

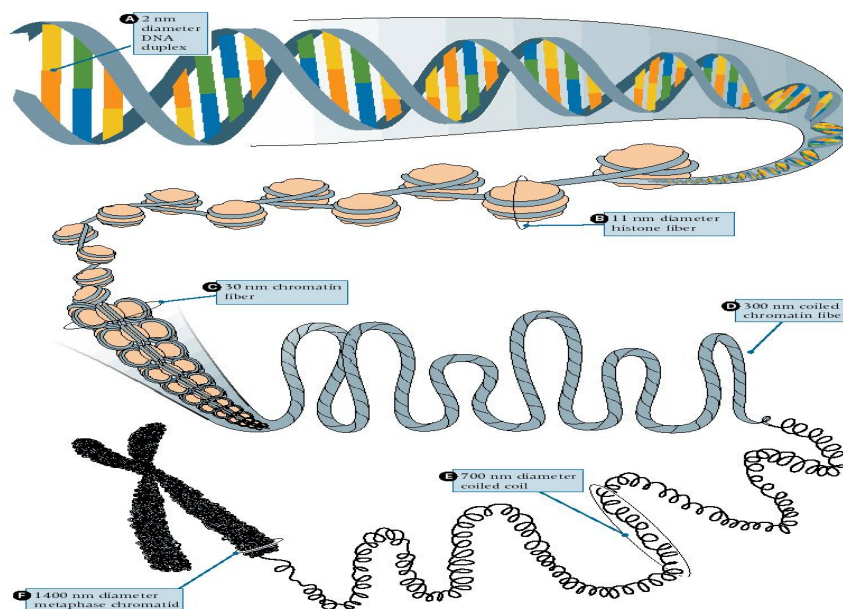
УНИВЕРЗИТЕТ "СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ" -СКОПЈЕ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА

Гордана Димеска

ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИКА

(ИНТЕРНА СКРИПТА)



С К О П Ј Е, 2011

СОДРЖИНА

Микоскоп и микроскопирање	1
Митоза	6
Морфологија на хромозоми	9
Морфолошки диференцијации на хромозомите	9
Изработка на препарати за кариолошка анализа	
од растителен материјал	14
Митотски индекс	19
Редукциона делба- мејоза	21
Хромозоми кај човек	29
Методи во хуманата цитогенетика	31
Кариотип, кариограм и идиограм	36
Механизми на определување на полот	41
Полово-врзано наследување	44
Наследување поврзано со полот (задачи за анализа)	47
Хроматински тест- одредување на Барово тело	48
Менливост на генетскиот материјал	50
Структурни хромозомски аберации	34
Политени хромозоми	56
Задачи и прашања од генетска анализа	61
Мохибридно вкрстување	61
Интермедиерно делување на гени	63
Кодоминантно наследување	64
Дихибридно вкрстување	64
Трихибридно вкрстување	66
Мултипли алели	66
Плеотропност на гени, летални и сублетални гени	68
Полигено наследување	69
Епистатичко и хипостатичко делување на гени	70
Комплементарно суплементарно делување на гени	70
Инхибиторни гени	71
Полово условено, полово ограничено и мајчино наследување	71
Родословни стебла- хередограми	72

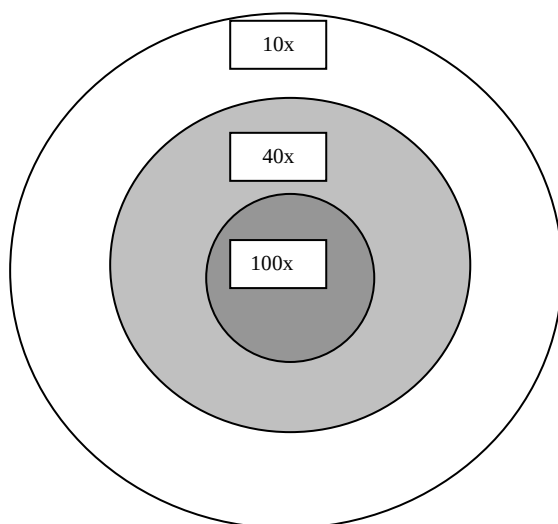
МИКРОСКОП И МИКРОСКОПИРАЊЕ

Основниот апарат за работа во една биолошка, медицинска или биохемиска лабораторија е микроскопот. Тој е многу прецизен инструмент кој овозможува детално набљудување на мали, со голо око невидливи предмети или објекти. За безбедна и поефикасна работа со овој инструмент неопходни се одредени предзнаења на корисникот кој треба да ги има предвид при работата.

Самиот поим микроскоп доаѓа од зборовите **micro-** мал и **scop-** гледање. Се смета дека е пронајден кон крајот на XVI од холандските браќа Захаријас и Ханс Јенсен. Левенхук користел ваков микроскоп за набљудување на различни микроорганизми, додека современиот микроскоп бил откриен дури кон крајот на XIX век.

Светлосен микроскоп

Денес постојат различни видови микроскопи (поларизационен, фазноконтрастен, електронски, луминисцентен и др.), но најупотребуван за едукативни цели е светлосниот микроскоп кој ќе биде детално опишан. Кај овој вид микроскоп, светлината поминува низ препаратот, се собира, прекршува и фокусира со помош на оптички леќи. Со користење на различни леќи може да се постигне различно зголемување на набљудуваниот објект. Меѓутоа, долната граница на видливоста на светлосниот микроскоп изнесува приближно $0,5\mu\text{m}^*$, односно структурите под овие димензии не можат да се анализираат со овој микроскоп. Од поставеното зголемување зависи и големината на видното поле. Така, при помало зголемување се добива поголемо видно поле и обратно, што поголемо зголемување, толку помало видно поле.



Сл. 1. Големината на видното поле е обратнопропорционална од зголемувањето на објективот.

* микрометарот (μm) претставува илјадити дел од милиметарот

Составни делови на светлосниот микроскоп

Главно, деловите на светлосниот микроскоп може да се поделат на **механички и оптички**.

Механички делови:

- **Основа (стапало)**
- **Држач (рачка)**
- **Цевка (тубус) и**
- **Столче (микроскопска масичка)**
- **Носач на објективи (револвер)**
- **Макрометарски винт**
- **Микрометарски винт**

Оптички делови:

1. Делови за образување на слика
 - **Објективи**
 - **Окулари**
2. Делови за осветлување
 - **Огледало или сијаличка**
 - **Кондензор (светлосен собирач)**
 - **Бленда (дијафрагма)**

Механички делови

Основа - Основата на микроскопот на која се монтирани сите останати делови е изградена од метал или некој друг материјал со цел да се обезбеди стабилност на целиот инструмент.

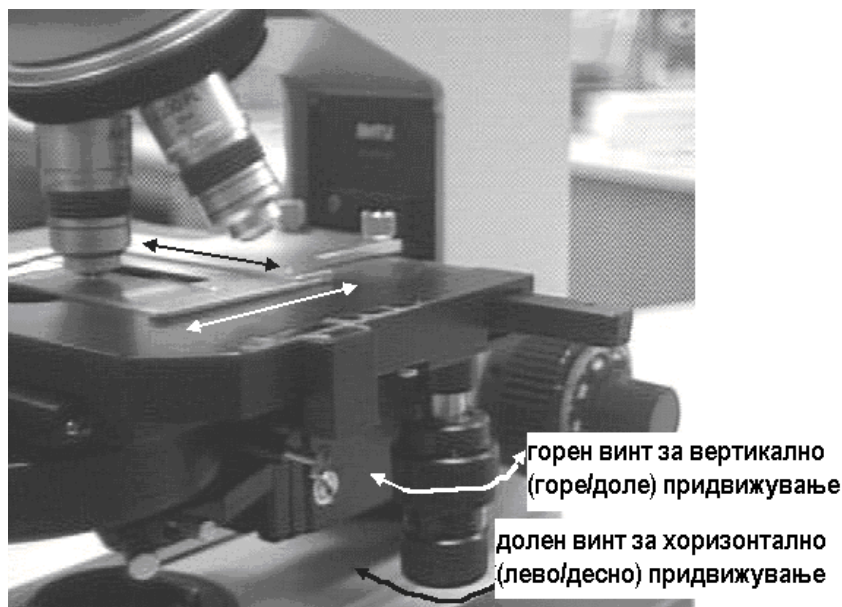
Рачка- држач - Се надоврзува на основата на микроскопот и служи за пренесување. На рачката во горниот дел се надоврзува тубусот (цевката), а во близина на основата се наоѓаат два винта: макрометарски (макровинт) и микрометарски винт (микровинт), со чија помош се придвижува столчето горе-долу, односно се изострува сликата.

Цевка- тубус - Тубусот претставува цилиндрична празна цевка во која на горниот крај се монтираат окуларните леќи, а со долниот дел се поврзува со кружен револвер, односно носач на објективи. Со вртење на подвижниот дел од револверот, објективите поединечно се доведуваат во оптичката оска.

Микроскопска масичка - По форма може да биде кружна, овална или четвртаста, но, за сите е карактеристично тоа што во средината имаат отвор преку кој светлосните зраци од изворот на светлина, преку препаратот поставен над тој отвор, стигнуваат до објективот. Современите модели на светлосни микроскопи на масичките имаат монтирани посебни држачи со кои се фиксира препаратот кој се набљудува во една одредена позиција. Поместувањето на вака фиксираниот препарат се прави со придвижување на масичката во две насоки- со еден од винтовите масичката се движи горе/доле (вертикално или напред/назад), додека со вториот винт придвижувањето на масичката е лево/десно односно хоризонтално како на сликата. Со движење на масичката се движи и самиот препарат сè додека не се одбере погодно видно поле за анализа. Саканата положба може да се забележи како

нумеричка вредност за двете насоки на движење, со помош на вредностите на скалите кои се монтирани во состав на држачите на препаратот.

За повторно микроскопирање и анализа на истите објекти на препаратот, прво се поставува положбата според претходно забележаните нумерички вредности од двете скали, а потоа се микроскопира при што се заштедува време во повторно пребарување на саканиот објект (клетка, органела, хромозом или др.).



Носач на објективи (револвер)

На револверот се наоѓаат лежиштата за објективите со различно зголемување, а претставува кружна рамка прицврстена за долниот дел на тубусот. Составен е од неподвижна и подвижна плоча. Подвижната плоча се врти околу осовината на неподвижната, со чија помош потребниот објектив се доведува во позиција за микроскопирање. При таа операција треба да се слушне лесен удар (звук), кој потекнува од навлегување на забец од неподвижната плоча во вдлабнатина на подвижната плоча.

Макрометарски винт

Со негово вртење грубо се поместува микроскопската масичка во вертикален правец и служи за пронаоѓање на видното поле.

Микрометарски винт

Со вртење на овој винт се постигнува придвижување на микроскопската масичка кое е толку мало што не се забележува со голо око. Служи за фино изострување на добиеното видно поле.

Оптички делови

1. Делови за образување на слика

1.1. Објективи

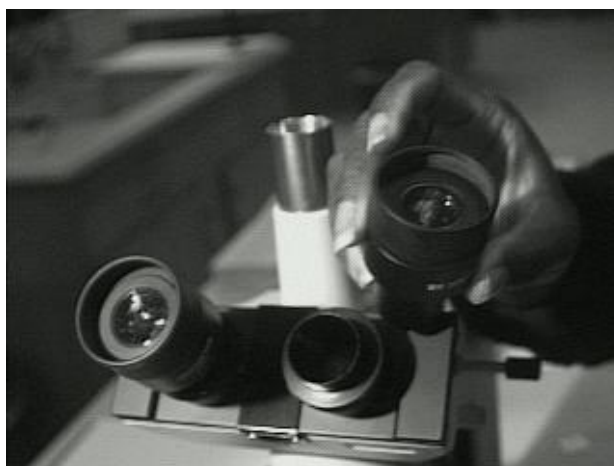
Објективите се најкарактеристичните делови на оптичкиот систем на микроскопот, бидејќи квалитетот на сликата многу зависи од квалитетот на објективите. Функцијата на објективот е да ги собере светлосните зраци кои доаѓаат од предметот и да ги претвори во зголемена слика. Објективите се монтирани на револверот (носачот на објективите) и тоа најчесто три или четири. Составени се од систем на центрирани леќи

сместени во метална цевка. Со помош леќите сместени во објективите (кои се со различна јачина), се добива зголемена и вистинита слика на објектот кој се набљудува. На долниот дел од објективот се наоѓа фронталната леќа, која најмногу го зголемува предметот, додека другите леќи на објективот вршат само корекција на добиената слика. Моќта на зголемување на објективот е поголема, доколку дијаметарот на фронталната е помал. На секој објектив е испишана неговата моќ на зголемување.

Постојат т.н. **суви објективи** (опкружени со воздух) и **имерзни објективи**, кои мора да се вронат во имерзионо масло, и кои имаат моќ на зголемување поголемо од 50х.

1.2. Окулар

Окуларот, исто така, е изграден од систем на леќи, сместени во метална кратка цевка, поставена во горниот дел на тубусот. Леќата низ која се гледа е поставена најгоре во окуларот и е наречена **очна леќа**, (таа треба да се чисти почесто со сува и мека ткаенина). Главната функција на окуларот е да го зголеми ликот кој го формира објективот и да изврши корекција на грешките од леќите на средно и високо моќните објективи, а тоа се извивање на видното поле и хроматска диференцијација. На секој окулар е впишана моќта на зголемување, па таа помножена со моќта на зголемување на поставениот објектив, ја дава моќта на зголемување на микроскопот.



