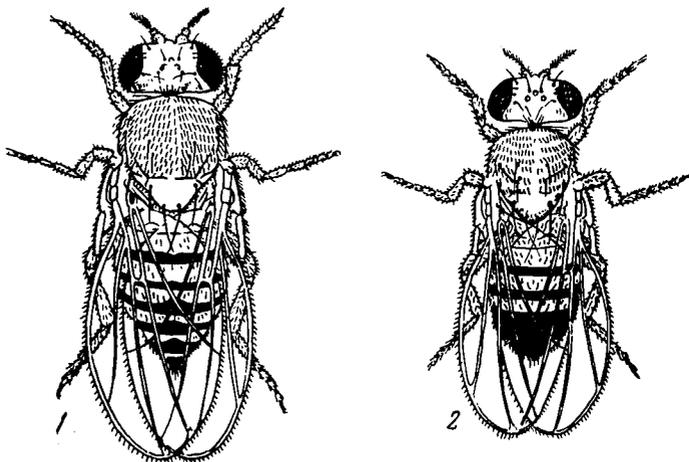


Рис. 32. Дрозофила:
1 — самка; 2 — самец

просвечивают темные участки тела, хорошо видны глаза, особенно если они имеют яркую окраску.

Молодые, только что вылупившиеся мухи имеют длинное желтоватое тело, почти лишенное пигмента, короткие, еще нерасправленные крылья. Через 8 ч самки уже способны к оплодотворению. Для скрещивания необходимо брать девственных самок, не старше 8 ч после вылупления. Самки начинают откладывать яйца с конца вторых суток и продолжают до конца жизни.

Самки дрозофилы отличаются от самцов по величине и ряду других морфологических признаков (рис. 32). Они обычно несколько крупнее самцов; конец брюшка у них заостренный, в то время как у самца форма брюшка округлая. Последние сегменты брюшка у самок пигментированы значительно слабее, чем у самца. Кроме того,

у самцов имеются так называемые половые гребешки в виде ряда крепких хитиновых щетинок на первом членике передних ног. Однако этот признак можно различить только под бинокулярной лупой, поэтому в практической работе ориентируются преимущественно на форму и пигментацию брюшка.

Инвентарь и оборудование, необходимые при работе с дрозофилой. 1. Стаканчики из толстого стекла высотой 5...7 см и диаметром 2,5...3 см. 2. Тонкий глазной пинцет и мягкая кисточка. 3. Молочно-белое стекло размером 5 см × 10 см. 4. Бинокулярная лупа или небольшие лупы различных конструкций с увеличением не менее × 4. 5. Часовое стекло. 6. Капельница для серного эфира. 7. Эфиризатор, или морилка. 8. Бутыль с небольшим количеством керосина или отходов спирта ($\frac{1}{4}$ часть ее объема). В эту бутылку выбрасываются ненужные мухи после анализа. 9. Вата для изготовления пробок. 10. Кастрюля и плитка для приготовления питательной среды. 11. Мензурка, весы, карандаш, этикетки, тушь.

Питательные среды и их приготовление. Главные составные части питательных сред для дрозофилы — дрожжи и сахар. В питательную среду обычно добавляют агар-агар. Он придает среде желеобразную консистенцию. Агар-агар должен быть светлым, прозрачным, хорошо очищенным от химических примесей. Ниже приводится ряд наиболее распространенных и доступных рецептов приготовления питательных смесей, рассчитанных на 50 пробирок:

- | | |
|---|--|
| I. Вода 300 мл
Изюм 150 г
Агар-агар 6 г | II. Вода 400 мл
Картофель 200 г
Изюм 150 г
Агар-агар 4 г |
| III. Вода 500 мл
Дрожжи 30 г
Изюм 25 г
Манная крупа 18 г
Сахар 8 г
Агар-агар 5 г | IV. Вода 350 мл
Дрожжи 40 г
Манная крупа 13 г
Сахар 13 г
Агар-агар 4,5 г |

Для приготовления среды по рецепту III дрожжи тщательно растирают и помещают в дистиллированную воду, налитую в алюминиевую кастрюлю или фарфоровый стакан. Тщательно перемешивая, доводят до кипения. Из изюма предварительно удаляют косточки, тщательно

промывают его, растирают в фарфоровой ступке и кладут в кипящую воду.

Смесь варят на слабом огне при тщательном перемешивании в течение 45 мин. Затем в нее засыпают манную крупу и варят еще 25 мин. Агар-агар предварительно замачивают в дистиллированной воде в течение 30...40 мин. Если вода выкипит, ее добавляют до первоначального объема. Готовую среду охлаждают до 50...60° С и разливают в тщательно вымытые и простерилизованные пробирки или стаканчики (примерно на 1...1,5 см их высоты), накрывают чистой марлей и еще раз охлаждают до комнатной температуры. В таком виде среду можно использовать либо сразу после охлаждения, либо через некоторое время. Хорошо приготовленная среда может храниться в холодильнике 3...4 сут в стаканчиках или пробирках, закрытых ватными пробками.

Перед тем как поместить мух на среду в стаканчики, поверхность среды засевают дрожжами. Для этого свежие дрожжи разводят в дистиллированной воде до консистенции сливок, мягкой кисточкой одну каплю переносят на поверхность среды и дают ей подсохнуть. В приготовленные таким образом стаканчики со средой переносят мух либо для размножения, либо специально подобранные пары для скрещивания. По такой же методике готовят среды и по другим рецептам.

Дрожжи для приготовления сред должны быть обязательно свежими, среда не слишком твердой (молодые личинки не могут проникнуть в глубь твердой среды и погибают) и не слишком жидкой (в жидкой среде могут погибнуть отложенные яйца).

Наркотизация мух. Анализ и подсчет мух, а также отбор девственных самок и подбор родительских пар для скрещивания проводят на матово-белом стекле под лупой после того, как их усыпят серным эфиром. Для этой цели мух помещают в эфиризатор (морилку) или, если специального эфиризатора нет, в обычную пробирку или стаканчик, в которых их размножают. К этому стаканчику подбирают плотную корковую пробку, в нижней части которой делают углубление. В это углубление вставляют плотный ватный тампончик, смачиваемый из капельницы по мере надобности 1...2 каплями серного эфира. Стаканчик с мухами осторожно постукивают о ладонь (мухи при этом собираются в нижней его части),

затем осторожно снимают ватную пробку, накрывают стаканчик эфиризатором и опрокидывают так, чтобы стаканчик с мухами был наверху. Легким постукиванием о ладонь всех мух переводят в эфиризатор и закрывают его пробкой с ватным тампоном, смоченным одной каплей эфира. Как только все мухи заснут, их осторожно вытряхивают из эфиризатора на молочно-белое стекло и, пользуясь лупой и мягкой кисточкой, быстро подсчитывают, так как в наркотизированном состоянии они могут находиться только около 5 мин. Если наркотизацию следует продлить, мух накрывают большим часовым стеклом, под которое кладут ватный тампон, смоченный одной каплей эфира. Если эти мухи нужны для последующего размножения, их помещают в чистые пробирки с питательной средой. В одну пробирку для размножения следует помещать 2...3 самки и 3...5 самцов. Для того чтобы сонные мухи не упали на дно пробирки и не увязли в среде, их помещают на чистую стенку стаканчика со средой и держат стаканчик в горизонтальном положении до тех пор, пока мухи не проснутся.

По окончании работы с мухами их усыпляют и выбрасывают. От большой дозы эфира мухи погибают через 3...5 мин. Об их гибели можно заключить по распорченным кверху и в стороны крыльям и безжизненно вытянутым лапкам.

Всю работу с дрозофилой и результаты наблюдений фиксируют в соответствующем журнале (табл. 50). Форма журнала может быть различной, но в нем должны быть точно зафиксированы дата постановки опыта или размножения линии, основные сведения о родительских парах, взятых для гибридизации, результаты анализа и т. д.

Т а б л и ц а 50. Примерная форма журнала работы с дрозофилой

Дата	№ стаканчика	Линия или гибридная комбинация	Результаты анализа
2 февраля	8	Normal (размножение)	14 февраля получено 120 мух, из них 60 самок и 60 самцов
14 февраля	14	F_1 Normal \times \times vestigial	1 марта получено F_1 146 мух, все с нормальными крыльями, 76—самок и 70—самцов

Хромосомы дрозофилы

Задание. 1. Познакомиться с кариотипом самца и самки дрозофилы. 2. Приготовить цитологический препарат политенных хромосом из слюнных желёз. 3. Внимательно рассмотреть и зарисовать политенные хромосомы дрозофилы.

