Н.В. Быковская

Дальневосточный федеральный университет. Филиал в г. Уссурийске (Школа педагогики)

Проведение эксперимента «Доказательство менделеевских закономерностей наследования признаков у *Drosophilamelanogaster*» в курсе «Генетика» для студентов биологических специальностей высшей школы

Обсуждается проявление законов Менделя в учебном эксперименте на дрозофиле.

Ключевые слова: учебный эксперимент, дигибридное скрещивание, законы Менделя, плодовая мушка.

Теоретический курс генетики легче усваивается через лабораторные занятия. Студенты могут на опыте убедиться в том, что генетика базируется на конкретных законах, позволяющих предвидеть то или иное явление и точно рассчитать его количественные закономерности (Ватти, Тихомирова, 1979).

Дрозофила (*Drosophilamelanogaster*) является незаменимым объектом для проведения лабораторных занятий по изучению закономерностей наследования. Её преимущества перед другими объектами заключаются в непродолжительном цикле развития (примерно 14 суток от момента откладки яйца до вылета имаго), высокой плодовитости, большом числе изученных генов, определяющих легко различимые признаки, малом числе хромосом ($2n=8$), удобстве разведения (Шварцман, 1986; Абрамова, 1992).

В течение многих лет студенты профиля «Биология и химия» филиала ДВФУ (Школы педагогики) выполняли эксперимент на дрозофиле на доказательство менделеевских закономерностей наследования при дигибридном скрещивании (Быковская, 2011).

Нами разработана лабораторная работа «Доказательство менделеевских закономерностей наследования признаков у *Drosophilamelanogaster*» с использованием исследовательского метода.

Цель: Ознакомление с основными менделеевскими закономерностями при дигибридном скрещивании, в котором родительские организмы различаются по двум парам контрастных альтернативных признаков.

Теоретическая часть:

Г. Менделем был предложен метод, с помощью которого удалось разрешить самое запутанное явление в биологии – наследование признаков организма в поколениях. Гибридо-логический метод изучения наследственности не только позволил вскрыть законы наследования признаков, но и указал пути планомерного и целенаправленного изменения наследственности организмов.

Необходимым условием выявления закономерностей наследования признаков является количественный учёт гибридных и исходных (родительских) форм во всех поколениях по всем исследуемым признакам. В практике проведения генетического анализа на конкретном объекте (горох, дрозофила, кукуруза) руководствуются следующими принципами:

1. Для скрещивания подбираются родительские особи, различающиеся по 1, 2, 3 и более альтернативным (взаимоисключающим) признакам;
2. Предварительно родительские формы в 2–3-х поколениях проверяют на константность (отсутствие гибридности по испытываемым признакам);
3. Полученные гибриды в последующих поколениях размножают либо путём самоопыления, либо путём близкородственного скрещивания у животных.

При проведении генетического анализа пользуются определёнными символами. Родители обозначаются латинской буквой P, материнская особь – знаком ♀, отцовская – ♂, знак скрещивания – x. Потомство, полученное от скрещивания родителей с альтернативными признаками, обозначают буквой F. Цифровой индекс соответствует порядковому номеру поколения: F₁ – первому, F₂ – второму, полученному от скрещивания F₁ x F₁, и т.д. Скрещивание гибрида F₁ с одной из родительских форм называется возвратным скрещиванием, или беккроссом и обозначается символом F_B. Скрещивание гибрида F₁ с родительской формой, находящейся в рецессивном состоянии, называется анализирующим скрещиванием.

Дигибридным скрещиванием называется такое скрещивание, когда родительские организмы различаются по двум парам альтернативных признаков. Все особи F₁ оказываются одинаковыми по каждому альтернативному признаку. У них проявляются доминантные признаки. Такое явление единообразия гибридов F₁ при полном и неполном доминировании нашло отражение в первом законе Г. Менделя – законе единообразия гибридов первого поколения, или законе доминирования.

