

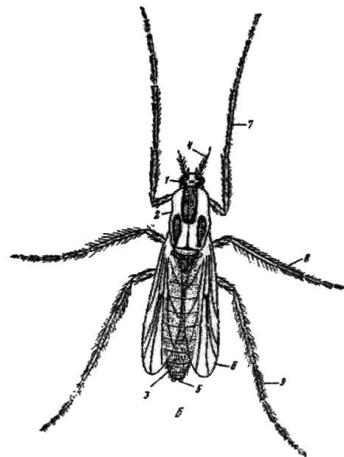
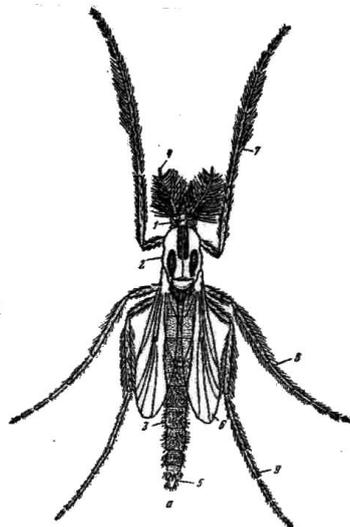
ХИРОНОМИДЫ КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ГЕНЕТИКИ

Chironomus — род насекомых из отряда двукрылых (*Diptera*), принадлежащий к одному из семейств комаров, называемому дергунами (*Chironomidae*). Личинок этих комаров называют мотыль.

1. Краткая биологическая характеристика (самостоятельно).

Chironomus plumosus L.

- а - самец
- б - самка
- 1 - голова
- 2 - грудь
- 3 - брюшко
- 4 - антенны
- 5 - гениталии
- 6 - крыло
- 7 - передняя нога
- 8 - средняя
- 9 - задняя нога



2. Методы сбора и фиксации личинок (самостоятельно, используя методическое пособие «Хируномиды – модельный объект кариологических исследований» ссылка <https://drive.google.com/open?id=1gGD5Bfoq1bXpk7tV0vgR4p9FInLBaZWV>).

3. Политенные хромосомы хирономид.

Хируномиды являются удобным модельным объектом для кариологических исследований, для оценки генетических эффектов различных факторов среды и различных воздействий. Удобство хирономид как модельного объекта связано с наличием политенных хромосом в ядрах клеток слюнных желез его личинок.

Особенности политенных хромосом:

1. Самые крупные хромосомы, постоянно присутствуют в клетках, находятся на стадии интерфазы, т.е. в состоянии высокой функциональной активности.
2. Характерна политения, возникающая вследствие эндомитозов, что обуславливает толщину хромосом.
3. Соматическая конъюгация гомологичных хромосом, в результате наблюдается гаплоидное количество хромосом.
4. Отчетливая дифференциация по длине – дискоидальная структура из четких разной толщины и морфологии поперечных полос – дисков, разделенных светлыми междисковыми участками. Рисунок поперечной исчерченности наследственно закреплен, видоспецифичен, характерен для каждой из хромосом набора. Диски политенных хромосом идентичны хромомерам.
5. При активизации определенных локусов генома происходит образование на месте соответствующего диска пуфы; среди последних постоянно функционируют кольца Бальбиани и ядрышко.

Пуфы представляют собой участки политенных хромосом, в которых проходит активная транскрипция, приводящая к разрыхлению хроматина и вздутию (распуфливанию) хромосомы. Пуфы являются участками высокой генной активности и отличаются наиболее интенсивным синтезом РНК. В политенных хромосомах из ядер разных тканей можно наблюдать различное количество пуфов, различаются они и локализацией этих пуфов. В политенных хромосомах из клеток слюнных желез некоторые

пуфы получили собственное название – кольца Бальбиани. Основные различия между обычными пуфами и кольцами Бальбиани заключаются во внешнем виде и продуктах синтеза. В кольцах Бальбиани синтезируется РНК белков слюнного секрета и происходит суперактивная транскрипция, в результате чего нити ДНК сильно выпетливаются и образуют муфтообразную структуру вокруг хромосомы.

Ядрышки представляют собой специализированный пуф, основу которого составляет ядрышковый организатор – участок хромосомы, ответственный за синтез всей рибосомной РНК клетки. Накопление веществ ядрышка происходит не только в области боковых выростов ядрышкового организатора, но и внутри самой хромосомы.