Материал и оборудование. 1. Постоянные препараты кариотипов самцов и самок дрозофилы. 2. Личинки дрозофилы перед окукливанием. 3. 0,73% -ный NaCl. 4. Ацетоорсеин. 5. Предметные и покровные стекла. 6. Часовые стекла. 7. Препаровальные иглы, пинцет, фильтровальная бумага. 8. 45% -ная уксусная кислота, сахарный сироп. 9. Бинокулярная лупа или микроскоп МБС-1. 10. Микроскоп МБР-3 или МБР-1.

Пояснения к заданию. В соматических клетках дрозофилы содержится 4 пары хромосом (рис. 33). Первая пара — половые хромосомы. У самки они представлены одинаковыми палочковидными хромосомами (XX). Половые хромосомы самцов имеют различное строение.



Рис. 33. Диплоидные наборы хромосом дрозофилы:

A — самца; *B* — самки; *I, II, III, IV* — пары гомологичных хромосом

Одна половая хромосома гомологична X-хромосоме, другая — заметно отличается от нее (Y-хромосома). Остальные 3 пары хромосом называются аутосомами.

Удобный объект для изучения функциональной морфологии хромосом — политенные хромосомы

слюнных желёз. Каждая из них крупная, сильно деспирализованная, образовалась в результате многократной репликации и состоит более чем из 1000 нитей, благодаря чему в ней четко проявляется закономерное чередование интенсивно окрашенных дисков. Эти диски образованы соответствующими хромомерами многих нитей.

Политенные хромосомы находятся в состоянии соматической конъюгации, т. е. объединены попарно. Поэтому в клетках слюнных желёз обычно просматривается гаплоидное число хромосом. Гетерохроматиновые участки всех политенных хромосом объединяются в один хромоцентр, причем у самцов в хромоцентр входит Y-хромосома и поэтому ее не видно (рис. 34).

Выполнение задания. 1. Извлечь из стаканчика личинки, ползающие перед окукливанием по его стенкам.

2. Поместить личинку на предметное стекло в каплю физиологического раствора или раствора 0,73 %-ной NaCl.

3. Извлечь из личинки слюнные железы. Для этой цели стекло с личинками установить на столик бинокулярной лупы или микроскопа МБС-1. В обе

руки взять по препаровальной игле. Иглой, находящейся в левой руке, сильно прижать к стеклу ротовую часть личинки (она имеет черное хитиновое образование). Второй иглой, находящейся в правой руке, надавить на середину тела и отделить голову. Как только она отделится, можно увидеть 2 слюнные железы, состоящие из прозрачных клеток, внутри которых находятся политенные хромосомы.

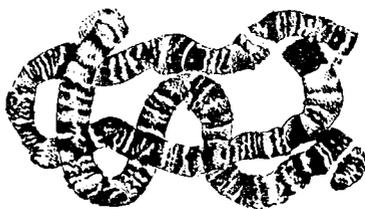


Рис. 34. Политенные хромосомы дрозофилы

4. Слюнные железы отделить от лишних тканей, убрать фильтровальной бумагой раствор NaCl и нанести 1...2 капли ацетоорсеина на 15...20 мин.

5. Избыток краски удалить фильтровальной бумагой, нанести каплю сахарного сиропа, накрыть покровным стеклом и осторожно раздавить.

6. Препарат просмотреть под микроскопом и зарисовать политенные хромосомы. Обратит внимание на хромоцентр и расположение хромосом. Хорошо приготовленный препарат следует окантовать маникюрным лаком и соответствующим образом оформить.

7. При увеличении 15×40 зарисовать участок отдельной хромосомы, тщательно соблюдая последовательность расположения и особенности строения отдельных дисков.

Изучение мутантов

Задание. 1. Внимательно рассмотреть мужские и женские особи мух дикого типа. 2. Ознакомиться с основными мутантами дрозофилы, используемыми для скрещиваний. 3. Описать мутанты. 4. Изучить основные обозначения, принятые в генетике при работе с дрозофилой.

Материал и оборудование. 1. Оборудование, необходимое для работы с дрозофилой. 2. Мухи дикого типа. 3. Коллекция мутантных линий.

Пояснения к заданию. У дрозофилы наиболее часто подвергаются мутационным изменениям такие признаки, как форма и окраска глаз, форма и характер развития крыльев, окраска тела, строение щетинок. Для занятий удобнее брать мутантов с четко выраженными признаками, например с желтой или черной окраской тела (в отличие от серой окраски дикого типа), с белой, коричневой, ярко-красной окраской глаз, с недоразвитыми крыльями (рис. 35) и т. д.

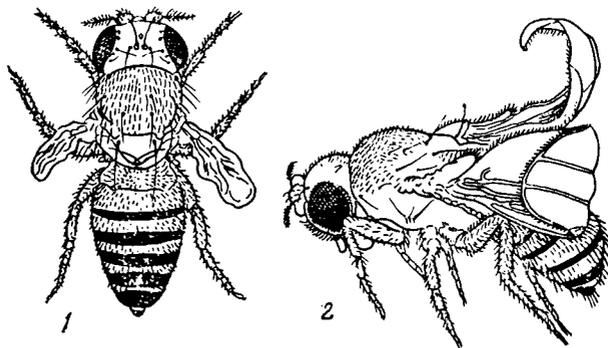


Рис. 35. Форма и строение крыльев у мутантов дрозофилы:
1 — мутант *vestigial* (вестиджел — недоразвитые крылья); 2 — мутант *curved* (курвэд — загнутые крылья)

У дрозофилы принята следующая система обозначения генов. Нормальное состояние гена у дрозофилы независимо от того, доминантный он или рецессивный, принято обозначать знаком + (вместо *A* или *a*). Соответствующие мутантные гены обозначают первыми буквами названия мутанта.

Например, рецессивный ген, определяющий недоразвитые крылья — *vestigial*, обозначают *vg*; рецессивный ген, определяющий темную окраску тела — *ebony*, буквой *e*; доминантный признак — лопастные глаза — *Lobe*, буквой *L* и т. д.

Схему скрещиваний записывают с учетом этих обозначений. Например, скрещивание нормальных мух с му-

хами, имеющими недоразвитые крылья (vestigial) записывают следующим образом:

$$\text{♀ } \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{vg}{vg}.$$

Схему скрещивания мух с лопастными глазами (Lobe) с мухами дикого типа записывают следующим образом:

$$\text{♀ } \frac{L}{L} \times \text{♂ } \frac{+}{+}.$$

При дигибридном скрещивании часто пишут названия мутантов, подразумевая, что другие признаки такие же, как у особей дикого типа. Например пишут: скрещивается мутант *ebony* × *vestigial*.

Это значит, что мутант *vestigial* имеет нормальную серую окраску тела и недоразвитые крылья, а у мутанта *ebony* окраска тела темная, крылья развиты нормально. Схема записи скрещивания, если гены находятся в разных хромосомах, как в данном случае, будет следующая:

$$\text{♀ } \frac{+}{+} \frac{e}{e} \times \text{♂ } \frac{vg}{vg} \frac{+}{+}.$$

Если гены находятся в одной хромосоме, как например лопастные глаза *Lobe* и недоразвитые крылья *vestigial*, форма записи будет несколько иной:

$$\text{♀ } \frac{+}{+} \frac{+}{+} \times \text{♂ } \frac{vg L}{vg L}.$$

При подборе пар для скрещивания необходимо знать, в какой хромосоме локализован ген, определяющий данный признак, доминантен или рецессивен этот признак по отношению к дикому типу и т. д. Список мутантов, рекомендуемых для занятий, приведен в табл. 51.

Выполнение задания. 1. Перенести мух, предназначенных для изучения, в эфиризатор и усыпить их.

2. Усыпленных мух поместить на матово-белое стекло и внимательно рассмотреть под лупой. Брать усыпленных мух можно только глазным пинцетом за крылышки или ножки (если особи бескрылые). Для более тонкого определения признаков (например, окраски глаз) мух следует расположить в ряд на матово-белом стекле и сортировать по отношению к источнику света.

3. Пользуясь табл. 51, дать подробное описание изучаемых мутантов.