2. Делови за осветлување

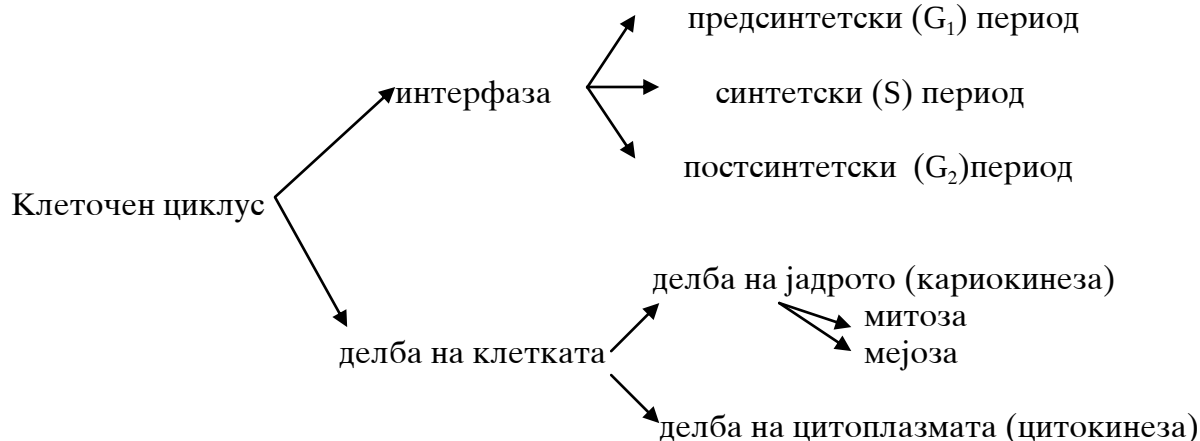
Овие делови се лоцирани под микроскопската масичка, а служат за осветлување на објектот и собирање и насочување на светлосните зраци кон објектот. Тука се вбројуваат: огледалце или електрична сијалица, дијафрагма и кондензор.

- Покрај микроскопи со огледалце (во нив не е директно вградена светлина) кое се насочува кон изворот на светлината, постојат и микроскопи кои како извор на светлина користат сијалица вградена во основата на микроскопот.
- Дијафрагмата (блендата) овозможува регулирање на кружниот отвор низ кој поминува светлината и на тој начин се пропушта поголем или помал сноп на светлосни зраци кон објектот.
- Со помош на кондензорот се фокусираат зраците од светлосниот сноп. Движењето на кондензорот е овозможено со винт кој се наоѓа во основата на микроскопот, со што се овозможува подесување на снопот на светлоста (послабо или појако светло). Се состои од една или повеќе леќи, а функцијата му е да ги собира светлосните зраци и да ги насочува кон објектот.



МИТОЗА

Комплексот од сите животни процеси во клетката вклучувајќи го и нејзиното делење се нарекува клеточен циклус.



Името митоза често се употребува како синоним за клеточната делба, меѓутоа во суштина претставува само делба на јадрото. Името потекнува од грчкиот збор, *mitos* = конец, бидејќи во оваа делба јасно е видлива фибриларната структура на хромозомите.

Митозата главно е карактеристична за јадрото на телесните (соматските) клетки и претставува делба која е проследена со сложени промени на јадрото. Биолошката смисла на митозата се состои во тоа што овозможува правилно и точно делење и рамномерна распределба на генетскиот материјал, бидејќи двете новодобиени јадра по генетска конституција се потполно идентични со матичното јадро.

Интерфаза. Во оваа фаза се одвиваат процеси на молекуларно ниво. Тука се случува најзначајниот момент во делбата на клетката- **структурна репликацијата на наследниот материјал**, односно хромозомите од еднохроматидни преминуваат во двохроматидни структури. Интерфазата трае многу подолго од останатите фази од клеточниот циклус, бидејќи претставува подготвителна фаза за делба, односно тука се одвиваат важни процеси на синтеза на протеини, RNA, DNA и тн. Се дели на три последователни периоди: **предсинтетски (G1), синтетски (S) и постсинтетски (G2) период**. Во првиот период се врши програмирана синтеза на RNA, АТР, протеини и други соединенија битни за растот на клетката, поради што овој период се нарекува период на клеточно растење. Во синтетскиот период се врши структурното реплицирање на DNA, а во постсинтетскиот период синтезата на протеините е поинтензивна, додека синтезата на RNA постепено се намалува.

Делба на јадрото (кариокинеза). За подобро следење на промените кои се случуваат во текот на митозата, поделена е на четири фази: **профаза, метафаза, анафаза и телофаза**.

Профазата започнува со зголемување на обемот на јадрото, а потоа настануваат коренити промени во преструктурирањето на јадрото и клетката, поради што оваа фаза уште е позната како период на

реорганизација. Во зависност од степенот на реорганизација разликуваме рана и касна профaza.

Како резултат на спирализацијата настанува кондензација и скусување на хромозомите. Раната профaza се карактеризира по тоа што хромозомите кои се $(2n)$ на број и со $(4C)$ DNA вредност, имаат форма на тенки и издолжени, слабо спирализирани нишки, расфрлани низ целата внатрешност на јадрото. Во понатамошниот тек на профaza тие постепено се спирализираат, добивајќи форма на компактна структура, што им овозможува секој хромозом поединечно да се идентификува. Во касна профaza скоро истовремено со центрифугалното поместување на хромозомите доаѓа и до формирање на делбеното вретено (митотичен апарат) и појава на матрикс на хромозомите. Како краен степен на профазата претставува фрагментирањето на јадрената мембрана во ситни везикули, проследено со дисоцирање (изчезнување) на јадренцето.

По фрагментирањето на јадрената мембрана следи **прометфаза** (од периодот на движење и делба), кога хромозомите (како двехроматидни структури и во голема мера кондензирани), започнуваат да се движат кон централниот регион на јадрото и се поставуваат во т.н. екваторијална рамнина на делбеното вретено.

Само прикачени со кинетохорот од примарното стеснување за влакната (за кинетохорните или хромозомски нишки) од делбеното вретено, можат да се движат кон екваторијалната рамнина. Со самото формирање на екваторијална плоча од хромозомите, завршува прометафазата (која претставува еден вид преодна фаза).

Метфазајѝа се препознава по тоа што хромозомите се максимално спирализирани и најскусени, поради што добро индивидуално морфолошки се разликуваат односно имаат метафазен климакс во структурната организација. Со ваков степен на организација во оваа фаза хромозомите се најпогодни за морфометриска анализа и кариотипирање. Во оваа фаза освен утврдување на бројот на хромозомите, може да се уочи дека секој хромозом е изграден од две хроматиди кои се споени во центромерниот регион на примарното стеснување. Распоредени во екваторијалната рамнина на делбеното вретено, образуваат метафазна плоча. Метафазата трае доста кратко, односно до моментот кога центромерниот регион надолжно ќе се подели, со што се овозможува хроматидите да бидат една од друга независни структури и како такви се раздвојат.

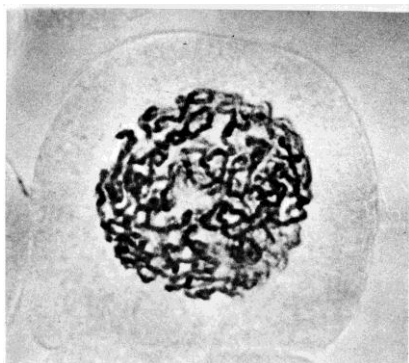
Анафазата започнува со целосно одделување на двете хроматиди и нивно насочување и движење кон соодветните полови на делбеното вретено. Секоја хроматида како иден еднохроматиден хромозом има центромерен регион во кој е сместен кинетохорот со кој се врзува за нишките од делбеното вретено. Врзани хроматидите (еднохроматидните хромозоми) постепено се движат кон двата спротивни пола. Во една клетка сите хромозоми во анафаза се движат индивидуално, меѓутоа во голема мера синхронизирано. Секој хромозом се движи со напред насочен центромерен регион (центромерно стеснување) кој ги влече хромозомските краци. И во оваа фаза во зависност од оддалеченоста од екваторијалната рамнина или половите на делбеното вретено, разликуваме неколку степени на рана и касна анафаза. Молекуларниот механизам за движење на хромозомите во анафаза не е доволно разјаснет, постојат само претпоставки и хипотези од кои најприфатливо е толкувањето според кое во центромерното

стеснување се наоѓа протеин сличен на актинот, кој се движи по микротубулите од нишките на делбеното вретено во облик на лизгачки механизам, слично на контракцијата кај мускулните влакна.

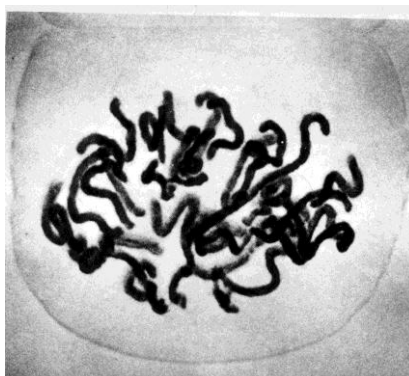
Телофазата е завршна фаза од митозата. Таа настанува кога хромозомите (како еднохроматидни структури) ги достигнуваат двата спротивни пола на делбеното вретено. Нивниот број на двата пола е еднаков, односно ист диплоиден број на хромозоми како во јадрото на мајчината клетка. Хромозомските групи на двата пола преку процес на декондензација се враќаат во состојба карактеристична за интерфазата. Паралелно со процесот на декондензација доаѓа до реконструирање на јадрените мембрани околу нивните јадра и на јадренцата. Со реконструкцијата на јадрената мембрана и јадренцата завршува телофазата при што на двата пола се добиваат две нови јадра со идентичен генетски материјал.

Овој период на реконструкција по правило завршува и со делба на цитоплазмата (процес познат како цитокинеза), со што се добиваат две нови клетки.

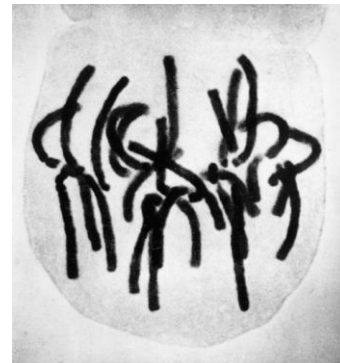
Митозата е во тесна условеност со циклусот на репликација и делење на хромозомите кој синхронно се одвива со циклусот на удвојување и делење на другите клеточни структури. Механизмот на наследување на потполната идентичност со родителските клетки зависи само од точната репликација на DNA во S-периодот од интерфазата и нејзиното правилно делење во митозата.



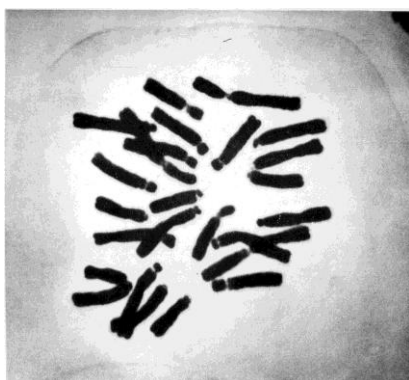
Рана профаза



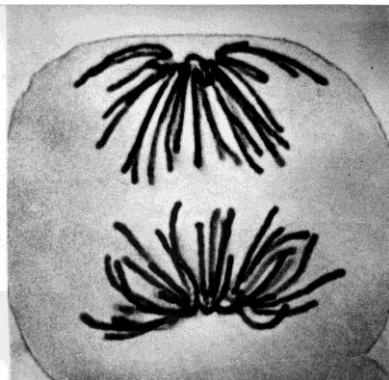
Касна профаза



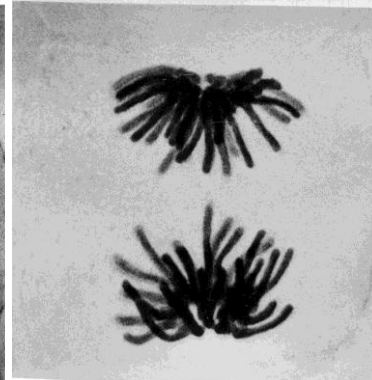
Прометафаза



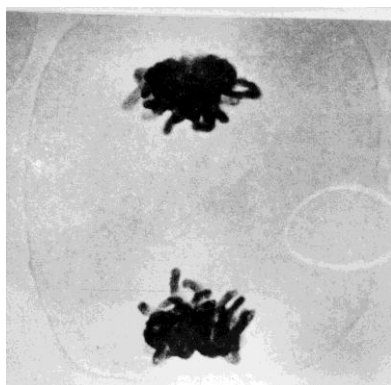
Метафаза



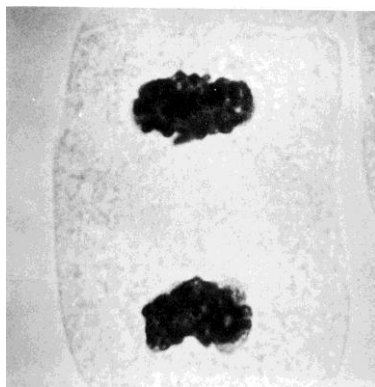
Рана анафаза



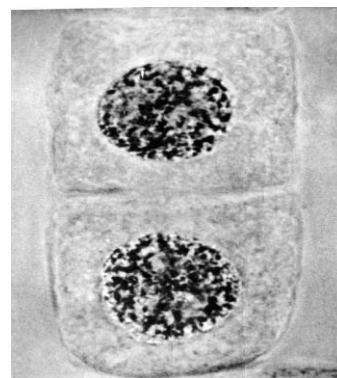
Касна анафаза



Премин кон телофаза



Телофаза



Две нови клетки

Слика 2. Микроскопски фотографии на митоза во клетки од коренов врв

МОРФОЛОГИЈА НА ХРОМОЗОМИ

Морфологијата на хромозомите најдобро може да се набљудува за време на делбата на јадрото, и тоа во метафаза кога имаме дефинитивно формирани односно морфолошки диференцирани хромозоми.

Во текот на клеточниот циклус хромозомите имаат различен изглед, односно форма.

Во интерфаза хромозомите се долги и тенки конци во деспирализирана состојба, кога не можат поединечно да се разликуваат. Бидејќи биохемиско-физиолошки се доста активни, за нив се вели дека се во *функционална форма*.

За време на делбата на јадрото (кариокинеза), хромозомите имаат форма на стапчести структури (кои интензивно се бојат со базични бои), уште позната како *транскриптивна форма*.

Големината на хромозомите како и бројот, е специфична и константна за секој организам. Кај некои организми хромозомите се ситни гранули, меѓутоа почесто се сретнуваат како куси или долги стапчести по форма хромозоми. Како бројот, така и големината и формата на хромозомите е специфична и константна за секој организам и може да послужи како таксономска карактеристика.

МОРФОЛОШКИ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИИ НА ХРОМОЗОМИТЕ

Хромозомите во метафаза како дефинитивно формирани структури со одредена форма (најчесто стапчеста) се карактеризираат со одредени морфо-функционални диференцијации:

1. *Констрикции (или сеснувања)*
2. *Хетерохроматински сегменти (региони)*
3. *Теломери*

1. Констрикции (или стеснувања)- Најважната морфолошка диференцијација на хромозомите претставуваат констрикциите, односно стеснувањата, кои можат да бидат диференцирани како примарни и секундарни.