Скрестив гибриды F₁ между собой, получим потомство F₂, среди которого 9/16 окажутся с двумя доминантными признаками, 3/16 – с доминантным и рецессивным признаками, 3/16 – с первым рецессивным и вторым доминантным признаками, 1/16 – с двумя рецессивными признаками. Такая закономерность наблюдается всегда, если один признак доминирует над другим. Её проявление – результат расхождения детерминантов наследственности у гибрида F₁ в разные гаметы. Это явление отражено во втором законе Г. Менделя – законе расщепления в определенном количественном соотношении.

При скрещивании дигибридов в потомстве появляются организмы не только с родительским сочетанием признаков, но и с такими сочетаниями, которых у родителей не было. Однако нетрудно заметить, что новые сочетания признаков у гибридного потомства обусловлены комбинацией признаков, которыми обладали исходные родительские формы. Причём, как установил Г. Мендель, при анализе в F₂ у дигибридов происходит независимое расщепление каждой пары признаков в отношении 3:1. Однако с учётом наличия обоих признаков в организме, получим расщепление иное, а именно: 9/16 всего потомства будут нести доминантные признаки, 3/16 – только один доминантный признак, 3/16 – только другой доминантный, 1/16 не обладает ни тем, ни другим доминантными признаками.

Следует вспомнить, что моногибрид в F₂ обуславливает расщепление в отношении 3:1. В том случае, если наследование двух признаков происходит независимо друг от друга, а их сочетание носит случайный характер, при дигибридном расщеплении в F₂ получается простое сочетание двух отдельных независимых друг от друга моногибридных расщеплений: (3:1)(3:1)=9:3:3:1.

Таким анализом случайного комбинирования независимых пар в потомстве гибридных организмов, был установлен третий закон Менделя – закон независимого наследования признаков и детерминирующих их генов.

С позиций хромосомной теории наследственности этот закон получил следующее объяснение. Каждая из гомологичных хромосом, отцовская и материнская, в процессе мейоза обязательно попадает в разные гаметы, но с одинаковой вероятностью с любой отцовской или материнской негомологичной хромосомой.

Постановка задачи:

Проведение дигибридного скрещивания на доказательство менделевских закономерностей наследования признаков у *Drosophilamelanogaster*

Порядок выполнения:

Для начала нужно получить у лаборанта дрозофилину пробирку с исходными родительскими мухами, причем скрещиваемые самки и самцы взяты из разных линий. Убедиться, что мухи материнской и отцовской линий различаются по двум парам контрастных признаков. Начать заполнение дневника наблюдений в форме таблицы (табл. 1).

Примерная форма дневника лабораторной работы

Дата	Краткое описание скрещивания	Результат

В дневник заносятся основные этапы эксперимента и развития мух в каждой пробирке: постановка скрещивания, откладка яиц, массовое развитие личинок, массовое окукливание, удаление из пробирки родительских мух, начало и окончание лёта мух.

Регулярно наблюдать за развитием мух в исходной пробирке и также во всех последующих.

Убедиться в единообразии гибридов первого поколения, в том, что у всех мух F_1 одинаковый фенотип. Используя мух F_1 , следует поставить 1 пробирку на анализирующее скрещивание и 4 пробирки на получение мух F_2 . Новые пробирки со средой взять у лаборанта.

Для анализирующего скрещивания гибридов F_1 в одну пробирку посадить 3–5 девственных самок из F_1 и 3–7 самцов из линии с двумя соответствующими рецессивными мутациями. Самцов взять у лаборанта, сообщив названия этих двух мутантных признаков. Подписать стеклоглафом на данной пробирке F_a и регулярно наблюдать за развитием мух, также как делали с исходной пробиркой, записывая результаты в дневник наблюдений. Взрослых мух F_a усыплять, считать по 4 фенотипическим классам, выбрасывать, т.к. для дальнейшей работы они не нужны.