Т а б л и ц а 51. Мутанты, рекомендуемые для занятий

Мутант	Обозначение гена	Доминантный или рецессивный признак	В какой хромосоме локализован ген	Характерные отличия от мух дикого типа	Для каких исследований рекомендуется использовать
vestigial (вестиджел)	<i>vg</i>	Рецессивный	II	Недоразвитые крылья	Моно- и дигибридное скрещивание
brown (браун)	<i>bw</i>	»	II	Коричневые глаза	То же
ebony (эбони)	<i>e</i>	»	III	Черная окраска тела	Моно- и дигибридное скрещивание, комплементарность
curved (курвед)	<i>c</i>	»	III	Растопыренные, поднятые и закрученные крылья	Моногибридное скрещивание
Lobe (лобе)	<i>L</i>	Доминантный	II	Глаза лопастные, уменьшенные	»
cinabar (циннабар)	<i>cn</i>	Рецессивный	II	Глаза яркой кинобарной окраски	Моно- и дигибридное скрещивание
black (блек)	<i>b</i>	»	II	Черная окраска тела	Моно- и дигибридное скрещивание, комплементарность
scarlet (скарлет)	<i>st</i>	»	III	Багряно-красные глаза	То же

О к о н ч а н и е т а б л. 51

Мутант	Обозначение гена	Доминантный или рецессивный признак	В какой хромосоме локализован ген	Характерные отличия от мух дикого типа	Для каких исследований рекомендуется использовать
Bar (бар) white (вайт) yellow (еллоу)	B w	Доминантный Рецессивный »	I I I	Полосковидные глаза Белые глаза Желтая окраска тела	Наследование признаков, сцепленных с полом То же Наследование признаков, сцепленных с полом, кроссинговер
black-vestigial (блек-вестиджел) black-cinnabar-vestigial (блек-циннабар-вестиджел)	bv bcvg	» »	II II	Черная окраска тела, недоразвитые крылья Черная окраска тела, недоразвитые крылья, яркие киноварные глаза	Кроссинговер »
yellow-cut-ve-milion (еллоу-кат-вермилион)	ycv	»	I	Желтая окраска тела, изрезанный край пластинки крыла, ярко-красные глаза	Кроссинговер в половой хромосоме

Моногибридное скрещивание у дрозофилы

Задание. 1. Отобрать девственных самок. 2. Поставить скрещивание в соответствии с разработанным заданием. 3. Получить F_1 и проанализировать его. 4. Поставить на скрещивание мух F_1 . 5. Получить F_2 и проанализировать его.

Материал и оборудование. 1. Стаканчики со средой — по 2 на каждого студента для получения F_1 и по 4...6 для получения F_2 . 2. Соответствующие мутанты и мухи дикого типа. 3. Оборудование, необходимое для работы с дрозофилой (см. с. 159).

Пояснения к заданию. Отбор девственных самок. Для постановки опытов по скрещиванию необходимо в качестве материнских форм брать заведомо девственных самок не старше 8...10 ч после вылупления. С этой целью в пробирках, где идет размножение соответствующих линий мух, удаляют родительские особи и вылетевших из куколок мух. Через 6...8 ч пробирки или стаканчики просматривают, и если появились молодые мухи, их усыпляют, отделяют самцов от самок, помещают в отдельные пробирки с питательной средой. Там они могут находиться в течение 2...4 сут. По мере надобности их используют для скрещивания.

При проведении занятий эту работу удобно организовать следующим образом. За 4...8 ч до начала занятий из пробирки удаляют всех мух. Пробирку с куколками ставят в термостат с температурой 24...26° С на 4...8 ч. Мух, вылетевших из куколок за этот период, используют для скрещивания.

Желательно в каждом случае ставить рецiproкные (прямые и обратные) скрещивания. Гибриды F_1 , как и обычные линии, размножаются внутри себя без отбора девственных самок, поэтому после анализа гибридов F_1 самцов и самок помещают в пробирки со свежей средой для получения F_2 . На протяжении всего опыта, а он от момента постановки скрещивания и до получения F_2 продолжается 20...24 дня, следует внимательно следить за состоянием мух и обеспечить все условия для их нормального развития.

При проведении моногибридного скрещивания в качестве одной из родительских форм следует взять линию дикого типа Normal, а в качестве второй родительской формы можно взять одного из мутантов — Lobe, vestigial, cinnabar, ebony, brown, curved и др. (см. табл. 51).

Весьма удобно провести следующие реципрокные скрещивания, позволяющие изучить наследование доминантных и рецессивных признаков:

- ♀ Normal × ♂ Lobe
- ♀ Lobe × ♂ Normal
- ♀ vestigial × ♂ Normal
- ♀ Normal × ♂ vestigial

Выполнение задания. 1. Вначале следует составить схему и определить теоретически ожидаемое наследование признаков F_1 и F_2 (табл. 52).

Таблица 52. Схема моногибридного скрещивания

♀ Lobe × ♂ Normal

$PP: \text{♀} \frac{L}{L} \times \text{♂} \frac{+}{+}$

Гаметы $PP: \text{♀} \underline{L} \times \text{♂} \underline{+}$

$F_1 \frac{L}{+}$

Гаметы F_1

	♂	<u>L</u>	<u>+</u>
♀		<u>L</u>	<u>L</u>
	<u>L</u>	$\frac{L}{L}$	$\frac{L}{+}$
	<u>+</u>	$\frac{L}{+}$	$\frac{+}{+}$

♀ vestigial × ♂ Normal

$PP: \text{♀} \frac{vg}{vg} \times \text{♂} \frac{+}{+}$

Гаметы $PP: \text{♀} \underline{vg} \times \text{♂} \underline{+}$

$F_1 \frac{+}{vg}$

Гаметы F_1

	♂	<u>+</u>	<u>vg</u>
♀		<u>+</u>	<u>vg</u>
	<u>+</u>	$\frac{+}{+}$	$\frac{vg}{+}$
	<u>vg</u>	$\frac{+}{vg}$	$\frac{vg}{vg}$

2. В соответствии с подобранной комбинацией скрещивания 2...3 девственные самки поместить вместе с 3...5 самцами в стаканчик со свежей средой.

3. Через 10...12 дней после постановки опыта, когда в стаканчике начнется массовый вылет мух F_1 , их следует усыпить и проанализировать. Все они как в прямом, так и в обратном скрещивании будут одинаковыми по признаку формы глаз — глаза у них будут лопастными, как и у доминантного родителя. Если скрещивают мух дикого типа с рецессивным мутантом vestigial, то в F_1 они все будут иметь нормальные крылья.

4. В каждой комбинации для получения F_2 следует среди анализируемых мух F_1 отобрать 2...3 самки и 3...5 самцов и поместить в пробирки со свежей средой.

В каждой комбинации для получения F_2 поставить по 2...3 пробирки и более.

5. Через 10...12 дней в стаканчиках начинается массовый вылет мух F_2 . Их следует усыпить в эфиризаторе и проанализировать на матово-белом стекле. При внимательном просмотре отделить и подсчитать мух с лопастными глазами (Lobe). В соответствии со схемой опыта (табл. 52) их будет примерно $\frac{3}{4}$ от общего числа. Затем отделить и подсчитать мух с нормальными глазами. Их будет примерно $\frac{1}{4}$ от общего числа. Результаты подсчета занести в таблицу (табл. 53).

Таблица 53. Результаты гибридологического анализа при моногибридном и возвратном скрещивании

Линия или гибрид дрозофилы	Проанализировано особей			Расщепление	
	Всего	В том числе		теоретически ожидаемое	фактически полученное
		Lobe	Normal		
♀ Normal	3	Нет	3	—	—
♂ Lobe	5	5	Нет	—	—
F_1 Normal × Lobe	82	82	Нет	Единообразие	
F_2 Normal × Lobe	320	240	80	3 : 1	3 : 1
Беккроссы: F_1 × Lobe	135	135	Нет	Не ожидается	Нет
F_1 × Normal	148	74	74	1 : 1	1 : 1

6. Одновременно можно провести опыт по возвратному скрещиванию. Для этого в F_1 отобрать девственных самок и поместить их в пробирки вместе с самцами одной из родительских форм (доминантной или рецессивной).

Анализ мух от возвратного скрещивания F_1 с доминантной родительской формой показывает, что все они имеют лопастные глаза, как и мутанты Lobe. В скрещивании F_1 с рецессивной родительской формой (анализирующее скрещивание) $\frac{1}{2}$ часть мух имеет лопастные глаза, а $\frac{1}{2}$ — нормальные. Такой результат скрещивания свидетельствует о том, что мухи F_1 гетерозиготны.

Таким же образом могут быть проведены скрещивания и проанализированы гибриды Normal с любым мутантом, у которого соответствующий ген локализован в I, II, III или IV хромосомах.

Дигибридное скрещивание

Задание. 1. Подобрать мутанты для скрещивания. 2. Отобрать девственных самок. 3. Произвести скрещивание. 4. Проанализировать гибриды F_1 . 5. Поставить на скрещивание гибриды F_1 для получения F_2 . 6. Проанализировать F_2 .

Материал. 1. Стаканчики со свежеприготовленной средой. 2. Мутанты *ebony* и *vestigial*.