а) *Примарна (центромерна, кинетичка) констрикција* - Примарното стеснување е карактеристично за сите хромозоми на кариотипот, со кое хромозомите се поделени на два исти или нееднакви краци.

Во примарното стеснување се наоѓаат важни структури: *центромерен регион (или центромер) и кинетохор*.

Центромерниот регион е најчувствителниот дел на хромозомот, за време на митозата и втората мејотична делба, нормална појава е центромерниот регион да се дели надолжно, при што хроматидите стануваат независни и се движат спротивно кон половите на делбеното вретено.

Примарното стеснување зазема одредено место поради што секој хромозом е поделен на два обично различни по должина делови- познати како краци на хромозомот.

Според класификацијата на **Levan и сор., (1964)** која се базира на местоположбата на примарното стеснување (односно центромерот) хромозомите можат да бидат: **ателоцентрични и телоцентрични**.

Ателоцентричните хромозоми, примарното стеснување ги дели на два хромозомски крака. Од своја страна пак ателоцентричните хромозоми по положбата на примарното стеснување и односот од должината на краците можат да бидат од:

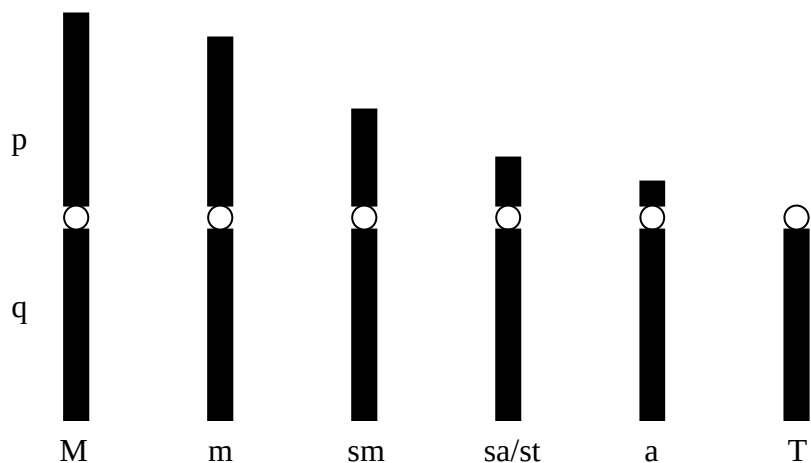
а. **Метациентричен тип** (*M* или *m*) кога центромерното стеснување се наоѓа точно во средината или околу средината (т.е. има медијална положба) и хромозомот го дели на два еднакви (со однос од 1,0-*M*) или приближно еднакви крац (со однос 1,1-1,7- *m*)

б. **Субметациентричен тип** (*sm*), кога центромерното стеснување е оддалечено од средината односно има субмедијална положба и хромозомот го дели на два нееднакви крака (со однос 1,7 - 3,0).

в. **Субacroцентричен (или субтелоцентричен) тип** (*sa, st*), кога центромерното стеснување е субтерминално и едниот крак има изразито помали димензии од другиот крак (со однос 3,0 - 7,0)

г. **Акроцентричен тип** (*A*), кога центромерното стеснување е исто така субтерминално, при што едниот крак едвај се забележува, има мали димензии во однос на долгиот крак (односот е поголем од 7,0).

д. **Телоцентричните хромозоми** (*T* или *t*) *T*- се телоцентрици во потесна смисла на зборот и немаат два крака бидејќи центромерот е терминално, на самиот крај. Со *t* се обележуваат телоцентрични хромозоми во поширока смисла, кои имаат втор крак кој е јасно видлив на светлосен микроскоп иако е со мали димензии (примарната констрикција е субтерминално, под теломерите)



Сл. 3. Типови на хромозоми, според калсификацијата на Levan и сор., (1964)

б) *Секундарна констрикција*. -Покрај примарното стеснување некои т.е. поедини хромозоми поседуваат и секундарно стеснување (констрикција), кое нема способност да се врзува за нишките на делбеното вретено. За ова стеснување најчесто е поврзан мал топчест по форма додаток на хромозомот, означен како *сателит* или *џрабан*, а хромозомите што го поседуваат се наречени сателитски хромозоми (SAT-хромозоми). Сателитите обично се наоѓаат на кратките, односно на помалите хромозомски краци. Доколку во текот на телофаза на секундарното стеснување од SAT-хромозомите, се образува јадренцето, оваа констрикција се нарекува и како нуклеоларен организатор. Секоја диплоидна хромозомска гарнитура има најмалку еден пар хомологни SAT-хромозоми. Поновите испитувања покажаа дека секундарното стеснување претставува дел од DNA која ја носи информацијата за синтеза на r-RNA, а може да се наоѓа на повеќе хромозоми во комплементот кои немаат видлив сателит.

2) Хетерохроматински региони (сејменџи)- Хетерохроматинот, иако не се разликува по состав од еухроматинот, сепак и во интерфаза останува силно кондензиран (спирализиран) односно генетски (транскрипциски) неактивен или слабо активен. За хетерохроматинската DNA (посебно DNA од конститутивниот хетерохроматин) карактеристично е тоа што касно се реплицира и претставува сателитска DNA, бидејќи се одликува со висока содржина на репетитивни (повторувачки) нуклеотидни секвенци.

Благодарение на современите техники за диференцијално бојење првенствено со giemsa, доста прецизно можат да се идентификуваат хетерохроматинските региони, односно сегменти на хромозомите, а тоа пак дава можности за подобро проучување на нивната структура.

При диференцијалното бојење со giemsa, хетерохроматинот во центромерниот регион дава т.н. C-бендови (траки), додека од интеркаларниот (средишен или вметнат односно по должината на краците) и терминалниот (на краевите од краците) се добиваат G -

бендови.

3) Теломери - Терминалните делови на хромозомските краци иако не покажуваат видливи морфолошки диференцијации, по своето однесување се разликуваат од останатиот дел на краците. Овие делови се познати како теломери. Овие структури се наоѓаат исклучиво на краевите на хромозомите и во рамките на нормалните структурни промени на хромозомите никогаш не заземаат интеркаларна позиција. Тие се многу позначајни по функцијата која им се препишува, одколку како морфолошка карактеристика на хромозомот.

Според истражувањата на некои автори овие дистални региони на хромозомите во интерфаза секогаш се појавуваат како кондензирани хетерохроматински делови на хромозомите. Кај хуманите хромозоми е регистрирано присуство на повторувачки тандем на TTAGGG-секвенцата која се одржува со активноста на ензимот теломераза. Теломерите како специфични делови овозможуваат заштита на интегритетот и индивидуалноста на хромозомите во тек на делбениот циклус. Благодарение на теломерите отсуствува хаотично и неконтролирано спојување на хромозомите. Доколку не би имале таква функција, за време на клеточниот циклус би се појавиле најразлични хромозомски формации

кои би условиле низа негативни појави.

Посебно важно е тоа што во кариокинезата поточно во анафазното движење двата теломерни делови на секој хромозом се ориентираат и движат кон едниот пол односно се униполарни.

Катастрофално би било за структурниот интегритет на хромозомите доколку теломерите би имале спротивна ориентација односно би биле биполарни.

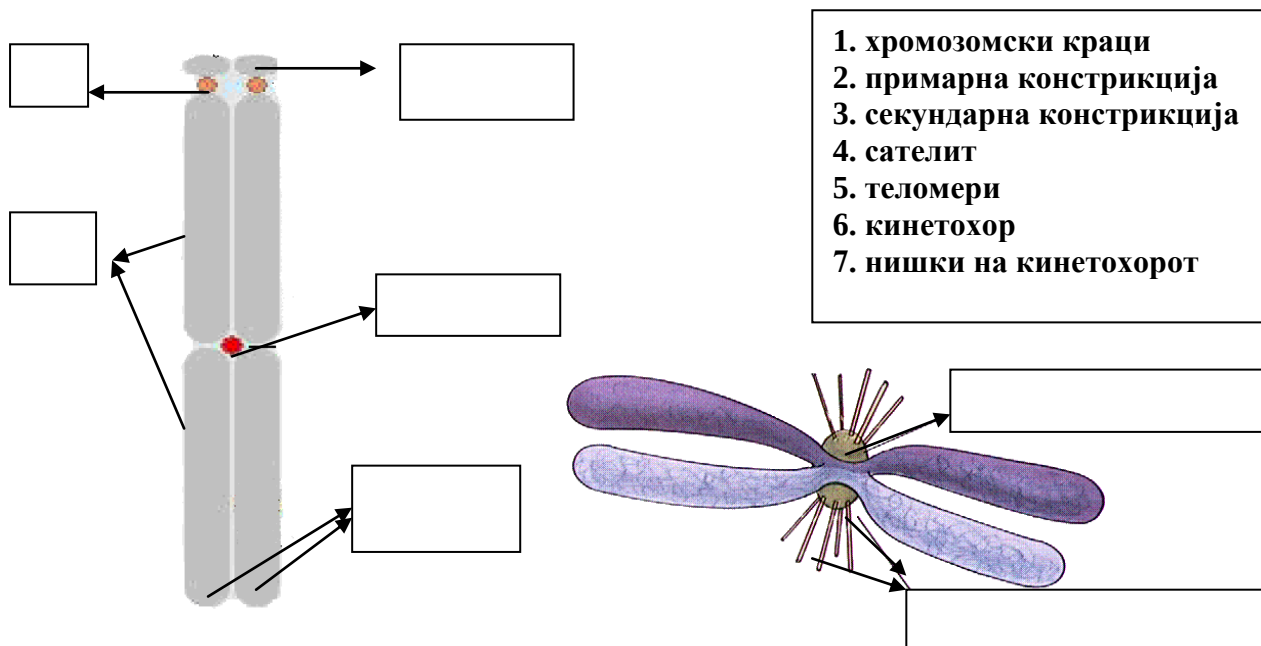


Сл. 4. Хромозоми на чии краеве се наоѓаат теломери
- посветло обоени.

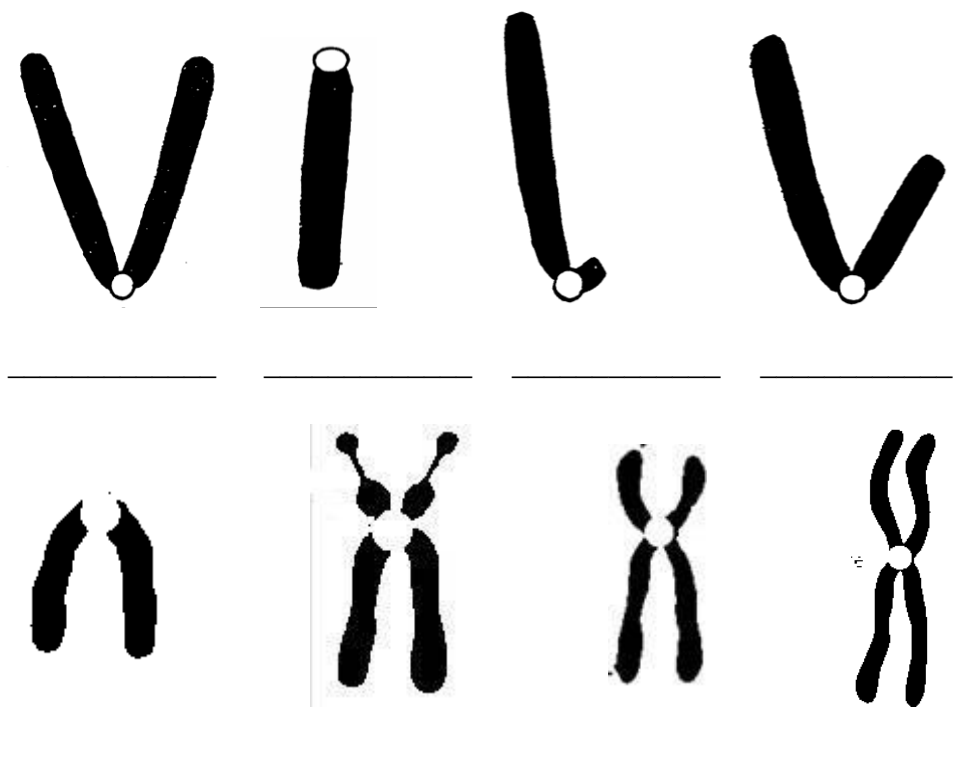
1. Типови на хромозоми според положбата на центромерот

Задачи:

1. Означете ги соодветните морфо-функционални диференциации и делови на прикажаниот метафазен двохроматиден хромозом.



2. Да се определи типот на хромозом според положбата на центромерот и да се означат со соодветните ознаки (M, m, sm, a, t)



ИЗРАБОТКА НА ПРЕПАРАТИ ЗА КАРИОЛОШКА АНАЛИЗА ОД РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ

Во процесот на биолошката едукација особено на ниво на додипломските студии од особено значење е темата-набљудување на хромозоми на светлосна микроскопија. Од таа причина посебно внимание ќе се обрне на изработка на препарати од растителен материјал, за која се развиени бројни, релативно едноставни техники на препарирање. Микроскопските препарати се неопходни за различни цели во научните истражувања од областа на цитогенетиката. Изработката на квалитетни микроскопски препарати а посебно за набљудување на хромозоми, зависи пред сè од точноста во реализирањето на протоколот при обработката на материјалот, од предтретманите преку обојувањето па до самата изработка на препаратите.

Предтретмани

Предтретманите овозможуваат специфични физички промени во цитоплазмата и јадрото кои ќе помогнат во анализата на морфологијата на хромозомите, различниот степен на нивното скратување (кондензирање), што е неопходно за понатамошното нивно испитување. По применувањето на поголем број предтретмани ткивото треба да се испере, а потоа да се фиксира. Предтретманите може да се различни, поради индивидуалните специфики на растителниот материјал треба да се избере она комбинација која дава најдобри резултати. Во текот на оваа фаза на подготовка на материјалот, најчесто се користат цитостатици од типот 8-hydroxyquinoline (оксикинолин како 0,002 М раствор), колхицин (0,01 % р-р), α -бромнафталеин, парадихлорбензол и др. Употребата на **оксикинолин** како цитостатик во предтретманите всушност претставува комбинација на хемиско предтретирање со ладен третман, бидејќи за време на третманот материјалот се чува на ниска температура. Успешно може да се примени за поголем број монокотилни растенија.