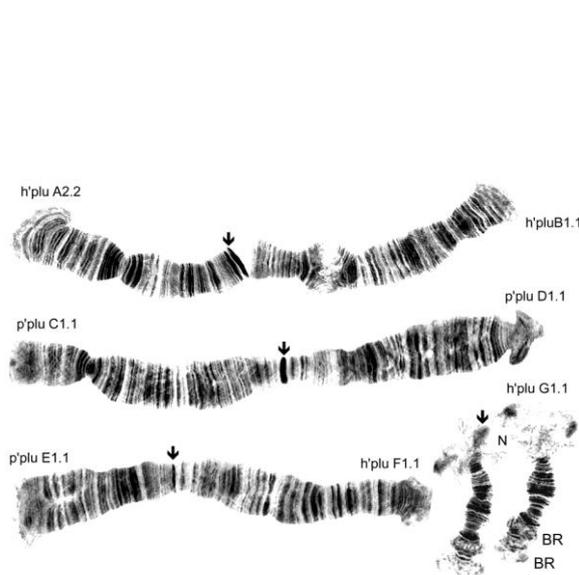
4. Описание кариотипа *Chironomus plumosus*

Хромосомы обозначаются римскими цифрами, их плечи – латинскими буквами:

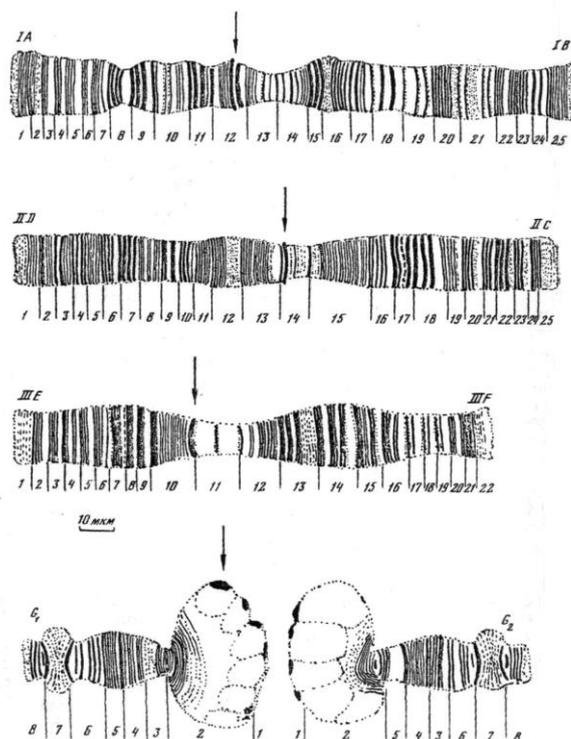
- I хромосома: плечи I A и I B;
- II хромосома: плечи II D и II C;
- III хромосома: плечи III E и III F;
- IV хромосома: плечо IV G.

Арабскими цифрами обозначаются секции хромосом.

Кариотип клеток слюнных желез *Chironomus plumosus* представлен 4-мя парами хромосом: I, II, III хромосомы в состоянии соматической конъюгации гомологов, IV хромосома представлена отдельно лежащими гомологами. Соотношение длин I(AB)>II(CD)>III(EF)>IV(G). AB и CD (I и II) – метацентрики, EF(III) – субметацентрик, G(IV) – телоцентрик. Ядрышко одно в плече G вблизи центромеры. На плече G 2 кольца Бальбиани.



Кариотип *Chironomus plumosus*



Карта-схема политенных хромосом *Chironomus plumosus*

5. Определение видовой принадлежности личинок хирономид по кариологическим признакам. (самостоятельно, используя методическое пособие «Хирономиды – модельный объект кариологических исследований» ссылка

<https://drive.google.com/open?id=1gGD5Bfoq1bXpk7tV0vgR4p9FInLBaZWV>)

- 1) Возраст личинки с пояснениями (с. 25).
- 2) Особенности анализа кариотипа рода *Chironomus* (с. 26).
- 3) Система идентификации плеч политенных хромосом видов рода *Chironomus* по характерным районам (с. 28).

7. Посмотреть видео «1. Кариологический анализ на примере политенных хромосом хирономид»

(ссылка <https://drive.google.com/open?id=1Drj3cthPE4QZ1janDqwzrtJAhKSsBmmI>)

Выполнить работу на тему:

**Анализ функциональной активности политенных хромосом
в клетках слюнных желез личинок хирономуса**

Ацетокарминовый метод

Методика приготовления препарата:

1. На чистое предметное стекло поместить личинку (рис. 1). Придерживая ее одной препаровальной иглой поперек тела, другой оторвать два первых членика, с которыми обычно выделяются парные слюнные железы (рис. 2). Слюнные железы имеют вид мелких прозрачных беловатых телец овальной формы. Если железы не выделились, то их надо извлечь легким нажатием иглы на 3-й и 4-й членики.