Пояснения к заданию. Непременное условие свободной рекомбинации генов в F_2 при дигибридном скрещивании — локализация их в разных хромосомах. Для этого скрещивания, например, удобно взять рецессивного мутанта с зачаточными крыльями *vestigial* (ген *vg* локализован во II хромосоме). Окраска тела у этого мутанта серая (*Normal*). Вторым компонентом скрещивания можно взять мутанта с темной окраской тела и нормальными крыльями — *ebony*. Ген *e*, определяющий темную окраску тела, локализован в III хромосоме. Кроме того, можно для дигибридных скрещиваний рекомендовать и другие комбинации:

♀ *Normal* × ♂ *ebony* = *vestigial*

♀ *cinnabar* × ♂ *ebony*

♀ *black* × ♂ *curved*

Схему скрещивания мутантов записывают следующим образом:

$$\text{♀ } \frac{+}{+} \frac{e}{e} \times \text{♂ } \frac{vg}{vg} \frac{+}{+}.$$

Выполнение задания. 1. Составить схему скрещивания по типу табл. 52 и определить теоретически ожидаемое расщепление.

2. Отобрать 2...3 девственных самки *ebony* и поместить в стаканчик со свежей средой с 3...5 самцами *vestigial*.

3. Через 10...12 сут после постановки скрещивания, когда в стаканчике начинается массовый вылет мух F_1 , их следует усыпить и проанализировать. Все они как при прямом, так и при обратном скрещивании будут иметь нормальную серую окраску тела и нормально развитые крылья. Результаты подсчета следует записать в табл. 54.

4. В каждой комбинации F_1 следует отобрать по 2...3 женские особи и по 5...6 мужских и поместить их в пробирки с питательной средой для получения F_2 .

Желательно для получения F_2 в каждой комбинации поставить по 3...5 пробирок на каждого студента.

5. Через 10...12 дней в стаканчиках начинается массовый вылет мух F_2 . Их следует усыпить в эфиризаторе

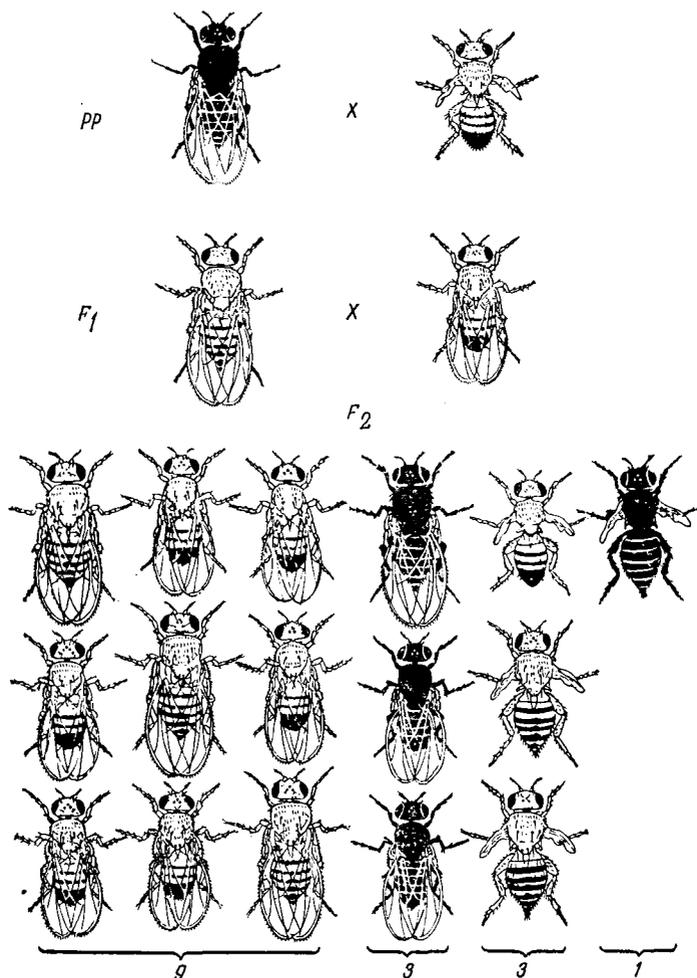


Рис. 36. Дигибридное скрещивание ♀ *ebony* × ♂ *vestigial*

и анализировать на матово-белом стекле. При внимательном просмотре отделить и подсчитать мух с нормальными крыльями и серым телом, затем — мух с нормальными

крыльями и черным телом, с недоразвитыми крыльями и серым телом и с недоразвитыми крыльями и черным телом. Результаты занести в таблицу (табл. 54).

Таблица 54. Результаты гибридологического анализа при дигибридном скрещивании ♀ *ebony* × ♂ *vestigial*

Линии и гибриды	Получено мух					Расщепление	
	всего	в том числе				теоретически ожидаемое	фактически полученное
		Normal	<i>ebony</i>	<i>vestigial</i>	<i>ebony-vestigial</i>		
♀ <i>ebony</i>	3	—	3	—	—	—	
♂ <i>vestigial</i>	5	—	—	5	—	—	
<i>F</i> ₁ <i>ebony</i> × <i>vestigial</i>	104	104	0	0	0	Единообразие	
<i>F</i> ₂ <i>ebony-vestigial</i>	466	260	90	87	29	9 : 3 : 3 : 1 8,9 : 3,1 : : 3 : 1	

Анализ *F*₁ по фенотипу показывает, что все мухи имеют серое тело и нормальные крылья (рис. 36). Следовательно, признаки черной окраски тела и недоразвитых крыльев — рецессивны. По генотипу они гетерозиготны. В *F*₂ наблюдается расщепление, которое соответствует теоретически ожидаемому: $\frac{9}{16}$ Normal, $\frac{3}{16}$ *ebony*, $\frac{3}{16}$ *vestigial* и $\frac{1}{16}$ *ebony* — *vestigial*.

Взаимодействие неаллельных генов

Задание. 1. Подобрать мутантов дрозофилы для скрещивания. 2. Составить схему скрещивания и определить теоретически ожидаемое расщепление в *F*₂. 3. Отобрать девственных самок и провести скрещивание. 4. Проанализировать *F*₁ и подобрать пары для получения *F*₂. 5. Проанализировать *F*₂.

Материал. 1. Стаканчики со свежеприготовленной средой. 2. Мутанты *ebony* и *black*.

Пояснения к заданию. У дрозофилы в наследовании ряда признаков довольно четко проявляется комбинаторный тип взаимодействия генов, когда одновременно наличие двух неаллельных генов в генотипе обуславливает развитие нового признака.

Для изучения этого явления удобнее всего взять для скрещивания 2 мутантов с черной окраской тела. Черная

окраска тела у дрозофилы может быть обусловлена различными генами: либо геном *ebony*, локализованным в III хромосоме, либо геном *black*, локализованным во II хромосоме. Каждый из этих генов рецессивен по отношению к гену *Normal*, обуславливающему серую окраску тела. При скрещивании мутантов *ebony* × *black*, имеющих черную окраску тела, все особи F_1 имеют серую окраску тела, что может быть обусловлено только одновременным присутствием двух этих генов; в F_2 наблюдается расщепление в отношении $9/16$ серых, $7/16$ — черных.

Для изучения взаимодействия генов могут быть проведены скрещивания также между мутантами *brown* × *scarlet* и *Lobe* × *eyeless*.

Мутант *brown* имеет коричневую окраску глаз, а *scarlet* — ярко-красную. В результате скрещивания *brown* × *scarlet* в F_1 все мухи будут иметь окраску глаз, свойственную дикому типу, а в F_2 будет 4 фенотипа мух: красноглазые (*Normal*), типа *brown*, типа *scarlet* и белоглазые (*white*).

Мутанты *Lobe* и *eyeless* имеют различную степень редукции глаз. Ген *Lobe* локализован во II, а ген *eyeless* — в IV хромосомах. Анализ F_2 *Lobe* × *eyeless* показывает, что $3/16$ мух имеют нормальные глаза, а $13/16$ — глаза в различной степени редуцированные, в зависимости от того, находится ли в генотипе только ген *L*, либо только ген *ey*, либо оба вместе.

Выполнение задания. 1. Подобрать мутантные линии.

2. Составить схему скрещивания и определить теоретически ожидаемое расщепление.

3. В соответствии с подобранной комбинацией подобрать 2...3 виргинные самки *ebony* и поместить в стаканчик со свежей средой с 3...5 самцами *black*.

4. Через 10...12 сут после постановки скрещивания, когда в стаканчике будет наблюдаться массовый вылет мух F_1 , их следует усыпить и проанализировать. Все они как в прямом, так и в обратном скрещивании будут иметь нормальную серую окраску тела. Результаты скрещивания следует записать в табл. 55.

5. В каждой комбинации F_1 следует отобрать по 2...3 женские особи и 5...6 мужских и поместить в чистые пробирки со свежей питательной средой для получения F_2 .