Фиксирање и фиксативи

Фиксирањето е процес во кој треба да се прекинат и да се зачуваат структурите на клетката во состојба што поблиска на природната. За добар фиксатив се смета оној кој во најмала мера го менува хемизмот на клетката и најдобро ја сочувува нејзината структура. Многу е тешко во фиксираниот материјал да се сочува состојбата како и кај живиот организам. Поради тоа, многу е важно фиксирањето да не влијае негативно на применетиот третман кој го следи фиксирањето (хидролиза, боење и др.). Успехот или неуспехот на фиксирањето може да се оцени врз основа на квалитетот на препаратот кој се испитува. Важно е со фиксирањето да се постигне тоа што е неопходно за целта поставена во одредени испитувања. На пример, доколку треба да се утврди бројот на хромозомите, важно е тие добро да се распоредат за да може да се обојат, а ако цитоплазмата е светла, фиксирањето треба да ја сочува структурата на хромозомите, но не и цитоплазмата. Протоплазмата е колоидна и во

допир со фиксатив доаѓа до дисперзија и хидратација на протоплазмата, како и други колоидни промени, при што сето тоа доведува до неповратна состојба. Со фиксирањето мора да се зачува структурата, но поважно е да овозможи да невидливите или послабо видливи структури се направат помаркантни за понатамошна успешна анализа. Концентрацијата на водородните јони (pH) повеќе влијаат разорно отколку на зачувување на структурите. Протоплазмата најлесно коагулира на својата изоелектрична точка, при што таа на јадрото има значително покисела изоелектрична точка, па затоа јако киселите фиксативи многу малку предизвикуваат коагулација на цитоплазмата, а повеќе ги разоруваат нејзините компоненти. Од тие причини, јаките киселини се слаби фиксативи за цитоплазматските структури, додека јадрото и хромозомите добро се фиксираат со поголем број кисели фиксативи. Фиксирањето затоа претставува контрадикторен процес, бидејќи одредени структури фиксира, а одредени разорува.

Фиксирањето пред сè треба да овозможи и добро боење на препаратот, со цел да се постигне што поголем оптички контраст. Слабото боење често може да биде резултат на несовршено фиксирање, а слабото боење, после совршеното фиксирање е резултат на комбинацијата на својствата на бојата и фиксираните субстанции. Затоа е потребно да се избере фиксатив, кој нема да има негативен ефект, особено при боењето на препаратите. Најчесто за фиксирање се користат течни мешавини на различни реагенси кои секако имаат и предности и недостатоци. За правење мешавини потребно е да се води сметка за комбинирањето на реагенсите, па така се избегнува да се комбинираат два реагенси со исти недостатоци. Сите фиксативи не се подеднакво добри за сите организми, затоа е потребно често да се менуваат пропорциите на поедини реагенси, за да се прилагодат на одредениот организам.

При изборот на фиксативот кој ќе ги даде потребните резултати особено треба да се води сметка за брзината на неговото продирање. Ацетик-алкохол и пикро-ацето-формалин во комбинација продираат многу брзо, додека комбинацијата од хромна и осмиумова киселина споро продираат во растителното ткиво. Малите организми се фиксираат цели, додека големите треба да се исечат на помали делови, за да се овозможи брза и униформна пенетрација на фиксативот. Волуменот на фиксативот треба да биде десет пати поголем од волуменот на ткивото кое се фиксира, па обично, основните грешки кои се прават во текот на фиксирањето е што количината се намалува поради штедење на реагенсите. На одредени видови тоа не се одразува негативно на интензитетот на обојувањето, но во принцип најголемите проблеми при кариотипизацијата произлегуваат поради недоволна обоеност на хромозомите, а најчеста причина за лошото и несоодветно обојување е токму неправилната фиксација на материјалот.

Реагенси за фиксирање

96% етил алкохол- Многу погодно средство за чување на материјали и затоа често е во употреба. Брзо и лесно оксидира и преминува во ацеталдехид и калиум ацетил ацид, на смее да се меша со хромна киселина, бихромат или осмиум тетраоксид, а бидејќи добро продира, погоден е за мешање со формалинот, глацијалната оцетна киселина и пропионската киселина. Алкохолот врши данатурација на протеините, а масните и фосфолипидите ги раствора.

Глацијална оцетна киселина- Овој реагенс повеќе претставува средство за чување отколку за фиксирање. Според некои автори, тој влијае на собирање на ткивото, додека други испитувачи тврдат дека влијанието е спротивно односно дека го шири ткивото. Оваа киселина ги "чува" простите протеини и масти, но првенствено претставува средство за чување на хроматинот, и има голема продорна моќ.

Фиксативи

Претходно се споменати некои од реагенсите кои се користат при процесот на фиксирање, меѓутоа за фиксирање обично не се користат чисти реагенси, туку течности за фиксирање, односно мешавина од поедини реагенси. Вакви течности има релативно многу, а главни состојки се формалинот, оцетната или хромната киселина, или пак мешавина од овие основни состојки. Ќе споменеме само некои најчесто употребувани мешавини.

Klarke-ов фиксатив

(**Carnoy I** ; Farmer-ова течност) 3:1

3 дела 96% етил алкохол

1 дел 96% оцетна киселина

Carnoy II (6:3:1)

100% алкохол-6 дела

хлороформ-3 дела

ледена оцетна киселина-1дел

Боење и приготвување на боја

Клеточните органели после фиксирањето многу малку се разликуваат во индексот на прекршување, така што микроскопското испитување на клеточните структури е доста тешко. Затоа е неопходно да се изврши боење на клеточните структури за да дојде до нивна диференцијација, со што се олеснува и овозможува нивното испитување под микроскоп.

Основи при боењето

Сите бои се соли, кои спрема реакциите се делат на базни и кисели. Базните бои се соли на комплексните органски бази, или катјони кои носат боја за простите киселини (хлороводородна или сулфурна), а киселите бои се органски киселини, анјони и се комбинираат со неоргански бази. Јадрото на живите клетки има рН вредност 7.5-7.6, а цитоплазмата рН 6.7-6.9. По фиксирањето состојбата е обратна, бидејќи јадрото делува како киселина и се бои со базични бои, додека цитоплазмата се однесува како база и се бои со кисели бои. Различните растителни организми имаат различна способност за боење. Способноста за боење на исти органи од различни растителни видови е различна и при примена на потполно исти третмани, па поради тоа способноста за боење многу зависи од начинот на фиксирање, како и од претходните третмани.

Приготвување на бои кои најчесто се употребуваат за боење на растителен материјал:

Ацето-орцеин

Се раствара 1 gr осеин во 45 ml врела глацијална оцетна киселина, а потоа се лади и се разблажува со 55 ml дестилирана вода за да се добие 1% раствор. Се чува во фрижидер, а пред употребата се врши филтрирање. Оваа боја е добра за боење на меристемот на врвот на корењата, и се користи како дополнителна боја и медиум во кој се мацерира коренот обоен со базичен фуксин.

Фуксин

Се става 200 ml дестилирана вода да проврие, а потоа се додава 1 gr базичен фуксин (треба да се додава полака и со големо внимание за да не се расее количината, а тоа редовно се случува бидејќи станува збор за лесна супстанца, која во допир со вода подоцна при чистење на работната површина, веднаш е активна и бои интензивно црвено). Добро се премешува и се лади до 50°C, а потоа се филтрира. Потоа се додава 30 ml NHCl и 3gr Potassium metabissulphite (калиум метабисулфат). Се остава на темно место, а по 24 часа се додава 0.5 gr активен јаглен, добро се меша и се филтрира во темно шише. До употребата се чува во фрижидер на темно. Тоа е доста специфична јадрена боја, која кога правилно ќе се употреби ги бои само хромозомите, а не и цитоплазмата и другите органели.

Хематоксилин

- 1 gr хематоксилин
- 3 gr хромова стипса
- 2 ml 5% сулфурна киселина
- 4 ml 5% калиум хромат

Во 100 ml дестилирана вода се раствора 1 gr хематоксилин. Во други 100 ml дестилирана вода се раствора 3 gr хромова стипса. Двата раствора се мешаат и се додава 2 ml 5% сулфурна киселина и 4 ml 5% раствор на калиум хромат. Вака направена, бојата се остава на темно 1-2 дена, а потоа се филтрира. Се чува во добро затворено шише во фрижидер 1-2 месеци.

Начин на боење со:

Хематоксилин

Пред да се започне со боењето во флакончињата со коренчиња, се менува растворот односно се истура претходниот и се додава 75% алкохол. Во петриевка се истура флаконот со коренчињата, кои се оставаат на филтерна хартија да се процедат. Потоа со пинцета се земаат и се префрлаат во саатно стакло со 50% алкохол 10 мин., па потоа уште 10 мин. во дестилирана вода. За тоа време во термостатот се загреваат на 60°C HCl и 2 ml во флаконче од хематоксилинот. По 10 мин. од дестилираната вода материјалот се вади на филтерна хартија 1-2 sek, па се ставаат во HCl и стојат во термостат 9-14 мин (зависно од видот). Повторно се испираат 1 мин во дестилирана вода. Се пренесуваат во боја, каде стојат 1 h исто во термостат. Од бојата со пинцета се вадат внимателно коренчињата во петриев сад и се промиваат со 45% оцетна киселина неколку пати. Коренчињата од бојата добиваат темно виолетова до црна боја. Едно по едно се вадат од саатното стакло со 45% оцетна киселина, и им се отстрануваат врвчињата на предметно стакло, кое претходно стоело во 96% алкохол и е избришано со сува крпа. Со метално

стапче-тапер се мацерираат врвчињата и во текот на мацерирањето се распоредуваат по површината на предметното стакло. Потоа се покриваат со покровно стакленце, се замотуваат со филтерна хартија и се тапкаат со гумичка за да се распоредат хромозомите во една рамнина.

Фолген

Од фиксативот сосема кратко коренчињата се ставаат во дестилирана вода. Потоа се цедат на филтерна хартија и се префрлуваат во HCl, за да се изврши хидролиза (времето зависи од видот, обично трае од 6-15 минути, но кај некои житарици е потребна подолга хидролиза). Повторно се цедат на филтерна хартија и се пренесуваат во фолген на собна температура од 1.5 до 2 часа. Откако се обојат, коренчињата се вадат и се ставаат во 45% оцетна киселина. Се зема коренче по коренче и се префрлуваат на предметно стакло во капка свежо филтриран орцеин, при што се сечат само обоените врвови со меристемско ткиво. Кога ќе се направат препаратите многу брзо треба да се микроскопира, бидејќи орцеинот прави додатни боења.

Метод за правење на трајни препарати

Овој начин за правење на трајни препарати може да се користи и за митоза и мејоза, без оглед на методот по кој препаратите се подготвувани.

Потребен прибор и хемикалии- За правење на трајни препарати, потребно е да се има најмалку три кадички за препарати, шише со капаче, капалка и пинцета. Кадичките за препаратите мора да имаат капак и прегради за препаратите, а можат да се користат стаклени или пластични кадички. Шишето со капаче за ЕУПАРАЛ треба да има широко грло, како и стаклена прачка со која ќе се пренесува на препаратот во вид на капки. Шишето секогаш треба да биде затворено затоа што ЕУПАРАЛОТ е на база на алкохол, лесно испарува и се згуснува, поради што повремено треба да се разређува до потребната густина со специјален растворувач. Пинцетата треба да е поголема и со пошироки врвови. Потребни хемикалии се: глацијална оцетна киселина, апсолутен етил алкохол, дестилирана вода и ЕУПАРАЛ или КАНАДА БАЛСАМ. Покрај наведените хемикалии потребна е и филтерна хартија која при тоа треба да биде рапава бидејќи подобро впира.

Во една кадичка се става 10% глацијална оцетна киселина, во друга 95% етил алкохол и во трета апсолутен етил алкохол. Обавезно треба да се обележат кадичките, во која што се наоѓа и да се држат во дадениот распоред. Кадичките треба да се поклопат со капак, а хемикалиите секогаш да се подготвуваат непосредно пред почетокот на работата.

Препаратот се става во 10% оцетна киселина, за да се одвои покровното стакленце од предметното стакло. Кога ќе се одвојат и двете се ставаат во 95% алкохол, каде стојат неколку минути. Потоа се префрлаат во апсолутен алкохол, каде исто така стојат неколку минути или подолго. При префрлувањето на покровното стакленце и предметното стакло од една хемикалија во друга, претходно треба да се цедат на филтерна хартија. После одредено време, се вадат покровното стакленце и предметното стакло од апсолутниот алкохол и се ставаат на филтерна

хартија додека потполно не се исушат. Треба да се внимава страните кои се соединуваат да бидат свртени нагоре. Соединувањето може да се изврши со КАНАДА БАЛСАМ или со ЕУПАРАЛ. Доколку соединувањето се врши со ЕУПАРАЛ не е потребно предметното стакло и покровното стакленце да се сушат, туку соединувањето се врши веднаш по вадењето од алкохолот. Користењето на ЕУПАРАЛ е многу погодно, бидејќи се добиваат подобри препарати и може побрзо да се работи. Најдобро е да се капне капка од балсамот или ЕУПАРАЛОТ на покровното стакленце и предметното стакло да се притисне одозгора. Направениот препарат може повремено да се подледне под микроскоп и при тоа треба да се остави најмалку 24 часа да се исуши(а подобро би било да се остави неколку дена или недели). За време на сушењето, препаратот треба да се чува на рамно и отворено место. Првите неколку дена треба да се чува на филтерна хартија на маса, а после можат да се чуваат и во делумно затворена кутија, но треба да бидат на рамно место и да капакот од кутијата не го допира покровното стакленце. Препаратите се напълно суви после неколку месеци. Според методот на Bowen (1956) од привремените препарати се изработуваат трајни со употреба на течен јаглород диоксид. По обележувањето на ивиците на покровното стакленце со масен молив и краткотрајно смрзнување на препаратот со течен јаглороден диоксид, внимателно се одлепува покровното од предметното стакленце и се испира со апсолутен алкохол за време од 1 мин, да влезе вишокот боја. Може да се направи и дополнително испирање кога препаратите се боени со фолген, односно дообојувани со кисел орцеин. Двете стакла се цедат на филтер хартија и пред да се засушат им се капнува една капка од ЕУПАРАЛОТ, и се вклопуваат при што е особено важно да се вратат на истата, претходно означена позиција. Вишокот на ЕУПАРАЛ се впира со филтерна хартија со која полка се притиска вертикално одозгора за да не се поместат стакленцата. Вака направениот препарат се означува или етикетира, а потоа се остава во сушилник на 30 °C, да се суши околу 15-30 дена.