Поставить 4 пробирки для получения мух F_2 , в каждую посадить 3–5 самок и 5–7 самцов из F_1 . На каждой подписать стеклоглафом № пробирки: 1, 2, 3, 4 и регулярно наблюдать за развитием мух, также как делали с исходной пробиркой, записывая результаты по каждой пробирке в дневник наблюдений. Взрослых мух F_2 усыплять, считать по 4 фенотипическим классам (результаты подсчетов по 4 пробиркам суммировать) и выбрасывать, т.к. для дальнейшей работы они не нужны.

Провести статистическую обработку результатов F_a и F_2 с помощью χ^2 -метода.

Форма отчёта:

По окончании эксперимента сдать отчёт, который должен содержать следующие разделы:

1. Цель работы;
2. Ход работы;
3. Характеристика исходных родительских линий и двух мутаций;
4. Теоретическое обоснование эксперимента, которое включает схему скрещивания на получение F_1 , схему анализирующего скрещивания гибридов F_1 , схему на получение F_2 .
5. Дневник наблюдений.
6. Таблица с результатами подсчёта мух F_a и таблица статистической обработки результатов F_a с помощью χ^2 -метода.
7. Таблица с результатами подсчёта мух F_2 и таблица статистической обработки результатов F_2 с помощью χ^2 -метода.
8. Выводы по эксперименту в соответствии с поставленной целью.

Методические рекомендации:

Рассмотрим пример теоретического обоснования эксперимента и статистической обработки результатов F_2 с помощью χ^2 -метода.

В проведённом скрещивании альтернативными признаками являются окраска тела и цвет глаз.

Были взяты самки *sn*, имеющие ярко-красные глаза и серое тело, и самцы *e*, имеющие красно-коричневый цвет глаз и чёрное тело. При скрещивании были получены гибриды первого поколения с красно-коричневым цветом глаз и серым телом. При дальнейшем скрещивании между собой гибридов первого поколения было получено четыре фенотипических класса.

Характеристика исходных родительских линий и двух мутаций

P ♀ *cn* × ♂ *e*

cinnabar, *cn*, II. Киноварноглазый. Цвет глаз яркий, шарлаховый, глазки бесцветные.
ebony, *e*, III. Чёрный цвет тела.

cn⁺ – красно-коричневые глаза

*cn**cn* – ярко-красные глаза

e⁺ – серое тело

ee – чёрное тело

Схема скрещивания на получение первого гибридного поколения

P ♀ *cn**cn* *e*⁺*e*⁺ × ♂ *cn*⁺ *cn*⁺ *ee*

G: *cn* *e*⁺; *cn*⁺ *e*

F₁ *cn*⁺ *cn* *e*⁺ *e*

красно-коричневые глаза, серое тело

Схема анализирующего скрещивания самок из F₁

♀ *cn*⁺ *cn* *e*⁺ *e* × ♂ *cn**cn* *ee*

G: *cn*⁺ *e*⁺, *cn*⁺ *e*, *cn* *e*⁺, *cn* *e*; *cn* *e*

F_a ¼ *cn*⁺ *cn* *e*⁺ *e*: ¼ *cn*⁺ *cn* *e* *e*: ¼ *cn**cn* *e*⁺ *e*: ¼ *cn**cn* *e* *e*:

¼ красно-коричневые глаза и серое тело:

¼ красно-коричневые глаза и чёрное тело:

¼ ярко-красные глаза и серое тело:

¼ ярко-красные глаза и чёрное тело.