6. Через 10...12 дней в стаканчиках начнется массовое вылупление мух F_2 . Их усыпить в эфиризаторе и проана-

лизовать на матово-белом стекле. При внимательном просмотре отделить и подсчитать мух с серой и отдельно — с черной окраской тела. Результаты занести в табл. 55.

Т а б л и ц а 55. Результаты гибридологического анализа F_2 от скрещивания ebony \times black

Линии и гибриды	Проанализировано мух			Расщепление	
	Всего	В том числе		теорети-чески ожидаемое	фактиче-ски полу-ченное
		серых	черных		
♀ ebony	3	Нет	3	Нет	Нет
♂ black	5	»	5	»	»
F_1 ebony \times black	168	168	Нет	Единообразие	
F_2 ebony \times black	548	308	240	9 : 7	9 : 7

В F_2 в соответствии со схемой расщепления теоретически должно быть: 9 Normal : 3 ebony : 3 black : 1 ebony-black.

Фенотипически все особи ebony, black и ebony-black, имеющие черную окраску тела, не отличимы, поэтому по фенотипу расщепление будет $9/16$ серых : $7/16$ черных.

Сцепленное наследование

Задание. 1. Провести скрещивание Normal \times black-vestigial. 2. Гибриды первого поколения проанализировать и скрестить с рецессивным родителем black-vestigial. 3. Составить схему скрещивания и определить теоретически ожидаемое расщепление. 4. Проанализировать мух F_2 и определить соответствие теоретически ожидаемого расщепления фактически полученному.

Материал. 1. Стаканчики со свежеприготовленной средой. 2. Мухи Normal и black-vestigial.

Пояснения к заданию. Т. Морган сформулировал закон сцепленного наследования, согласно которому гены, локализованные в одной хромосоме, наследуются совместно, так как в мейозе они обязательно попадают в одну гамету. Число групп сцепления соответствует гаплоидному числу хромосом данного вида. У дрозофилы изучено более 500 генов. Все они локализованы в 4 парах хромосом.

Сцепленное наследование генов, находящихся в одной хромосоме, нарушается вследствие конъюгации гомоло-

гичных хромосом и обмена участками между ними (кроссинговера). В результате кроссинговера происходит перегруппировка исходных комбинаций признаков. Так, у мух гены, определяющие черную окраску тела (black) и недоразвитые крылья (vestigial), находятся во II хромосоме и наследуются совместно. Но среди гибридных особей могут появиться мухи с черным телом и нормальными крыльями и мухи с серым телом и недоразвитыми крыльями (рис. 37), что свидетельствует о наличии перекрестка хромосом.

Гаметы, зиготы и взрослые особи, возникшие в результате перекрестка хромосом, называются кроссоверными, или кроссоверами. Число кроссоверных особей свидетельствует о величине расстояния между данными генами в хромосоме: чем больше кроссоверных особей, тем дальше гены расположены в хромосоме один от другого.

Наличие перекрестка между генами принято обозначать вертикальной линией. Например, кроссинговер между генами *b* и *vg* обозначают как *b/vg*.

Величину перекрестка вычисляют в процентах к общему числу потомков в данной комбинации. Мерой расстояния между генами является участок хромосомы, в пределах которого наблюдается 1% кроссинговера.

Для проведения занятий по установлению процента перекрестка и расстояния между генами в хромосоме удобнее всего взять комбинацию Normal × vestigial-black.

Кроме того, для изучения кроссинговера в половой хромосоме можно взять девственную самку с желтой окраской тела (yellow) с вырезанным краем крыла (cut) и глазами киноварного цвета (vermilion) и скрещивать ее с нормальным самцом (Normal).

Для изучения кроссинговера во II хромосоме можно взять комбинацию ♀ black-cinnabar-vestigial × ♂ Normal.

Выполнение задания. Методика та же, что и при дигибридном скрещивании, только гибридные особи F_1 следует обязательно скрещивать с соответствующим рецессивным мутантом, т. е. провести анализирующие скрещивания. Схема теоретически ожидаемого расщепления при предполагаемом полном сцеплении в комбинации ♀ Normal × ♂ black-vestigial приведена ниже.

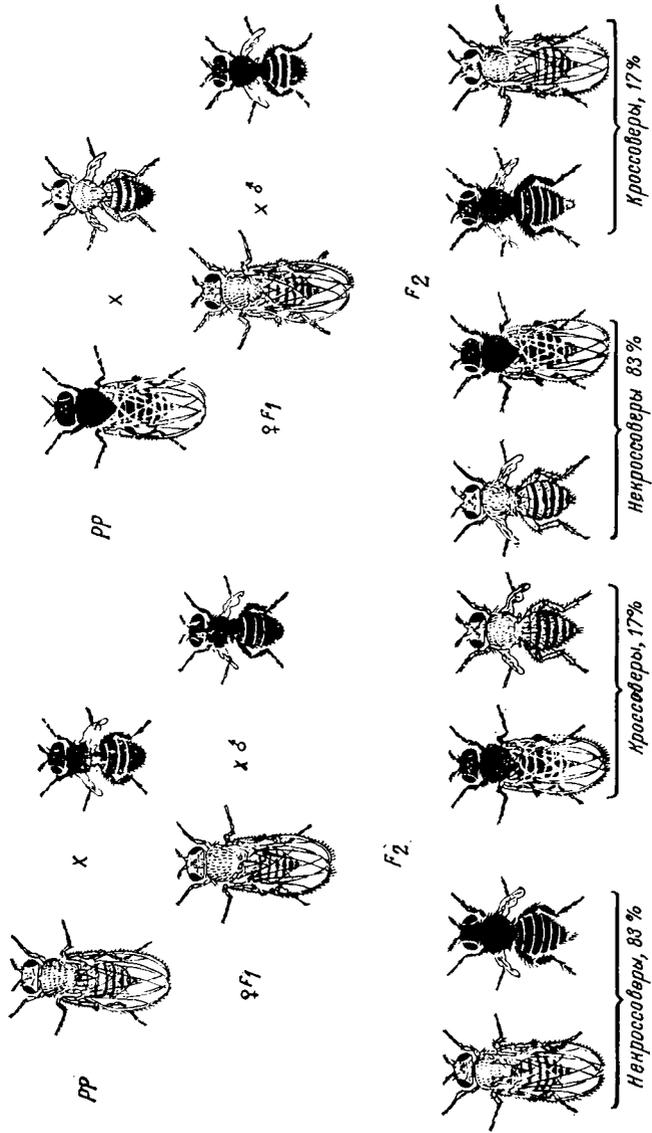
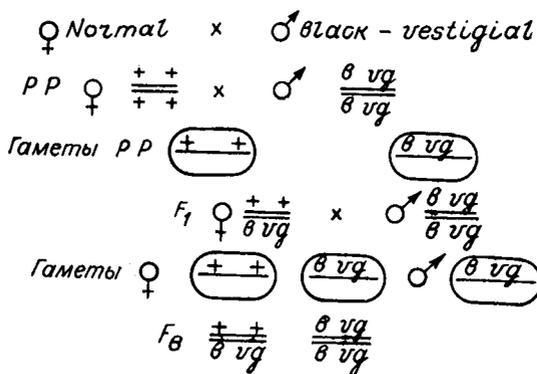


Рис. 37. Неполное сцепление признаков как результат кроссинговера

Теоретически ожидаемое расщепление при скрещивании



Расщепление: 1 Normal : 1 black-vestigial.

Анализ фактически полученных мух показывает (табл. 56), что в F_1 все особи имеют серую окраску тела и нормально развитые крылья. Гибридных мух, полученных от скрещивания F_1 с рецессивным мутантом black-vestigial, раскладывают на группы по окраске тела и характеру развития крыльев. Хотя в соответствии с теоретически ожидаемым в данной комбинации при анализирующем скрещивании должно быть только 2 клас-

Т а б л и ц а 56. Анализ гибридов Normal \times black-vestigial при неполном сцеплении признаков

Линия, гибрид	Проанализированных мух					Расщепление	
	Всего	В том числе				теоретически ожидаемое	фактически полученное
		Normal	black-vestigial	black	vestigial		
♀ Normal	3	3	—	—	—	—	
♂ black-vestigial	5	—	5	—	—	—	
F_1 Normal \times black-vestigial	116	116	Нет	Нет	Нет	Единообразие	
$F_{\theta} F_1 \times$ black-vestigial	420	175	174	36	35	1 : 1 : 5 : 5 : : 1 : 1	
Итого, %	100	41,7	41,3	8,5	8,5		
		83%		17%			

са мух — Normal и black-vestigial, обычно в небольшом количестве оказываются особи и других классов — black и vestigial.