МИТОТСКИ ИНДЕКС

Растот на клеточната популација се јавува на тој начин што клетките минуваат низ интерфаза и митоза за да го комплетираат својот клеточен циклус. Многу клетки како што стареат го губат својот капацитет за делба и на крајот се делат многу ретко. Други клетки пак се способни за рапидна делба, како што се на пример иницијалните клетки кои се наоѓаат поблиску до врвот на коренот, односно апикалниот меристем, кои се делат многу интензивно, и на тој начин коренот се издолжува и нараснува. Со квантифицирање на популацијата на клетки кои се во делба, би можело да се анализира како клетките се разликуваат во нивната способност за делба. Експериментално би можеле да ги менуваме вредностите на клеточната средина и да ги мериме ефектите на таа промена врз клеточната делба. Еден од начините да се изврши тоа квантифицирање е со пресметување на митотскиот индекс. Всушност, митотскиот индекс е оној дел од комплетниот број на клетки во меристемските ткива, кој се наоѓа во митоза без оглед на фазата од делба во која се наоѓаат (од профаза до телофаза). Се изразува во број на клетки во делба на 100 клетки вкупно.

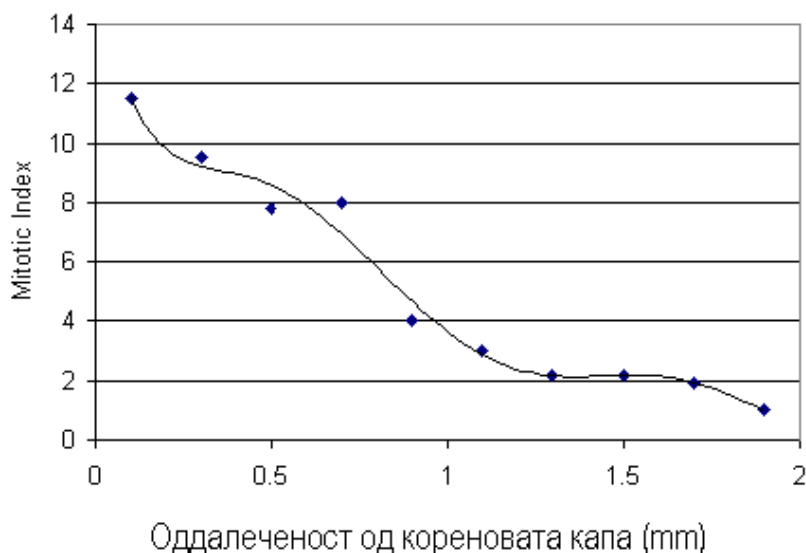
број на клетки во митоза

$$\text{Митотски индекс} = \frac{\text{број на клетки во митоза}}{\text{вкупен број на меристемски клетки}} \times 100$$

Обично се земаат 1000 клетки, а бројот на препарати кои се вклучени во мерењето кај различни автори донекаде варира. Така на пример, Scott и Evans (1967), земаат по 1000 клетки од секој од четирите препарати кои ги земаат за обработка, Bauchinger и сор., (1972), анализираат по 1000 клетки само од два препарати, а Knuutila (1979), по 1000 до 2000 клетки на седум препарати од еден субјект. Се разбира дека релевантни резултати се добиваат кога мерењата ќе се направат на што поголем број препарати.

Речиси во сите популациски истражувања, особено од областа на мутагенезата кога се врши анализа на хромозомите во текот на митотскиот и мејотскиот клеточен циклус, врз основа на типовите аберации кои се јавуваат кај нив, употребен е митотскиот индекс како индикатор за митотската активност. Митотскиот индекс ќе се промени (обично ќе се намали), ако воопшто се делува со било кој агенс, што значи дека тој е примарен одговор на организмот (животински или растителен), на изменетите услови во животата средина. Освен тоа, и секоја промена на концентрацијата на тој ист агенс, ќе се одрази прво преку изменет митотски индекс. Поради тоа, сосема е очекувано дека по престанокот на делувањето на агенсот на организмот, митотскиот индекс повторно ќе се промени. Со комплетниот прекин на делувањето на агенсот на организмот исчезнува и

и притисокот кој го вршат тие агенси на клетките, и доколку не се работи за трајни повреди на генетскиот материјал, би требало митотскиот индекс повторно да се доближи до нормалниот. Од тие причини митотскиот индекс е добар показател



за времетраењето и интензитетот на опоравувањето. Така, од хромозомските студии на хуманите леукоцити по *in vitro* експозиција на соли од тешки метали (цинк хлорид, олово ацетат, кадмиум хлорид) со три различни субтоксични концентрации Deknudt и Deminatti (1978), констатирале дека кај сите тестирани соли митотскиот индекс опаѓа со зголемувањето на концентрацијата на истата. Културите третирани со најголемата субтоксична концентрација покажале дека се несоодветни за изведување на хромозомските анализи бидејќи митотските индекси биле премали.

Митотскиот индекс може да биде употребен за да се проучува клеточната пролиферација во примарното кореново ткиво, при што клетките во митоза се бројат од различни региони на коренот. При тоа, митотскиот индекс се намалува со зголемување на дистанцата од врвот на коренот бидејќи апикалниот меристем, кој се наоѓа веднаш под кореновата капа, ги содржи најголемиот број на клетки во делба кои многу брзо го завршуваат клеточниот циклус.

Пример за табеларно прикажување на измерени вредности за Митотски индекс, во компаративни испржувања помеѓу контролни и истржирани организми (1X-4X)

%		Контрола	1 X	2 X	3 X	4 X
МИ		8,36	4,90	2,82	3,52	2,13
Интерфаза		91,64	94,41	96,30	96,48	97,33
Профаза		4,56	2,60	1,12	1,79	1,02
Прометафаза		1,00	0,26	0,05	0,34	0,25
МЕТАФАЗА	Нормални	2,00	0,66	0,38	0,38	/
	Дефектни	/	0,95	0,88	0,55	0,14
	Вкупно	2,00	1,62	1,26	0,94	0,14
АНАФАЗА	Нормални	0,24	0,05	0,05	0,04	/
	Дефектни	/	0,05	0,10	0,04	0,03
	Вкупно	0,24	0,10	0,15	0,08	0,03
ТЕЛОФАЗА	Нормални	0,56	0,24	0,19	0,32	0,40
	Дефектни	/	0,08	0,05	0,04	0,28
	Вкупно	0,56	0,32	0,24	0,36	0,68
ДРУГИ ДЕФЕКТИ		/	0,69	0,88	0,30	0,68

РЕДУКЦИОНА ДЕЛБА- МЕЈОЗА

Слично како претходната кариокинеза и мејозата се означува со најразлични имиња, меѓутоа, тоа се главно термини со значење кое е спротивно од суштинските промени во текот на мејозата. Според повеќе автори за најправилни се сметаат термините: мејоза или редукциона делба, бидејќи тие ја истакнуваат најважната биолошка карактеристика во овој процес, односно намалувањето или редукцијата на хромозомскиот број.

Во еволуцијата на животот, главно место зазема половото размножување, бидејќи процесот на рекомбинација условува наследна менливост на генетскиот материјал.

Кај половото размножување развитокот на новиот организам започнува од една клетка на зиготот која е добиена како резултат на оплодувањето (сингамија), кога освен плазмогамија (фузија на две цитоплазми) има и кариогамија (соединување на две јадра).

Добиениот зигот, како продукт на кариогамијата, секогаш содржи диплоиден број на хромозоми ($n+n=2n$), што значи гаметите имаат

хаплоиден број на хромозоми. Од ова произлегува дека и сите соматски (телесни) клетки на новиот организам, добиени со митотична делба на јадрото од зиготот, содржат $2n$ хромозомски број. Ако гаметите на новиот организам би имале ист хромозомски број како и соматските клетки, тогаш по извесен број на генерации во соматските клетки би се нашол неверојатно голем број на хромозоми. Меѓутоа, од друга страна познато е дека единките на еден вид во сите генерации имаат константен хромозомски број, од што може да се констатира дека при формирањето на гаметите или порано, мора да доаѓа до редукција (намалување) во хромозомскиот број од $2n$ на n , за да при следната кариогамија се добие повторно нормален диплоиден број на хромозоми. Ваков процес на редукција се остварува преку мејотската или редукциона делба на јадрото во клетките, кои ќе ги дадат гаметите.

За мејозата карактеристични се два процеса кои битно се одразуваат врз морфологијата, структурата и однесувањето на мејотските хромозоми.

1. Редукцијата на хромозомскиот број е тесно поврзана и условена од двократното делење на хромозомите, каде DNA еднократно е реплицирана во предмејотската интерфаза.

$$2n_{(2C)} \rightarrow 2n_{(4C)} \Rightarrow M_1 (n_{4c} + n_{4c}) \rightarrow M_2 (n_{2c} + n_{2c} + n_{2c} + n_{2c})$$

Коњугацијата на хомологните хромозоми во профаза од првата делба, условува во првата анафаза да се одвојуваат и патуваат кон спротивните полови цели хромозоми како двехроматидни структури, со што всушност се врши редукција во хромозомскиот број, а при втората делба доаѓа до одвојување на сестринските хроматиди, што е идентично со митотичната делба на хромозомите.

2. Процесот на рекомбинација на генетскиот материјал е условен со размена на делови помеѓу хомологните несестрински хроматиди (crossing-over), и со можните комбинации на нехомологните хромозоми при нивното одвојување во првата анафаза.

Мејозата претставува посебна варијанта на кариокинеза во клеточниот циклус, бидејќи јадрото по еднократна синтеза на DNA во предмејотската интерфаза се подложува на две последователни делби. Инаку двете мејотски делби можат да бидат разгледувани како серија од фази слични на митотските, со таа разлика што фазите од првата делба се означуваат со индекс еден-I, а од втората со два-II.

Една од позначајните разлики помеѓу митозата и мејозата, претставува **профаза-I**, бидејќи е подолготрајна и со многу посложени промени на хромозомите, кои се карактеристични за оваа фаза.

Промените на хромозомите што се случуваат во **профаза-I** даваат можност да се подели во неколку стадиуми чии имиња се во согласност со состојбата на хромозомите, а тоа се: *лејџоџен*, *зиџоџен*, *џахиџен*, *дифлоџен* и *дијакинеза*.

Во *лејџоџен* бидејќи хромозомите се долги деспирализирани конци (нишки) тешко може да се зборува за идентитетот на хромозомите. Со биохемиски методи и со електронско-микроскопски проучувања се утврдило дека хромозомите се со реплицирана структура, односно секој

хромозом има DNA вредност од $4C$, а бројот на хромозомите е $2n$ еднаков на соматскиот хромозосмки број. Поради високиот степен на декондензација во овој стадиум неможе да се види двехроматидната структура на хромозомите. Кај некои организми во лептотен, хромозомите можат да бидат со теломерните сегменти (краевите на краците) ориентирани кон дел од јадрената мембрана, при што доаѓа до образување на т.н. букетен стадиум.

Во следниот стадиум **зигоџен** хомологните хромозоми од диплоидната гарнитура, постепено се зближуваат еден до друг, при што по целата должина странично се спојуваат. Спојувањето односно соединувањето на хомологните хромозоми во парови, **биваленти**, најчесто започнува од теломерите, а може и од центромерниот регион, а потоа постепено продолжува по целата должина на хромозомите. Ваквото взаемно привлекување и спојување на хомологните хромозоми во биваленти се нарекува **коњугација** или **sinapsis**.

Кога коњугацијата е целосна, тогаш изгледа јадрото како да содржи хаплоиден број на хромозоми, меѓутоа, тоа е бројот на бивалентите.

За одржување на коњугираните хромозоми како стабилни биваленти односно на растојание од околу 100 nm, голема важност има структурата позната како **синаптички (или синаптонемален) комплекс**, која е карактеристична за сите еукариоти кои имаат полов процес на размножување. Во основа оваа структура има протеинска природа. Поточно во синаптичкиот комплекс кој има изглед како трислојна лента, разликуваме две странични компоненти со дебелина од 30-60 nm и централен дел со дебелина од 10-40 nm. Една странична компонента остварува контакт само со едната хроматида на еден од хомологните хромозоми во рамките на бивалентот.

Докажано е дека уште во зиготенскиот стадиум може да дојде до **crossing-over** (реципрочна размена на хомологни нуклеотидни секвенци помеѓу DNA од несестринските хомологни хроматиди). Молекуларниот механизам на crossing-over-от, укажува дека рекомбинацијата започнува уште во зиготен.

Кај некои објекти, пример како кај пченицата (*Triticum*), идентификувани се гени кои го детерминираат образувањето на синаптичкиот комплекс.

Резултатите од поновите проучувања укажуваат дека синаптичкиот комплекс освен како фактор на стабилноста на бивалентите, претставува структура која ги доведува во строга наспрамност нуклеотидните секвенци на DNA од хомологните хроматиди, со што се постигнува главниот предуслов за да може потоа да се изврши процес на crossing-over, рекомбинација помеѓу DNA од несестринските хроматиди.

Неспособноста за образување на синаптички комплекс условува појава на asinapsis (некоњугираност, неспарување на хромозомите), а со тоа и до скратување на времетраењето на профаза-1 потоа до намалување на фреквенцијата на crossing-over и појава на хаотично движење на хромозомите во анафаза-I.

Пахиџенскиот стадиум се карактеризира со видливо зголемување на јадрото со јадренцето. Меѓутоа, негова посебна одлика е тоа што тука јасно се истакнува хромомерната структура на хромозомите, што дава

можност да се направат цитолошки карти на хромозомите во пахитен.

Со светлосен микроскоп се забележува дека во пахитен секој хромозом е составен од две сестрински хроматиди, а секој бивалент од четири хроматиди и често бивалентите се нарекуваат тетради. Секој бивалент (тетрада), поседува две центромерни стеснувања.

На крајот на пахитен се случува и најкарактеристичната појава за мејозата, размената на хомоложни сегменти помеѓу несестринските хроматиди во бивалентот односно рекомбинација или crossing-over.

За време на *диџлојенои* започнува одвојување и постепено оддалечување на хомоложните хромозоми во бивалентот, меѓутоа до целосно одвојување на двата хомолога во овој стадиум не доаѓа, бидејќи на поедини места остануваат и понатака спарени. Во диплотен можат да се видат многу појасно четирите хроматиди во бивалентот, бидејќи на одредени места се вкрстено преплетени. Точките каде хомоложните несестрински хроматиди се споени, претставуваат места каде се извршил crossing-over и се познати како **хијазми**.