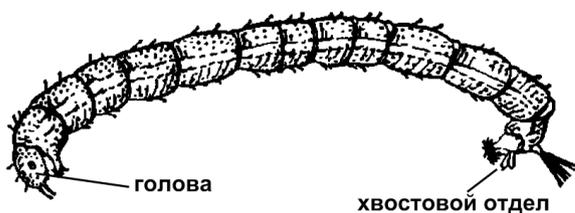


Рис. 1 – Внешний вид личинки *Chironomus sp.*

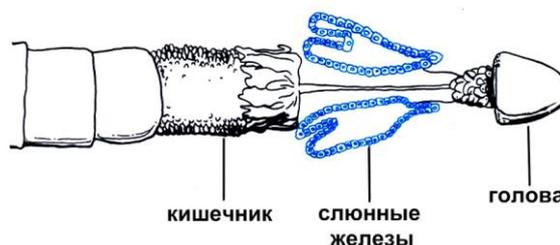


Рис. 2 – Расположение внутренних органов в головном отделе личинки *Chironomus sp.*

2. Очистить стекло от содержимого. Слюнные железы поместить в каплю фильтрованного ацетокармина на 35-40 минут для одновременной фиксации и окрашивания (рис. 3).
- 3.

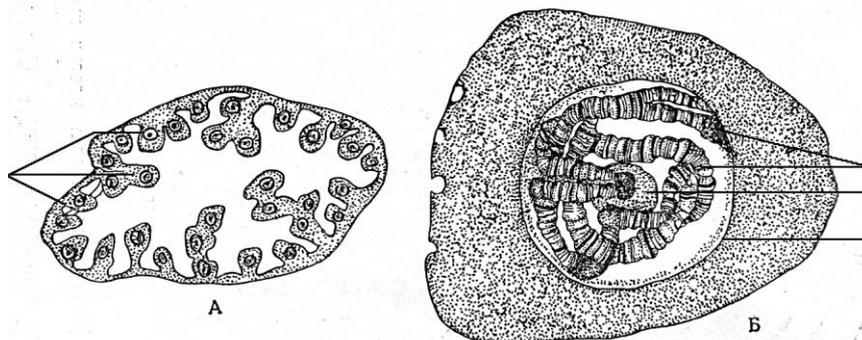


Рисунок 3 – Слюнные железы (А) и отдельная клетка (Б).

4. При помощи фильтровальной бумаги удалить краситель и добавить 2-3 капли 45% уксусной кислоты для извлечения излишков красителя и дифференцировки хромосом. Слюнные железы оставляют в растворе уксусной кислоты 5 минут.
5. Фильтровальной бумагой удалить уксусную кислоту и добавить новую ее каплю. Накрывать покровным стеклом.
6. Накрыв препарат сверху фильтровальной бумагой, осторожно надавить другим покровным стеклом, не допуская смещения стекла в горизонтальном направлении.

Ацеторсеиновый метод

Приготовление ацеторсеина

К 1,5 г сухого орсеина добавить 45 мл ледяной уксусной кислоты, смесь довести до кипения на горелке или электроплитке, при закипании немедленно снять с огня. Повторить процедуру закипания примерно 15 раз. Прилить 55 мл дистиллированной воды и вновь довести до закипания 15 раз. Раствор охладить, профильтровать и разбавить 1 н. соляной кислотой в отношении 9:1. Перед приготовлением давленных препаратов краситель развести в соотношении 1 часть 1 н. соляной кислоты : 2 части красителя : 1 часть 45%-й уксусной кислоты.

Методика окрашивания

1. Изолированные слюнные железы помещают в каплю 45% уксусной кислоты, затем замещают ее раствором ацеторсеина. Окраска продолжается 10-20 мин. Важно не дать капле красителя высохнуть, для чего необходимо время от времени добавлять его.
2. После окрашивания слюнные железы отмывают от излишков красителя с помощью нескольких смен 45% уксусной кислоты, постепенно оттягивая ее уголками фильтровальной бумаги.
3. Затем последовательно отмывают 15%, 25% и 50% молочной кислотой по 1-2 мин. В молочной кислоте происходит дифференцировка степени окраски и лучшее расправление хромосом.
4. В последней смене (50%) молочной кислоты остро заточенными препаровальными иглами отделяют клетки железы от секрета, находящегося в центральном секреторном резервуаре. Секрет удаляют с предметного стекла, окрашенные секреторные клетки осторожно накрывают покровным стеклом. Избыток молочной кислоты, выступающий по краям покровного стекла, аккуратно удаляют фильтровальной бумагой.
5. После этого готовят давленный препарат: накрыв препарат сверху фильтровальной бумагой, осторожно надавить другим покровным стеклом, не допуская смещения стекла в горизонтальном направлении.
6. Во избежание высыхания препарата по краям покровного стекла наносят расплавленный парафин или лак для ногтей.