Появление в анализирующем скрещивании двух дополнительных классов мух (17% от общего числа особей) свидетельствует о том, что в мейозе у самок произошел кроссинговер между гомологичными хромосомами второй пары хромосом, в которой локализованы гены black и vestigial. Частота кроссинговера равна 17%, следовательно, расстояние между генами black и vestigial у дрозофилы составляет 17 единиц (морганид).

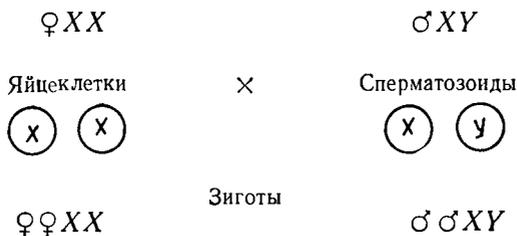
Наследование пола и признаков, сцепленных с полом

Задание. 1. Познакомиться с половыми хромосомами и определением пола у дрозофилы. 2. Провести скрещивание ♀ Normal × ♂ white, ♀ white × ♂ Normal. 3. Составить схему теоретически ожидаемого расщепления. 4. Проанализировать F_1 и поставить их на скрещивание для получения F_2 . 5. Получить мух F_2 и проанализировать их.

Материал. 1. Стаканчики со свежеприготовленной средой. 2. Мухи линий Normal и white.

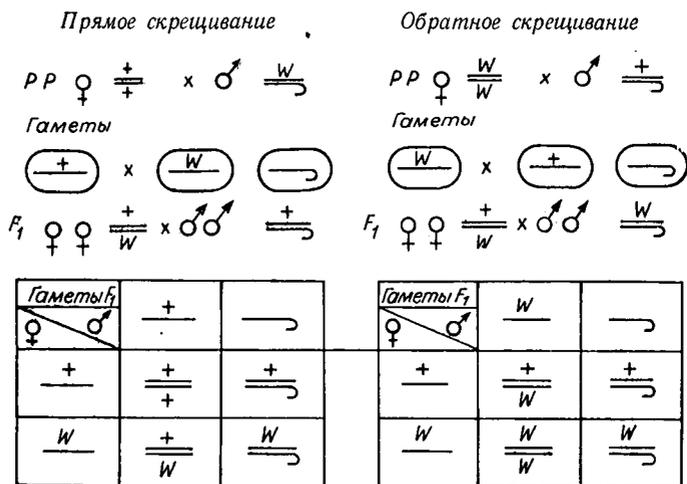
Пояснения к заданию. Самки дрозофилы гомогаметны: они содержат 2 одинаковые половые хромосомы, составляющие первую пару и называемые X-хромосомами. Самцы гетерогаметны: они содержат 2 хорошо различимые половые хромосомы (см. с. 162, рис. 33). Одна из них идентична женской половой хромосоме (X-хромосома), а другая — Y-хромосома, обозначаемая иногда γ . Y-хромосома доминантна в определении пола.

Наследование пола у дрозофилы осуществляется по следующей схеме:



Гомогаметные по половым хромосомам самки образуют только один тип гамет — X, а гетерогаметные самцы образуют 2 типа гамет — X и Y. В результате оплодотворения образуются самки с генотипом XX и самцы с генотипом XY. Такой механизм наследования пола обеспечивает наличие в популяции одинакового числа женских и мужских особей (табл. 57).

Т а б л и ц а 57. Наследование пола и признаков, сцепленных с полом



Y-хромосома генетически инертна. В X-хромосоме локализован ряд генов — white, yellow, Bar и др., которые наследуются сцепленно с полом. Учтывая, что у самцов Y-хромосома генов не содержит, всякий ген, локализованный в X-хромосоме, независимо от того, доминантный он или рецессивный, проявляется так, как будто он находится в гомозиготном состоянии. Например, все самцы, у которых в X-хромосоме локализован рецессивный ген white, будут белоглазыми. Подобное состояние генов называется гемизиготным.

Для изучения наследования признаков, сцепленных с полом, рекомендуется взять мух с генотипом Normal и скрещивать либо с рецессивными мутантами white или yellow, либо с доминантным мутантом Bar и др.

Ниже приводится схема наследования пола и сцепленного с полом признака как при прямых, так и при обратных скрещиваниях (табл. 58).

Таблица 58. Результат гибридологического анализа при наследовании пола и признаков, сцепленных с полом

Линии и гибриды	Проанализировано мух					Расщепление по окраске глаз	
	Всего	В том числе				теоретически ожидаемое	фактически полученное
		♀ (самок)	♂ (самцов)	Normal	white		

Прямое скрещивание

♀ Normal	3	3	—	3	—	—	—
♂ white	5	—	5	—	5	—	—
F_1 Normal × white:	126	63	63	126	Нет	Единообразие	
самки	63	63	—	63	—		
самцы	63	—	63	63	—		
F_2 Normal × white:	146	73	73	100	37	3 : 1	3 : 1
самки	73	73	—	73	Нет	Не	Нет
самцы	73	—	73	36	37	ожи- дается 1 : 1	1 : 1

Обратное скрещивание

♀ white	3	3	—	—	—	—	—
♂ Normal	5	—	5	—	—	—	—
F_1 white × Normal:	180	90	90	90	90	1 : 1	1 : 1
самки	90	90	—	90	—	Не	Нет
самцы	90	—	90	—	90	ожи- дается То же	
F_2 white × Normal	264	132	132	132	132	1 : 1	1 : 1
самки	132	132	—	66	66	1 : 1	1 : 1
самцы	132	—	132	66	66	1 : 1	1 : 1

Из этой схемы следует, что в F_1 и в F_2 как при прямом, так и при обратном скрещивании соотношение мужских и женских особей будет одинаково — 1 : 1. Наследование окраски глаз зависит от генотипов материнской и отцовской особей. При прямом скрещивании, когда материнская особь Normal, а отцовская — white, все мухи F_1 имеют красные глаза, присущие материнским особям. В F_2 по окраске глаз наблюдается расщепление 3 : 1.

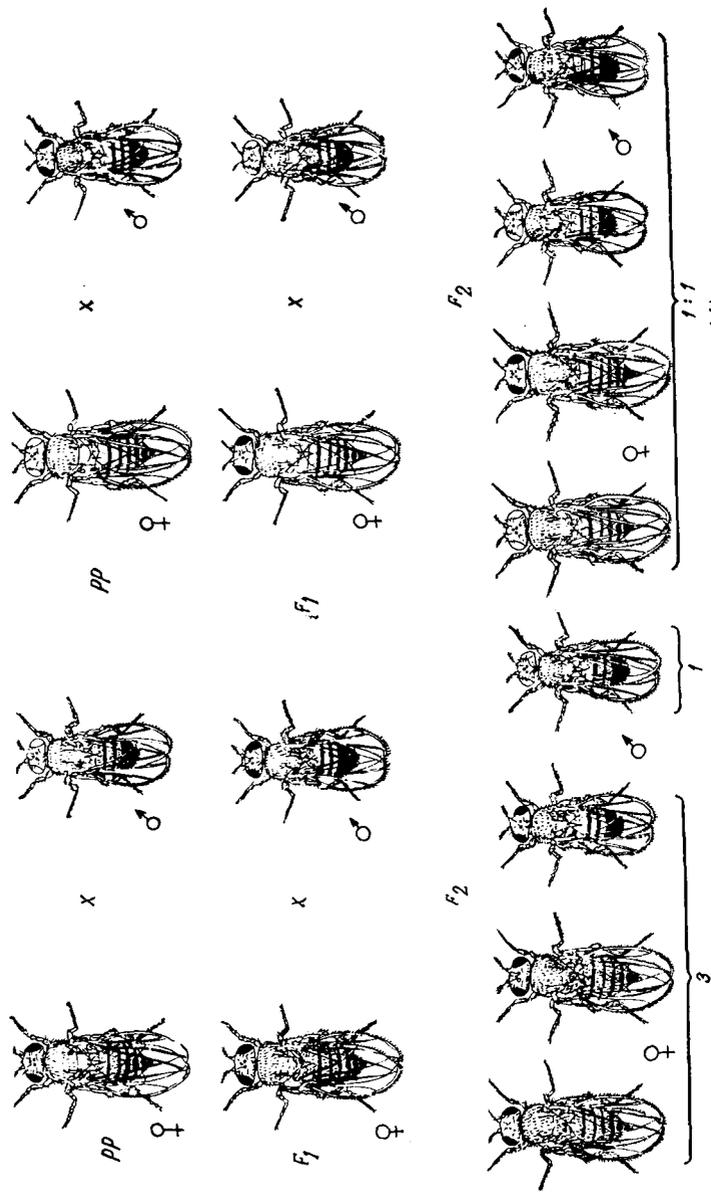


Рис. 38. Наследование сцепленного с полом гена white

Причем все самки имеют красные глаза, а у самцов — 50% особей красноглазых и 50% — белоглазых.