Раскинувањето и размената на хроматидни сегменти може да биде како помеѓу сестринските, така и помеѓу несестринските хроматиди, меѓутоа биолошко значење имаат рекомбинациите помеѓу несестринските хроматиди, бидејќи само тогаш се остварува рекомбинација на генетски материјал. Бројот на хијазмите по бивалент е различен и се смета дека е во корелација со должината на хромозомите. Во диплотен бројот на хијазмите постепено се намалува или уште тоа е познато како процес на терминализација на хијазмите. Се смета дека процесот на терминализација е во корелација со поизразениот процес на кондензација, кој условува скусување на бивалентите и намалување на јадренцето на крајот на диплотен.

Во *дијакинеза* спирализацијата односно кондензацијата на хомоложните хромозоми во бивалентите скоро е максимална, во резултат на што се добиваат скусени и задебелени биваленти и со скоро завршена терминализација на хијазмите, така што кај повеќето биваленти хомоложните хромозоми се поврзани само со терминали (на краевите) хијазми. Како резултат на процесот на терминализација на хијазмите, во дијакинеза бивалентите добиваат карактеристични морфолошки својства.

Освен овие промени за профaza-I, карактеристично е и фрагментирањето на јадрената мембрана и јадренцето и формирање на делбено вретено, со што и завршува профaza-I.

Потоа настапува *прометфаза-I*, во која и двата хомоложни хромозоми од бивалентите со своите центромерни стеснувања се прикачени за нишките од делбеното вретено и како цели биваленти се движат кон екваторијалната рамнина каде ќе формираат екваторијална плоча.

Во *метфаза-I* бивалентите во екваторијалната рамнина се поредени така што двата центромерни региона од хомоложните хромозоми се ориентирани кон спротивните полови. Меѓутоа, бивалентите во екваторијалната плоча се ориентирани независно еден од друг, а таквата појава дава можност за најразлично комбинирање на родителските хромозоми во наредната анафаза-1. За оваа фаза карактеристично е тоа што хијазмите се максимално редуцирани во резултат на максималната

кондензација на хромозомите.

Анафаза-I почнува кога се прекинуваат последните хијазми, со што настанува оддвојување на цели хомологни хромозоми и како такви се движат кон спротивните полови на делбеното вретено. Во резултат на ваквото оддвојување (сепарација) и движење на цели хромозоми, во анафаза-1, всушност се врши и редукција на хромозомскиот број. На тој начин на двата пола, односно во двете новодобиени јадра ќе има хаплоиден хромозомски број, меѓутоа, секој хромозом претставува двохроматидна структура со 4C DNA вредност.

Телофаза-I настанува кога хромозомите ќе достигнат на половите. Оваа фаза трае доста кратко, бидејќи брзо се формираат две нови јадра со мал степен на деспирализација на хромозомите.

Во некои случаи по формирањето на двете јадра брзо се дели и цитоплазмата така да се добиваат две клетки или често уште се нарекува **дијада**. Но, многу почесто отсуствува делбата на цитоплазмата (цитокинезата) и во општата цитоплазма се задржуваат две хаплоидни јадра.

Заради реплицираната структура на хромозомите, интерфазата најчесто целосно изостанува или сосема кратко трае што брзо двете јадра се подложуваат на втората делба.

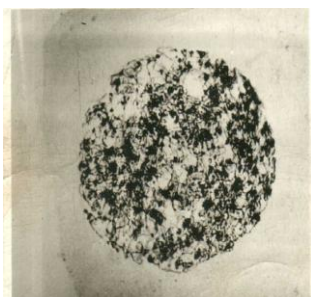
Мејоза-II обично брзо се одвива. Ја карактеризираат процеси кои се потполно идентични на митотичната делба.

Во **профаза-II**, бидејќи хромозомите се двохроматидни и доста кондензирани, за кратко време се образуваат две делбени вретена, за чии нишки се прикачуваат хромозомите со центромерното стеснување.

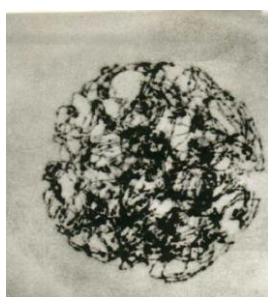
По формирањето на екваторијална плоча во **меџафаза-II**, брзо доаѓа до нивно надолжно делење, прво центромерниот регион, потоа и оддвојување на сестринските хроматиди со што стануваат независни една од друга.

Во **анафаза-II** доаѓа до потполно оддвојување на хроматидите и нивно патување кон спротивните полови. Бидејќи ваквата делба се одвива синхронно во двете јадра, на крајот од **телофаза-II** се добиваат четири хаплоидни јадра. Со цитокинезата се добиваат четири хаплоидни клетки или уште познати како **тетрада**.

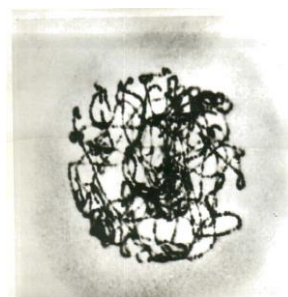
Во текот на мејозата можат да се случат и некои отстапувања, пример: кога во анафаза-I, хомологните хромозоми не се раздвоени и како цели биваленти се движат кон едниот пол. Во овој случај едни од гаметите носат зголемен хромозомски број, а другите гамети се со намален хромозомски број.



1. Лептотен



2. Зиготен



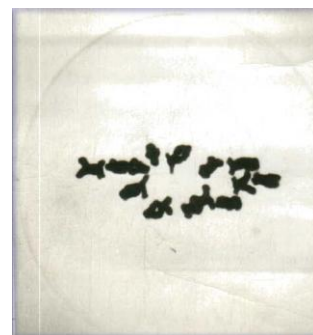
3. Пахитен



4. Диплотен



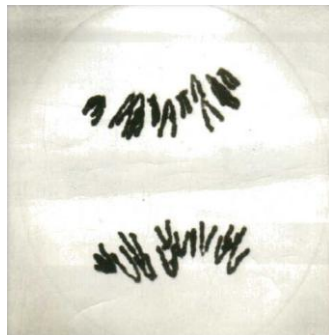
5. Дијакинеза



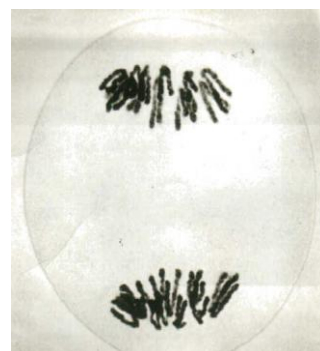
6. Метафаза-I



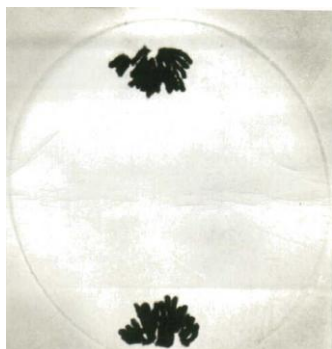
7. Метафаза-I



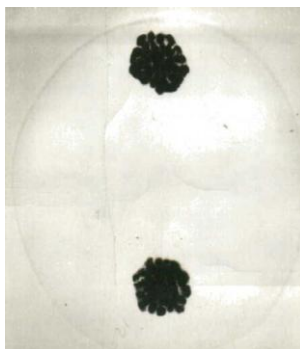
8. Рана анафаза-I



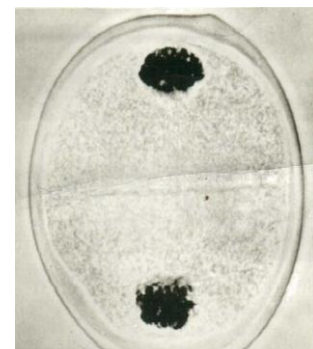
9. Касна анафаза-I



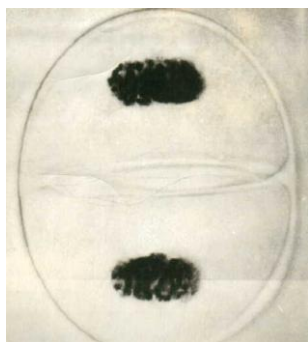
10. Касна анафаза-I



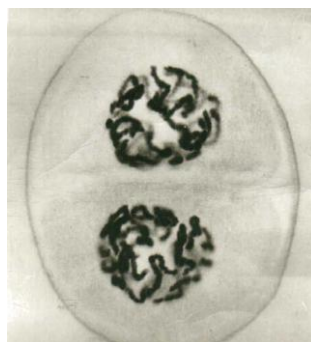
11. Телофаза-I



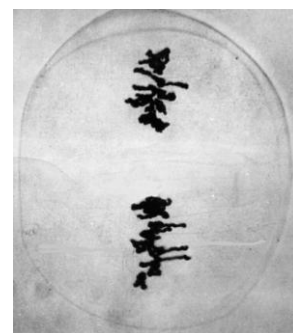
12. Касна телофаза-I



13. Интерфаза



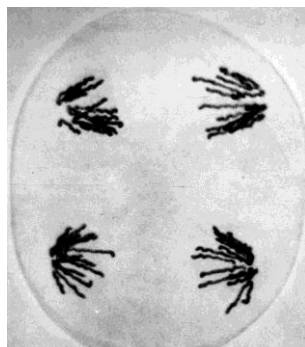
14. Профаза-II



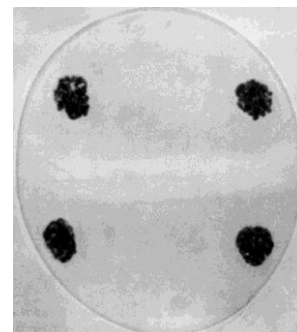
15. Метафаза-II



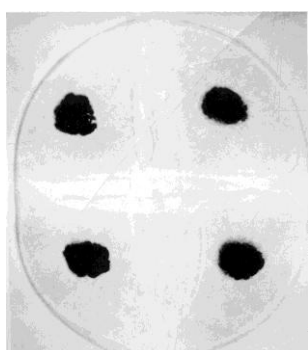
16. Рана анафаза-II



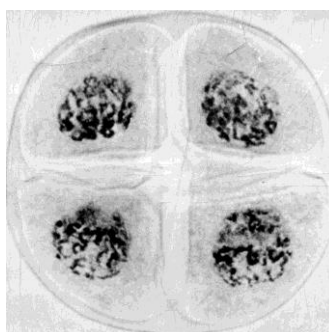
17. Касна анафаза-II



18. Телофаза-II



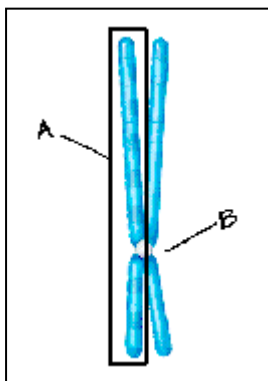
19. Телофаза-II

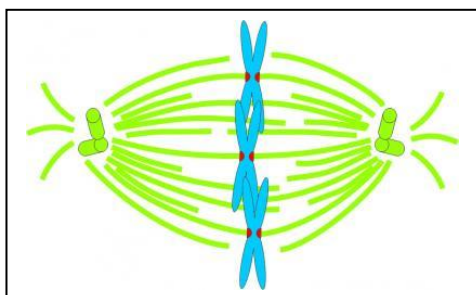


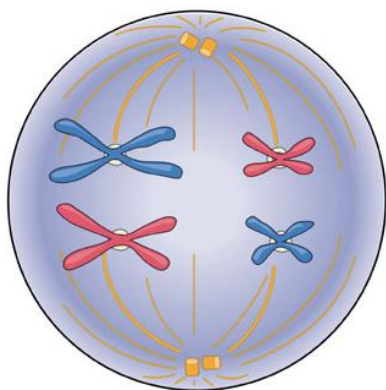
20. Тетрада

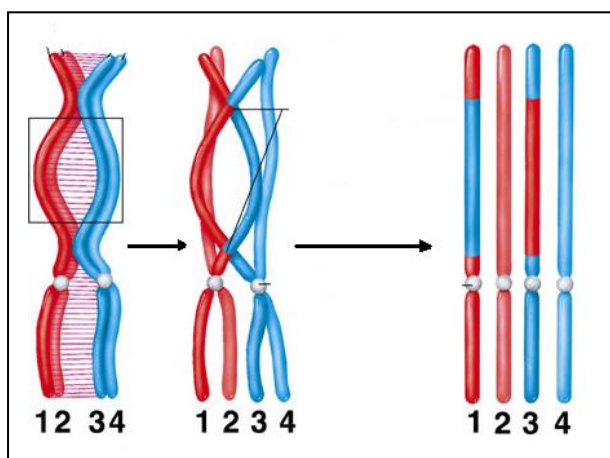
Сл. 5. Фази од мејотската (редукциона) делба

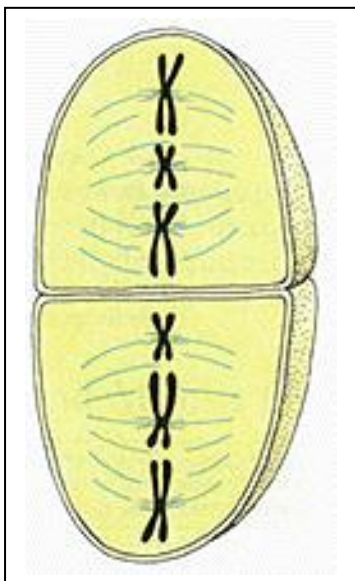
Опишете го соодветниот процес даден на шемата (лево), прецизирајте точно кога се случува и во тек на која кариокинеза!

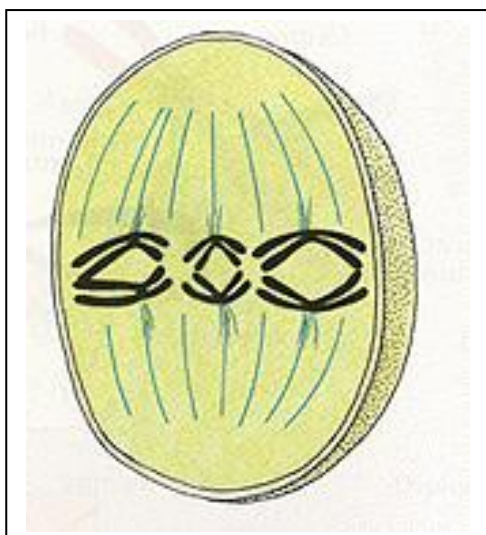












ХРОМОЗОМИ КАЈ ЧОВЕК

Во 1956 година научниците *Tijo u Levan*, анализирајќи ги примарните култури на ткиво од бели дробови на медицински абортирани фетуси, констатирале дека кариотипот на човекот има 46 хромозоми, поради што таа година се смета како почеток на модерната хумана цитогенетика. *Ford u Hamerton* во хуманите сперматоците констатираат присуство на 23 биваленти. Според тоа во јадрото на соматичните клетки кај човекот се наоѓа хромозомски комплемент од 46 хромозоми што е диплоидна гарнитура од 23 пара на хомологни хромозоми, кои го чинат кариотипот на човекот.