Схема скрещивания F₁ × F₁ для получения второго гибридного поколения

♀ *cn*⁺ *cn* *e*⁺ *e* × ♂ *cn*⁺ *cn* *e*⁺ *e*

G: *cn*⁺ *e*⁺, *cn*⁺ *e*, *cn* *e*⁺, *cn* *e*; -//-

F₂

	<i>cn</i> ⁺ <i>e</i> ⁺	<i>cn</i> ⁺ <i>e</i>	<i>cn</i> <i>e</i> ⁺	<i>cn</i> <i>e</i>
<i>cn</i> ⁺ <i>e</i> ⁺	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ <i>e</i> красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> красно-коричневые глаза, серое тело
<i>cn</i> ⁺ <i>e</i>	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ <i>e</i> красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> ⁺ <i>e</i> <i>e</i> красно-коричневые глаза, чёрное тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> <i>e</i> красно-коричневые глаза, чёрное тело
<i>cn</i> <i>e</i> ⁺	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ⁺ ярко-красные глаза, серое тело	<i>cn</i> <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ярко-красные глаза, серое тело
<i>cn</i> <i>e</i>	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> красно-коричневые глаза, серое тело	<i>cn</i> ⁺ <i>cn</i> <i>e</i> <i>e</i> красно-коричневые глаза, чёрное тело	<i>cn</i> <i>cn</i> <i>e</i> ⁺ <i>e</i> ярко-красные глаза, серое тело	<i>cn</i> <i>cn</i> <i>e</i> <i>e</i> ярко-красные глаза, чёрное тело

9/16 – красно-коричневые глаза и серое тело (*NN*);

3/16 – красно-коричневые глаза и чёрное тело (*Ne*);

3/16 – ярко-красные глаза и серое тело (*cnN*);

1/16 – ярко-красные глаза и чёрное тело (*cne*).

В результате скрещивания гибридов первого поколения образовалось четыре фенотипических класса. По решётке Пеннета определяем количественное соотношение данных классов, которое составляет 9:3:3:1.

Используя конкретный статистический материал, нередко бывает трудно сказать, соответствует ли он той теории, законами которой мы руководствовались. Например, действительно ли полученные во втором поколении результаты соответствуют расщеплению 9:3:3:1. Для определения соответствия наблюдаемого расщепления по фенотипическим классам теоретически ожидаемому, используется критерий соответствия – χ^2 (хи – квадрат).

$$\chi^2 = \sum \frac{(H - O)^2}{O},$$

Функция χ^2 определяется как

где H – наблюдаемое значение данного фенотипического класса в эксперименте, O – ожидаемое значение, а символ $\sum$ означает суммирование по всем сериям экспериментов. Чем больше число фенотипических классов фигурирует при анализе, тем больше сумма χ^2 .

Проводим статистическую обработку полученных результатов с помощью χ^2 -метода. Для этого полученное соотношение фенотипических классов заносим в таблицу на основании опытных числовых данных (H). Затем из суммы частот всех классов, составляющей объём выборки, вычисляем теоретически ожидаемые величины (O) для каждого класса, соответственно предполагаемой формуле расщепления, т.е. для данного скрещивания 9:3:3:1. Далее определяется отклонение ($H-O$) полученных данных от теоретически ожидаемых для каждого класса. Каждое полученное отклонение возводим в квадрат, делим на его теоретически ожидаемое число для данного класса. После суммируем все частные и получаем величину χ^2 практического (табл. 2).

Далее сравниваем величину χ^2 практического со значением χ^2 в таблице Фишера при определённом числе степеней свободы и уровне вероятности (табл. 3).

Таблица 2

Расчёт χ^2 практического

Порядок расчёта	Красно-коричневые глаза, серое тело NN	Красно-коричневые глаза, чёрное тело Ne	Ярко-красные глаза, серое тело cnN	Ярко-красные глаза, чёрное тело $сne$	Сумма $\sum$
H	300	101	90	21	512
Формула расщепления	9/16	3/16	3/16	1/16	16/16
O	288	96	96	32	512
$H-O$	12	5	-6	-11	
$(H-O)^2$	144	25	36	121	
$\frac{(H-O)^2}{O}$	0,50	0,26	0,38	3,78	4,92

В обычных генетических экспериментах используют уровень вероятности $P = 0,05$ (95%), в исследованиях, требующих большей точности, используют $P=0,01$ (99%). Число степеней свободы равно числу фенотипических классов минус 1 ($k - 1$).