При обратном скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами в F_1 все самки имеют красные глаза, а самцы — белые (рис. 38). В F_2 по окраске глаз наблюдается расщепление 1 : 1. Причем как у самок, так и у самцов 50% особей имеет красные, 50% — белые глаза.

Выполнение задания. Задание выполняется в том же порядке, что и при обычном моногибридном скрещивании. Только при анализе F_1 и F_2 сначала отделяют самцов от самок, а затем подсчитывают число белоглазых и красноглазых особей в каждой группе. Результаты анализа записывают в таблицу (табл. 58).

Анализ мух F_1 и F_2 показывает, что фактически полученные результаты полностью соответствуют теоретически ожидаемым.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА

Работа с микроскопом

Задание. 1. Ознакомиться с устройством микроскопа. 2. Установить микроскоп в рабочее положение. 3. Освоить работу с иммерсионной системой.

Материал и оборудование. 1. Постоянный препарат. 2. Микроскоп. 3. Осветитель. 4. Иммерсионное масло.

Пояснения к заданию. Для проведения цитологических исследований в генетике чаще всего пользуются микроскопами МБР-3, МБИ-3 или МБИ-6, МБИ-15. Для занятий лучше всего использовать микроскопы МБР-1 или МБР-3.

К микроскопу типа МБР-3 должен быть придан осветитель ОИ-19, обеспечивающий оптимальное освещение препарата. Микроскоп соединяется с осветителем соединительной планкой.

Осветитель ОИ-19 состоит из корпуса и зажимного устройства, с помощью которого корпус осветителя закрепляется на вертикальной колонке в определенном положении. Источником света в осветителе служит специальная лампочка СУ-61 (8 В, 20 Вт), которая питается через понижающий трансформатор. Для регулировки накала лампочки в корпусе трансформатора имеется реостат с рукояткой, а для включения тока — выключатель.

Выполнение задания. 1. Установить микроскоп в удобное для работы положение. Бинокулярную насадку привести также в положение, удобное для глаз работающего (сдвинуть или раздвинуть окуляры).

2. Тщательно протереть чистой мягкой тряпочкой и специальной кисточкой все части микроскопа — окуляры, объектив, зеркало и др.

3. Правильно установить объективы в револьвере. Они должны стоять последовательно ($\times 9$, $\times 40$, $\times 90$) по часовой стрелке.

4. С помощью соединительной планки установить осветитель ОИ-19 перед микроскопом и через трансформатор включить его в сеть. Поворачивая корпус осветителя, направить световой поток на плоское зеркало. С помощью зеркала направить свет в объектив.

5. Поместить исследуемый препарат в препаратодоводитель и сфокусировать его при объективе $\times 9$.

6. Конденсор микроскопа поднять в верхнее положение и закрыть полевую диафрагму. Отверстие диафрагмы осветителя уменьшить до 1...2 мм. На плоское зеркало положить листок белой бумаги. Перемещая лампочку вдоль оси, добиться четкого изображения нити лампочки на бумаге.

7. Снять бумагу с зеркала и, двигая корпус осветителя, переместить изображение нити лампочки в центр полевой диафрагмы.

8. Слегка перемещая вверх и вниз конденсор, получить резкое изображение диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа (она имеет вид окружности ярко освещенного кружка).

9. Слегка поворачивая зеркало, установить изображение диафрагмы осветителя в центре поля зрения микроскопа. После этого диафрагму осветителя следует немного открыть (диаметр около 1,5 см).

10. Опустить конденсор, чтобы обеспечить равномерное освещение всего поля зрения.

11. Чтобы определить оптимальный диаметр отверстия полевой диафрагмы, ее вначале нужно закрыть полностью, а затем, глядя в окуляр, слегка приоткрыть, чтобы ее края совпадали с краями задней линзы объектива.

12. Еще раз проверить фокусировку объекта при объективе $\times 9$. Пользуясь препаратодоводителем, установить в поле зрения исследуемую часть препарата — клетку с метафазной пластинкой при изучении карิโอ-типа или подсчете хромосом, зародышевый мешок и т. д.

13. Исследовать препарат можно либо при объективе $\times 40$, либо при иммерсионном объективе $\times 90$. В последнем случае сразу после установки соответствующего объектива следует поднять конденсор, чтобы обеспечить лучшее освещение объекта.

14. При работе с иммерсионным объективом $\times 90$ нужно предварительно сфокусировать и центрировать

объект при объективе $\times 40$; затем нужно нанести по капле иммерсионного масла на верхнюю линзу конденсора и покровное стекло и установить объектив $\times 90$.

15. После окончания работы с линзы конденсора, объектива микроскопа и препарата иммерсионное масло удаляют чистой тряпочкой, смоченной бензином.

16. Во время перерыва и после окончания работы препарат вынимают, микроскоп устанавливают на объектив $\times 9$ и накрывают чехлом. Осветитель выключают из сети во избежание его перегрева.

Измерение микроскопических объектов

Задание. 1. Определить цену деления окуляр-микрометра для различного сочетания объективов и окуляров. **2.** Измерить исследуемый объект.

Материал и оборудование. 1. Постоянный препарат. **2.** Микроскоп. **3.** Объект-микрометр. **4.** Окуляр-микрометр.

Пояснения к заданию. Измерение микроскопических объектов (пыльцевых зерен, хромосом, тетрад микроспор и т. д.) проводят с помощью специальных линеек — окуляр-микрометра и объект-микрометра. Шкала окуляр-микрометра имеет длину 0,5 или 0,1 см и разделена соответственно на 50 или 100 частей. Окуляр-микрометр вставляют в окуляр (иногда он бывает вмонтирован в специальный измерительный окуляр). Вращая окуляр, подводят измеряемый объект под шкалу окуляр-микрометра и производят измерение объекта. Однако цена деления окуляр-микрометра зависит от того, с каким объективом мы рассматриваем объект. Для того чтобы определить цену деления окуляр-микрометра при различных объективах и окулярах, пользуются специальной линейкой — так называемым объект-микрометром. Объект-микрометр вмонтирован в металлическую оправу. Шкала его имеет длину 1 мм и разделена на 100 частей. Одно деление шкалы объект-микрометра равно 10 мкм.

Выполнение задания. 1. Вставить окуляр-микрометр в соответствующий окуляр микроскопа и, вращая глазную линзу, получить резкое изображение его шкалы.

2. Поместить объект-микрометр на столик микроскопа и получить резкое изображение его шкалы.

3. Совместить изображение шкалы объект-микрометра со шкалой окуляр-микрометра и установить, сколько делений объект-микрометра приходится на определенное число делений окуляр-микрометра.

4. Разделить первую величину (число делений объект-микрометра) на вторую (число делений окуляр-микрометра) и умножить полученную величину на 10 (цена деления объект-микрометра в микрометрах). Полученный результат покажет цену деления окуляр-микрометра для данного объектива и окуляра. Таким образом следует определить цену деления для нужного сочетания окуляров и объективов и данные записать в таблицу (табл. 59).

Т а б л и ц а 59. Определение цены деления окуляр-микрометра

Окуляр	Объектив	Число делений		Цена деления окуляр-микрометра, мкм
		объект-микрометра	окуляр-микрометра	
× 7	× 9	25	20	12,5
× 7	× 40	6	20	3
		и т. д.		

Например, определим цену деления окуляр-микрометра при объективе ×40 и окуляре ×7. 6 делений объект-микрометра совпадают с 20 делениями окуляр-микрометра. Цена одного деления окуляр-микрометра будет равна $6 \times 10 : 20 = 3$ мкм.

5. Установить на столике микроскопа исследуемый объект и сфокусировать его.

6. Определить размеры объекта в делениях окуляр-микрометра, передвигая препарат на столике и поворачивая окуляр с окуляр-микрометром.