Во хуманиот кариотип се разликуваат автозомни хромозоми (автозоми) и полови хромозоми (алозоми или гонозоми), односно 22 пара на автозомни хромозоми кои по градба и генски состав се исти кај двата пола и еден пар на полови хромозоми кој кај женскиот пол се исти, означени како **XX**, додека кај машкиот пол се различни и се означуваат како **XY**.

Класификацијата на хромозомите се врши според нивната големина (најголем е 1, а најмал е 22 хромозом); според местоположба на центромерниот регион (1 пар е метацентричен, а 22 пар се акроцентрични); присуство на сателит (13, 14, 15, 21 и 22 пар имаат сателити) и самата градба на хромозомите според прифатената шема во **Денвер (1960)**.

Хромозомите кај човек поредени во кариограм по својата морфологија според прифатената номенклатура се одбележани од 1 до 22 и групирани се во 7 групи означени како А, В, С, D, E, F и G.

- **А групата** ја сочинуваат три пара (1, 2, 3) најголеми хромозоми, од кои 1 и 3 пар се метацентрични, а 2 пар се субметацентрични. На долгиот крак од 1 пар веднаш по центромерот е присутна секундарна констрикција.

- **В групата** ја сочинуваат 2 пара (4 и 5) на големи субметацентрични хромозоми. На долгиот крак до самиот центромер има секундарна констрикција која ретко може да се забележи.

- **С групата** ја сочинуваат 7 пара автосомни хромозоми (6-12) со средна големина. Хромозомите од 6, 7, 8 и 11 пар се метацентрични додека 9, 10 и 12 пар се субметацентрични. Во оваа група припаѓа и парот (XX) кај женски или (X) кај машки кариотип, кој е метацентричен.

- **Д групата** содржи 3 пара акроцентрични хромозоми (13, 14, 15) со средна големина. Хромозомите од оваа група може да носат сателити кои обично се забележуваат само на 1 или на 2 пара. Сигурна идентификација на поедини парови од оваа група можна е со примена на бендинг техника или ауторадиографија.

- **Е групата** ја сочинуваат 3 пара на мали автосомни хромозоми (16, 17, 18), при што 16 е метацентричен, 17 субметацентричен, а 18 акроцентричен.

- **F групата** содржи 2 пара (19 и 20) мали метацентрични хромозоми.

- **G групата** ја сочинуваат 2 пара најкуси мали акроцентрични автосомни хромозоми (21 и 22), кои со сигурност можат да се разликуваат само со бендинг техники или ауторадиографија. Овие хромозоми имаат сателити кои обично се забележуваат на еден од двата пара, како и секундарно стеснување на кусиот крак.

Во кариотипот на маж Y-хромозомот

припаѓа на оваа група. Y

хромозомот се разликува од 21

и 22 пар по своите споени

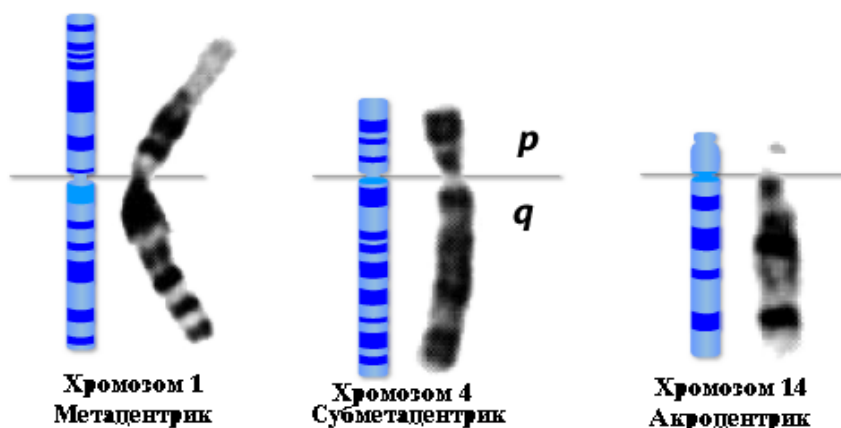
краци не содржи сателит

и секундарното

стеснување се

наоѓа во средината на

долгиот крак.



Сл. 6. Различни типови на хумани хромозоми

Со употреба на специфични методи на боење (бендинг техники) и ауторадиографија, може да се идентификува секој хромозом од наведените групи. Сателити и секундарни стеснувања можат да се најдат понекогаш и на други групи хромозоми, но тоа најчесто претставува

аберација.

МЕТОДИ ВО ХУМАНАТА ЦИТОГЕНЕТИКА

Препарати за набљудување на хромозомите на светлосен микроскоп може да се добијат само од клетки во делба, поради што може да се користат:

1. Клетки во делба од коскената срцевина на градната коска (sternum).
2. Лимфоцити од периферната крв (овие клетки редовно не се делат и затоа прво треба да се добијат во култура).
3. Клетки од сврзно ткиво (од култура).
4. Клетки од базален слој на епидермисот, корен на влакната.
5. Клетки од амнионската течност кај бремени жени (од култура).
6. Туморозни клетки.
7. Клетки од гонади (во делба).

Култура на лимфоцити од периферна крв

Во најширока, рутинска употреба е методот за добивање на препарати од култура на лимфоцити од периферната крв. Лимфоцитите се диференцирани клетки и редовно не се делат, па затоа се применува предтретман кој ќе овозможи да се предизвика делба и добијат доволен број клетки во делба за кариолошка анализа. За таа цел се користи **фитохемаглутинин**, супстанца која се екстрахира од *Phaseolus*, а има силно митогено дејство. При земање на крв од секој пациент од вена и од прст, претходно во шприцот се става 0,2 mL хепарин, кој има цел да ја спречи аглутинацијата на крвта. Растворот на хепарин се подготвува од концентриран хепарин 1 mL и физиолошки раствор 19 mL. Потоа се ставаат по 10 капки во две шишенца со подлога Паркер 199. Подлогата се прави од следниве материјали:

- стерилизирана вода90 mL
- Stock сол10 mL
- NaHCO_3 (2,8 %)4 mL
- органски додаток (DSP)0,01 mL
- фитохемаглутинин (PHA)3 mL
- АБ серум.....33 mL

Сите овие материјали се добиваат готови. АБ серумот треба да биде од најмалку два пациента, а може и од повеќе. Тој треба да биде инактивен и да не содржи никакви конзерванси. Фитохемаглутининот се добива во прашок и пред употреба се раствара во 5 mL редестилирана вода од каде се земаат 3 mL, а останатиот дел се чува во фрижидер. Подлогата засадена со крв стои 72 часа во термостат на 37 °C, а потоа во не се става цитостатик colcemid - 10 капки. Тој се користи за запирање на делбата на клетките на тој начин што го деполимеризира делбеното вретено. Повторно подлогата со крв се става во термостат да стои уште 2- 4 часа. Колцемидот кој вообичаено се чува во фрижидер, прд употребата потребно да се загрее на собна температура или во термостат. За подготовка на колцемидот е потребно:

- стерилизирана вода.....18 mL
- Паркер 199.....2 mL

- NaHCO_3 (2,8 %).....1 mL
- Colcemid во ампула.....0.4 mL.

Материјалот после 2- 4 часа се ресуспендира со пипета. Од шишенцата материјалот се префрла во центрифугални епрувети и се центрифугира 10 минути на 1000 завртувања. Потоа супернатантот се вади со пипета и на добиениот талог му се додава хипотоничен раствор. Се ресуспендира и се остава 25 минути во термостат. Хипотоничниот раствор доведува до прскање на мембраната од јадрото и со тоа се ослободуваат хромозомите. Хипотоничниот раствор се подготвува од следните материјали:

- натриум цитрат (3,8 %).....10 mL
- дестилирана вода.....40 mL (до 50 mL во мензура)

После 25 минути престој во хипотоничен раствор, материјалот се центрифугира 10 минути на 1000 завртувања. Потоа се истура супернатантот, а во талогот се додава фиксатив во однос 3:1. Инаку фиксативот се подготвува од глацијална киселина 10 mL и метил алкохол 30 mL, до 40 mL во мензура. Со фиксативот 3:1, материјалот стои 20 до 30 минути на собна температура, а може и подолго. Потоа, повторно се центрифугира, супернатантот се отфрла, а на талогот се додава фиксатив за работа 2:1, 4-5 капки. Се ресуспендира и се прави размаз на предметно стакло. Фиксатив за работа 2:1 се подготвува од:

- фиксатив 3:1.....6 mL
- глацијална киселина 60%3 mL

Размазот се подготвува на тој начин што со пипета се зема малку од материјалот и се става на предметно стакло, се разнесува по целата површина и се суши на собна температура. Предметните стакленца претходно се ставаат во фрижидер. Вака подготвеното предметно стакло се става на инвертен микроскоп или на микроскоп со фазен контраст, се микроскопира и при тоа се набљудуваат метафазите. Во колку хромозомите не се добро распоредени, во супстратот се додава глацијална киселина 1-5 капки и тоа постепено додека не се добијат добро распоредени хромозоми. Наместо хипотонија со натриум цитрат може да се работи и со хипотонија од калиум хлорид- 0,0075 M.

Потоа се пристапува кон боење на препаратите. Постојат две методи на боење:

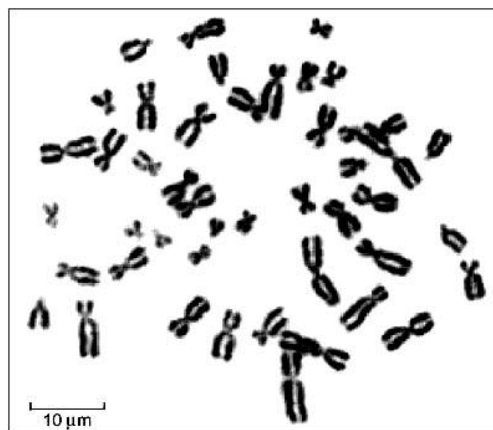
1. Брза метода во која бојата е составена од:

- фосфатен пуфер.....6 mL
- гимза..... 6 mL
- дестилирана вода до 150 mL. Времетраењето на боење е 10 минути.

2. Метода во која бојата е составена од:

- гимза.....10 mL
- дестилирана вода до 100 mL.

Со вака подготвената боја препаратите се бојат 45 минути, потоа, препаратите се испираат со дестилирана вода, се сушат на собна температура, се обележуваат и потоа секој препарат се анализира под микроскоп. За секој пациент се прегледуваат најмалку 16 метафази, но во некои случаи се анализираат и до 100 клетки во метафаза. Најдобрата метафаза се



слика, и од него се прават слики. Од добиените фотографии, со сечење на хромозомите и со нивно спарување на групи се прави кариограм. Денес, веќе постои компјутерска обработка со што анализата е во голема мера олеснета.

Боење на хромозоми

За идентификација на хромозомите се користат повеќе методи на боење:

G (GIEMSE) техника на боење

Метода за диференцијално боење по Seabright (1972) или G-техника

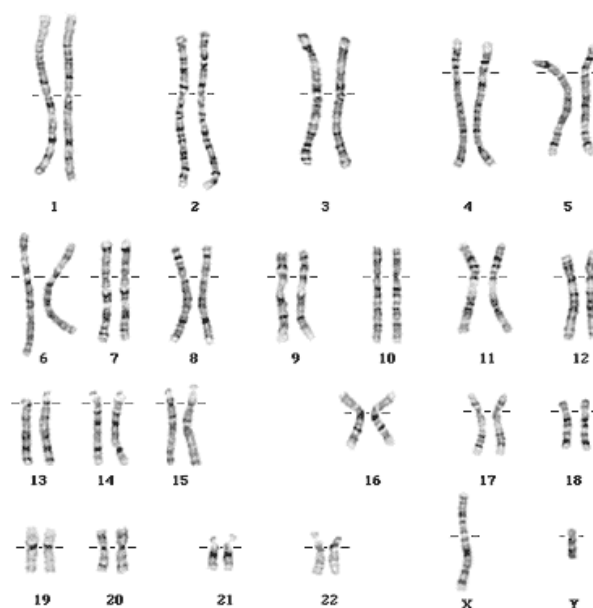
Како резултат на боењето со оваа метода се добиваат темни и светли ленти по должината на хромозомите, при што, темните ленти претставуваат конструктивни

хетерохроматински региони распоредени по краците на хромозомите, а светлите ленти го претставуваат еухроматичниот регион.

Техниката на бендови е основна за идентификација на секој хромозомски пар. Распоредот на светли и темни ленти е карактеристичен за секој вид. Самиот метод на боење се одвива на следниот начин: после обработка на материјалот на претходно опишаниот начин, истиот се чува во фрижидер на $+4^{\circ}$ со четири дена. По четвртиот

ден се врши протеолитичка дигестија со 0,25% трипсин и тоа во временски период од 15 до 45 секунди, односно прво се подготвува раствор кој содржи 5 mL GKN + 45 mL H_2O + 50 mL трипсин. Подготвениот материјал се става во кивети, во кои претходно е ставен растворот, во него стојат 21 секунда, а потоа се излева. Во киветите се става 6,8 пуфер и стојат заедно 1-2 минути. Повторно се излева пуферот. Од тука материјалот се префрла во кивета во која има Giemza со пуфер. Боењето трае 14 минути, после што се промиваат материјалите со млаз од вода. При оваа метода се користи 0,25 % трипсин. Потоа се филтрира низ филтер во стерилни шишиња. За подготовка на бојата Giemza се зема 45 mL 6,8 пуфер и 1,5 mL Giemza (3 mL Giemza до 100 mL пуфер 6,8).