При $P = 0,05$ (95%) и числе степеней свободы равном 3 (количество классов 4 – 1) значение $\chi^2_{\text{табл.}} = 7,81$.

$\chi^2_{\text{пр.}} (4,92) < \chi^2_{\text{табл.}} (7,81)$, это говорит о том, что наблюдаемое расщепление соответствует теоретически ожидаемому, различия между полученными в опыте и теоретически ожидаемыми величинами случайны.

Таблица 3

**Значения χ^2 при различных степенях свободы
(по Фишеру, с сокращением)**

Число степеней свободы	Вероятность (P)									
	0,99	0,95	0,90	0,75	0,50	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01
1	0,00	0,00	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

В результате проведённого дигибридного скрещивания родительских форм у гибридов первого поколения проявляется первый закон Менделя – закон единообразия гибридов первого поколения (все гибриды имеют красно-коричневый цвет глаз и серое тело). У гибридов второго поколения проявляется второй закон Менделя – закон расщепления. Расщепление 9:3:3:1 в определённом количественном соотношении доминантных и рецессивных форм происходит вследствие двух моногибридных скрещиваний $(3:1)(3:1)=9:3:3:1$. Две пары альтернативных признаков распределяются совершенно независимо, т.е. наследственные факторы полученные гибридами первого поколения не обязательно передадутся гибридам второго поколения вместе. Расщепление неаллельных генов, полученных от родительских форм, носит случайный характер. В дигибридном скрещивании отдельные пары признаков ведут себя независимо, комбинируясь во всех возможных сочетаниях, что соответствует третьему закону Менделя.

Материал и оборудование:

На каждого студента – набор для работы с дрозофилой: пробирки с мухами, пустые дрозофилинные стаканчики, дрозофилинные стаканчики с корковыми пробками, листы плотной белой бумаги, маховые птичьи перья, ручные лупы.

В ходе этого эксперимента студенты приобретают навыки статистической обработки полученных результатов. На протяжении всего эксперимента студенты ведут дневник наблюдений. Обработка полученных результатов, оформление статистических данных и написание выводов завершают работу. Таким образом, студенты овладевают гибридологическим методом генетического анализа.

Литература

- Абрамова З.В. Практикум по генетике. Л.: Агропромиздат, 1992. 224 с.
- Быковская Н.В. Формирование профессиональной направленности у студентов при выполнении практикума на дрозофиле // Инновационные образовательные технологии в системе высшего профессионального образования: принципы и механизмы организации в условиях глобализации: Материалы XXVIII международной научно-методической конференции, Уссурийск, 16–21 марта 2011 г. Часть II. Уссурийск: Изд-во ФГОУ ВПО ПГСХА, 2011. С. 160–161.
- Ватти К.В., Тихомирова М.М. Руководство к практическим занятиям по генетике. М.: Просвещение, 1979. 189 с.
- Шварцман П.Я. Химический мутагенез у *Drosophilamelanogaster* и пути его модификации. Автореф. дисс. ... док. биол. наук. Л., 1986. 43 с.

N.V. Bykovskaya

Far Eastern Federal University. Branch in the Ussuryisk city (School of pedagogics)

Carrying out the experiment «Proof of Mendelian laws of inheritance of traits in *Drosophila melanogaster*» in the course «Genetics» for students of biological specialities in high schools

The manifestation of Mendel's laws in an educational experiment on *Drosophila* is discussed.

Keywords: educational experiment, dihybrid crossing, Mendel's laws, *Drosophila melanogaster*.

Сведения об авторах:

Быковская Наталья Владимировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры естественнонаучного образования филиала ДВФУ в г. Уссурийске (Школы педагогики). 692500, Приморский край, г. Уссурийск, ул. Некрасова, 35. E-mail: bykovskaya_1968@mail.ru.