7. Полученный результат умножить на цену деления, найденную для данного окуляра и объектива микроскопа.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Перечень оборудования и реактивов для проведения занятий по генетике

1. Микроскопы биологические — рабочие и исследовательские МБР-1, МБР-3, МС-51, МБИ-15, МБС-1, МБС-2. 2. Микроскоп люминесцентный МЛ-2. 3. Лупы бинокулярные и настольные. 4. Осветители к микроскопам ОИ-19, ОИ-24. 5. Люминесцентное устройство ОИ-17. 6. Устройство КФ-4 для наблюдений методом фазового контраста. 7. Рисовальные аппараты РА-4, РА-5, РА-6 и рисовальный столик. 8. Объект-микрометр ОМП и окуляр-микрометр. 9. Микроманипулятор. 10. Микротом салазочный. 11. Микротом ротационный. 12. Микротом самозамораживающий. 13. Нагревательный столик. 14. Термостаты различных марок: цитологический, для проращивания семян, для разведения дрозофилы. 15. Весы различных марок. 16. Дистиллятор. 17. Холодильник. 18. Электронно-счетная машина «Искра-210». 19. Пинцеты. 20. Ланцеты. 21. Ножницы. 22. Электроплитка, водяная баня и другие нагревательные приборы. 23. Стекла предметные и покровные. 24. Капельницы. 25. Стаканчики для разведения дрозофилы. 26. Чашки Петри. 27. Растильни для проращивания семян. 28. Мерные цилиндры различных объемов. 29. Часовые стекла. 30. Фарфоровые тигли. 31. Флаконы для фиксации. 32. Цилиндры для окрашивания постоянных препаратов. 33. Агар-агар. 34. Акридин оранжевый. 35. Азур П. 36. Алюмоаммонийные квасцы. 37. Альфа-бромнафталин. 38. Альфа-нафтол. 39. Анилин. 40. Бальзам канадский или кедровый. 41. Бензидин основной. 42. Бензол. 43. Бутиловый спирт. 44. Воск. 45. Гематоксилин. 46. Генциановый фиолетовый. 47. Глицерин. 48. Желатина. 49. Железоаммонийные квасцы. 50. Железо хлорное. 51. Иммерсионное масло. 52. Йод металлический. 53. Гидроокись калия. 54. Калий двуххромовокислый. 55. Калий йодистый. 56. Кармин. 57. Колхицин. 58. Ксилол. 59. Лимонная кислота. 60. Лихтгрюн. 61. Лакмод. 62. Медь сернокислая. 63. Метиленовый синий. 64. Метиленовый зеленый. 65. Молочная кислота. 66. Натрия метабисульфит. 67. Нитрозометилмочевина (НММ). 68. Нитрозоэтилмочевина (НЭМ). 69. 8-оксихинолин. 70. Орсеин. 71. Осмиевая кислота. 72. Парадихлорбензол. 73. Парафин. 74. Рибонуклеаза. 75. Сахароза. 76. Серная кислота. 77. Соляная кислота. 78. Тимол. 79. Толуидиновый синий. 80. Толуол. 81. Уксусная кислота ледяная. 82. Уксуснокислый натрий. 83. Фенол. 84. Формальдегид. 85. Формалин. 86. Фуксин основной для приготовления фуксин-сернистой кислоты. 87. Хромовый ангидрид. 88. Хромово-калийные квасцы. 89. Хлоралгидрат. 90. Хлороформ. 91. Эозин. 93. Этиленмин. 94. Этиловый спирт.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова З. В. Учебное пособие по генетике (задания по программированному обучению и контролю). В 3-х ч. Л.—Пушкин. Ч. 1, 1973, 52 с.; ч. 2, 1975, 112 с.; ч. 3, 1977.
- Альтшулер В. Е., Поляков А. И. Основы генетики. М., 1969.
- Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. М., 1971.
- Веселовский И. А. Введение в генетику. М., 1966.
- Гуляев Г. В. Генетика. М., 1977.
- Гуляев Г. В. Задачник по генетике. М., 1973.
- Гуляев Г. В., Мальченко В. В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции, семеноводству и семеноведению. М., 1975.
- Дубинин Н. П. Общая генетика. М., 1976.
- Иванова О. А. Генетика. М., 1974.
- Константинов А. В. Цитогенетика. Минск, 1971.
- Куперман Ф. М. Морфофизиология растений. М., 1977.
- Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1975.
- Попова Г. М., Абрамова З. В. Селекция и семеноводство полевых культур. Л., 1968.
- Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. М., 1967.
- Ригин Б. В., Орлов И. Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. Л., 1977.
- Серебровский А. С. Генетический анализ. М., 1970.
- Сулима Ю. Г. Тритикале. Кишинев, 1976.
- Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М., 1971.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Цитологические основы наследственности	7
Деление клетки	7
Митоз	7
Митотическая активность	11
Мейоз	13
Морфология хромосом	19
Подсчет числа хромосом на резаных препаратах	19
Подсчет числа хромосом на давленных препаратах из кончиков корня	24
Изучение и идентификация хромосом у растений	26
Метод цитохимического выявления ДНК в клетках с помощью реакции Фельгена — Шиффа	34
Выявление ДНК и РНК в клетках путем окраски препаратов метиловым зеленым с пиронином	39
Люминесцентный метод выявления ДНК и РНК в клетках	42
Биология полового размножения	45
Спорогенез и гаметогенез	45
Микроспорогенез и микрогаметогенез (спермиогенез)	45
Мегаспорогенез и мегагаметогенез	48
Оплодотворение у покрытосеменных растений	51
Система полового размножения	54
Определение типа опыления	58
Определение типа генетической несовместимости по характеру прорастания пыльцы на рыльце пестика	59
Гетероморфная несовместимость	61
Генетический (гибридологический) анализ	63
Техника скрещивания	64
Анализ гибридов первого (F_1) и второго (F_2) поколений при моногибридном скрещивании	67
Возвратное скрещивание	70
Анализ гибридов первого (F_1) и второго (F_2) поколений при дигибридном скрещивании	73
Анализ гибридов при комплементарном взаимодействии генов	77
Полимерия	79
Анализ сцепления генов и составление генетических карт	82
Статистическая обработка данных гибридологического анализа	83
Изменчивость	89
Мутационная изменчивость	89
Методы получения мутаций	90

Изучение структурных изменений хромосом	93
Описание мутантов	97
Полиплоидия	98
Методы получения полиплоидов у растений	99
Изучение микроспорогенеза и описание пыльцы у диплоидной и тетраплоидной ржи	103
Описание и определение продуктивности тетраплоидных растений в сравнении с диплоидными	106
Морфолого-биологическая характеристика тритикале	108
Изучение мейоза и определение фертильности пыльцы у тритикале	109
Методика выделения анеуплоидных растений у пшеницы	112
Использование нуллисомных и моносомных линий пшеницы для идентификации генов с соответствующей хромосомой	118
Моносомный анализ гибридов	120
Модификационная изменчивость	124
Статистический анализ модификационной изменчивости	125
Онтогенетическая изменчивость	130
Определение потенциальной продуктивности колоса пшеницы (метод Ф. М. Куперман)	133
Инбридинг и гетерозис	135
Принудительное самоопыление у перекрестноопыляющихся культур	136
Описание и определение продуктивности инбредных линий, простых и двойных гибридов кукурузы	139
Определение общей (ОКС) и специфической (СКС) комбинационной способности сортов и линий	140
Цитоплазматическая мужская стерильность	144
Дегенерация пыльцы у стерильных аналогов пшеницы	145
Генетика популяций	148
Определение частоты генотипов в популяции по числу соответствующих фенотипов	149
Генетическое равновесие в свободнскрещивающейся популяции	150
Динамика популяций у перекрестноопыляющихся культур при полной элиминации рецессивных гомозигот	151
Динамика популяций у перекрестноопыляющихся культур при неполной элиминации рецессивных гомозигот	154
Дрозофила как объект изучения закономерностей наследственности и изменчивости	157
Хромосомы дрозофилы	162
Изучение мутантов	163
Моногибридное скрещивание у дрозофилы	168
Дигибридное скрещивание	171
Взаимодействие неаллельных генов	173
Сцепленное наследование	175
Наследование пола и признаков, сцепленных с полом	179
Микроскопическая техника	184
Работа с микроскопом	184
Измерение микроскопических объектов	186
Приложение	188
Перечень оборудования и реактивов для проведения занятий по генетике	188
Указатель литературы	189

Зинаида Васильевна Абрамова
Ошер Абрамович Карлинский

ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИКЕ

Редактор В. А. Алексеева. Художественный редактор О. П. Андреев. Технический редактор Л. Б. Резникова. Корректор Л. В. Вешнякова.

ИБ № 1655

Сдано в набор 22.11.78. Подписано к печати 23.02.79. М-12050. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 1. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 10,08. Уч.-изд. л. 10,23. Изд. № 228. Тираж 20 000 экз. Заказ № 216. Цена 35 коп.

Отделение ордена Трудового Красного Знамени издательства «Колос», 191186, Ленинград, Д-186, Невский пр., 28.

Ордена Октябрьской Революции, ордена Трудового Красного Знамени Ленинградское производственно-техническое объединение «Печатный Двор» имени А. М. Горького «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли, 197136, Ленинград, П-136, Гатчинская, 26.