Препарат изучить на большом увеличении, найти политенные хромосомы, отметить их структуру, наличие или отсутствие соматической конъюгации, пуффинга, колец Бальбиани. Результаты внести в таблицу.

Таблица – Анализ функциональной активности политенных хромосом в клетках слюнных желез личинок хирономуса

Плечо хромосомы	Асинаписис	Пуффинг	Кольца Бальбиани	Ядрышко
I A				
I B				
II C				
II D				
III E				
III F				
IV G				

Сделать вывод.

8. Посмотреть видео «2. Хромосомные перестройки и хромосомный полиморфизм»

(Ссылка <https://drive.google.com/open?id=1fovBANj3tn-FYYCMr6eH--Cs1yin2CwL>)

1) Конспект на тему «Хромосомные перестройки политенных хромосом»

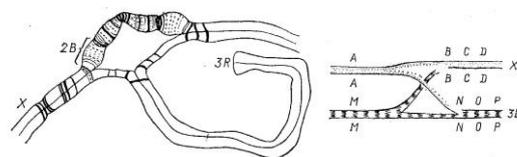
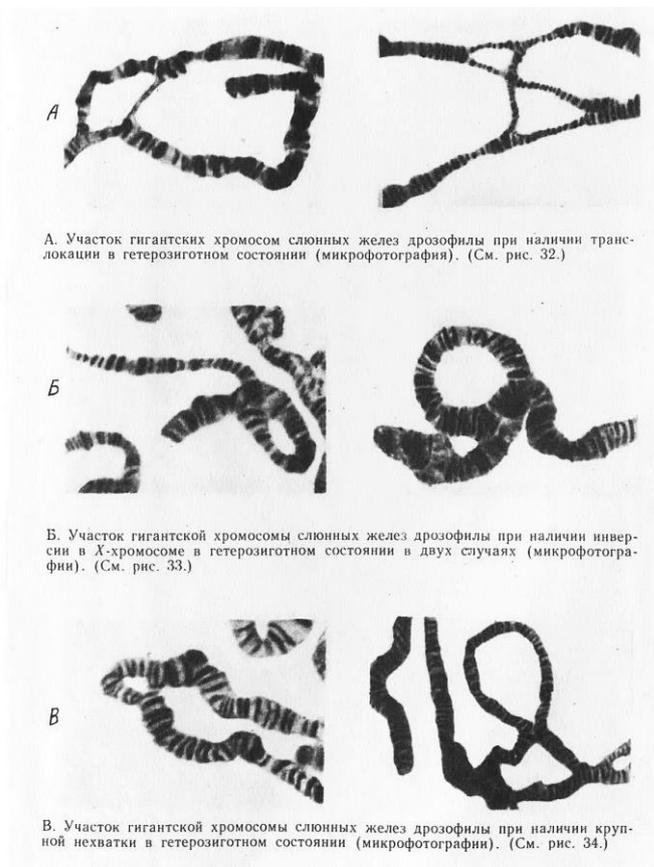


Рис. 32. Участок гигантских хромосом слюнных желез дрозофилы при наличии транслокации в гетерозиготном состоянии (схемы). (См. табл. VII, А.)



Рис. 33. Участок гигантской хромосомы слюнных желез дрозофилы при наличии инверсии в X-хромосоме в гетерозиготном состоянии (схемы). Указаны места разрывов. (См. табл. VII, Б.)

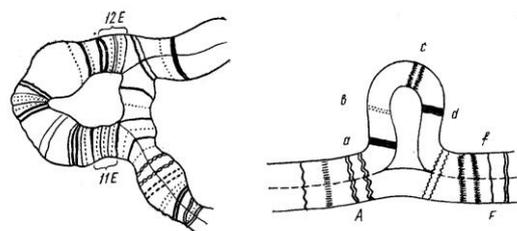


Рис. 34. Участок гигантской хромосомы слюнных желез дрозофилы при наличии крупной нехватки в гетерозиготном состоянии (схемы). (См. табл. VII, В.)

2) Выполнить работу «Хромосомные перестройки и хромосомный полиморфизм политенных хромосом личинок рода *Chironomus*»

Плечо хромосомы	Количество исследованных плеч хромосом	Число гетерозиготных инверсий	Число делеций	Число транслокаций, локализация
I A				
I B				
II C				
II D				
III E				
III F				
IV G				
Число гетерозиготных особей в популяции			Всего	Всего
Доля гетерозиготных особей в популяции (%)				
Число гетерозиготных инверсий на особь				

Сделать вывод.