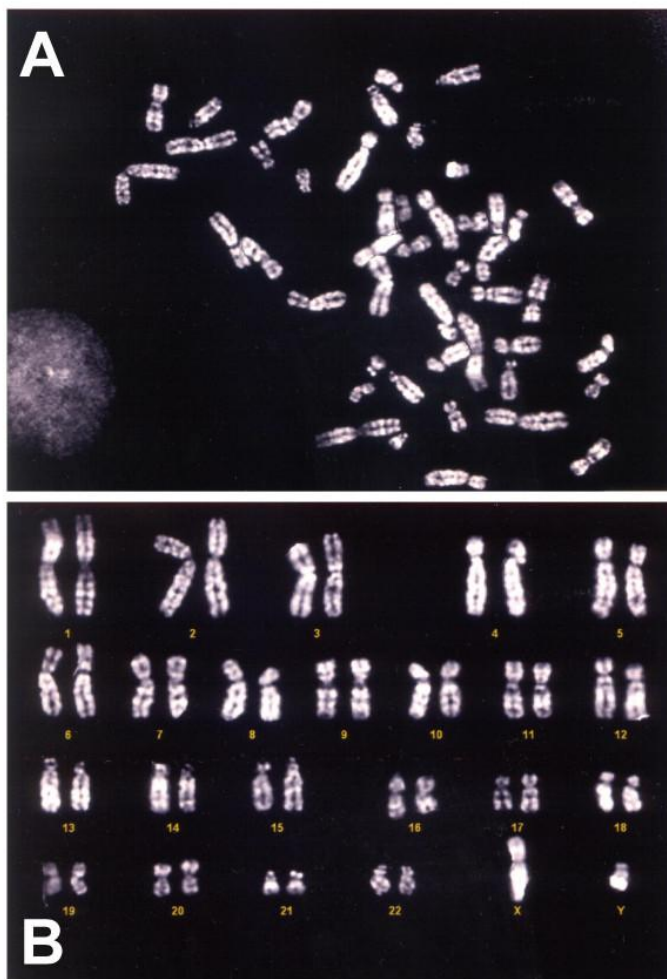
R (Реверзна) техника- дава спротивни ефекти во споредба со техниката на G- траките и се користи за испитување на терминалните региони на хромозомите. Со оваа техника се истакнуваат теломерните региони кои



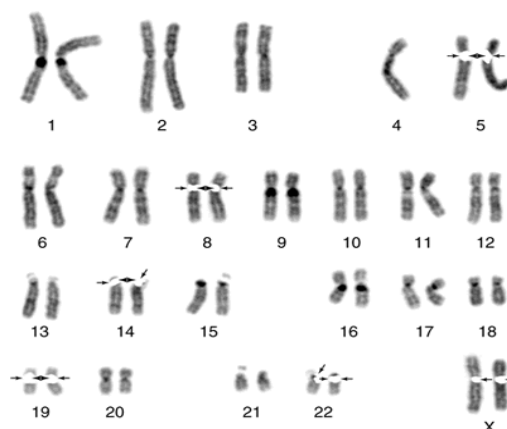
Хуман кариограм-
диференцијално боење со G-траки

често се зафатени со помали структурни промени (транслокации, инверзии, посебно перичентричните).

Q (Quinakrin) техника: Во 1970 година било успеано да се прикаже хетерогеноста на хромозомската структура, односно постоењето на трансверзални ленти (т.н. Q ленти), по обработката на препаратите со деривати на квинакрин или атебрин, набљудувани на ултравиолетова светлина со флуоресцентен микроскоп. Со оваа техника, дисталните краеве на хромозомите не се бојат. Y хромозомот флуоресцира најсилно на дисталниот дел од долгиот крак во вид на светли точки не само во метафазните туку и во интерфазните јадра. Затоа оваа техника се користи за идентификација на полот во целуларниот материјал.



C-(Центромерно хетерохроматска) техника на боење-го прикажува ефективното боење на центромерот и на секундарната констрикција (C - бенд), а посебно е значајна при идентификација на перичентричните инверзии и при проучување на полиморфизмот на хромозомите.

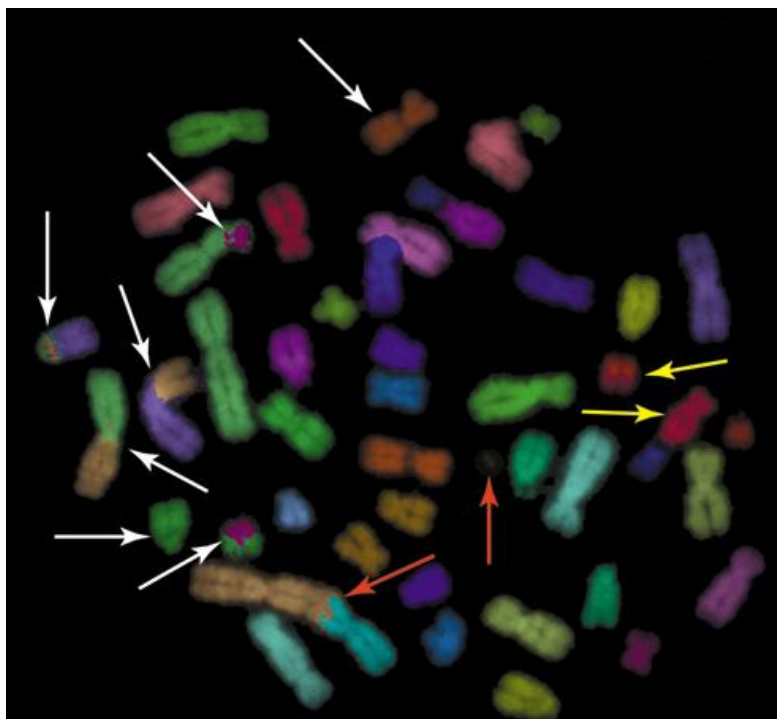
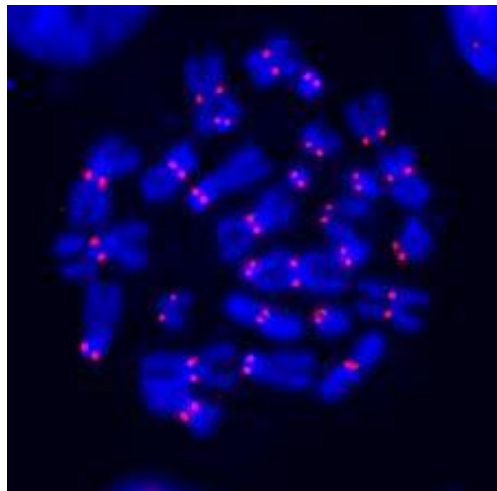


Флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH)

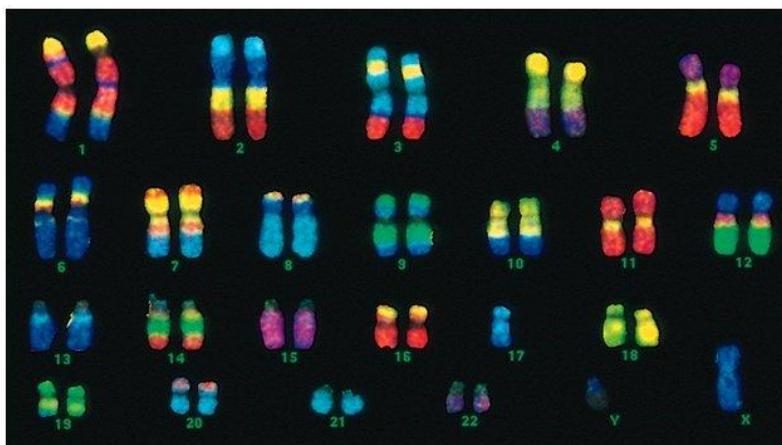
Овој дијагностички метод претставува комбинација на современите молекуларни со конвенционалните цитогенетски методи за анализирање

на хромозомите, а се базира на комплементарноста на DNA молекулата, односно на способноста на едноверижната молекула на DNA да коњугира со своите комплементарни секвенци кои се модифицирани, што по хибридизацијата овозможува визуелизација на регионот под ултравиолетово осветлување. DNA сондите можат да бидат:

- **центромерни-** составени од репетативни секвенци кои можат да се најдат и во центромерот, а се користат за брза пренатална детекција на анеуплоидии (трисомии на 13, 18 и 21). Предноста на овој метод е и во тоа што може да се искористат интерфазни клетки, кои не се во делба.
- **единствени секвенци-** кои се специфични за хромозомот, за одреден локус или служат за идентификација на субмикроскопски мали делеции и дупликации.
- **сонди за боја-** се состои од коктел на различни сонди за различни делови на хромозомот кој флуоресцира. Се употребува за детекција на суптилни транслокации или за утврдување на потеклото на вишок хромозомски материјал (забележливи парцијални трисомии и др.).
- **повеќеслојно спектрално кариотипизирање-** користи група на сонди за цели хромозоми при што се добива разнобоен, шарен кариотип (сл. 7), каде секој пар се идентифицира со посебна боја. На овој начин успешно се идентифицираат сите структурни промени.



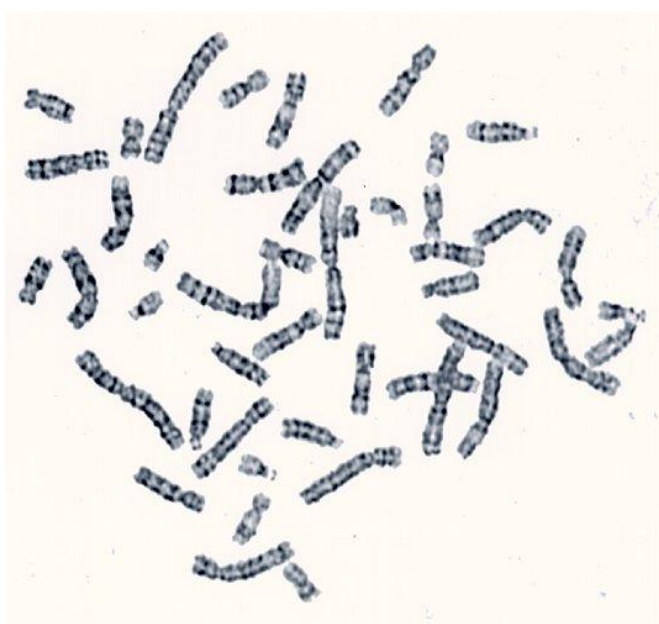
Сл.7. Повеќеслојно спектрално кариотипизирање со кое се добива шарен кариотип погоден за откривање на транслокации



Сл. 8. Хромозомите се обоени со различни флуоресцентни сонди кои карактеристично ги бојат хромозомите со што се овозможува нивна полесна идентификација и детекција на нумерички хромозомски аберации

КАРИОТИП, КАРИОГРАМ И ИДИОГРАМ

Кај единките на исти вид, сите клетки во организмот во јадрото содржат одреден број на хромозоми, кои меѓусебно се разликуваат по својата форма и големина но се карактеристични за дадениот вид. Delone (1922) го предлага терминот **кариотип** со цел да ги прецизира спецификите на јадрото во клетките на еден организам односно да го потенцира значењето на појавата дека секој организам има специфични јадра во своите клетки. **Levitski** (1924) со терминот **кариотип** го опфаќа вкупниот број (збирот) на сите метафазни хромозоми во јадрото на една клетка. **Збирот на хромозомите кои по својот број и морфологија се карактеристични за соматските клетки на организмите од тој вид се означува како кариотип на дадениот вид.** **Battaglia** (1952) дава дополнување на дефиницијата за кариотипот поради разликите на хромозомите во половите и соматските клетки па според него кариотип претставува збир на сите хромозоми во



една клетка на организмот, односно хромозомите во диплоидниот број кои се разликуваат по својата морфологија.

За полесно идентификување на хомологните хромозоми во кариотипот се прави **кариограм**. Според **авашин** (1922) кариограмот претставува систематско поредување на хромозомите од дадениот организам по хомологни парови. За целта се користат специфични нумерички бар кариотип каде се користат

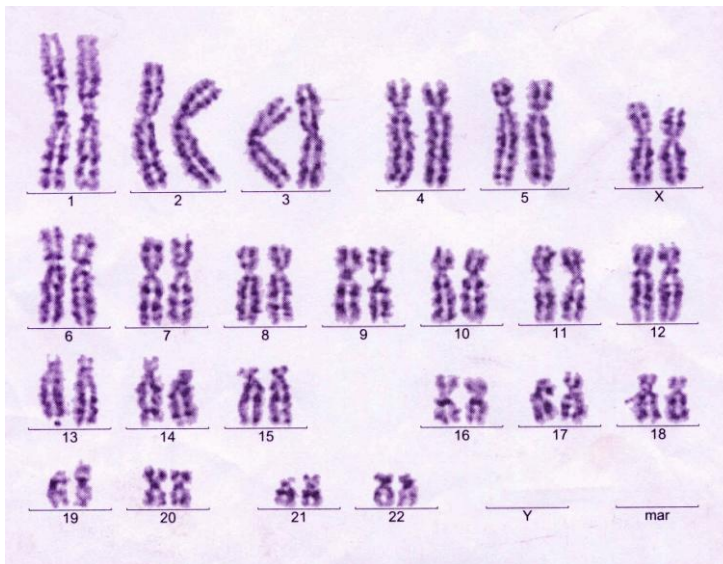
Сл. 9. Хуман кариотип

не се преклопуваат внимателно се сечат и се поредуваат во хомологни парови по големината и сличноста во соодветен низ.

Кога шематски се претставуваат хромозомите со цел што појасно да се прикажат морфометриските карактеристики на хромозомите зборуваме за **идиограм**. Всушност за конструирање на идиограмот се користат сите морфолошки одлики

на хромозомите како што се: вкупната должина на двата крака, должина на голем и краток крак на хромозомот, односот помеѓу големината на двата крака и место положбата на констрикциите посебно на примарната.

Мерењата се прават на микроскоп со окуларна скала а потоа се врши пресметување на реалните вредности за должина на хромозомите кои се прикажуваат и табеларно заедно со другите параметри, пример:



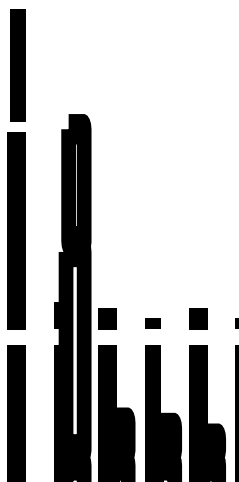
Сл. 10. Хуман кариограм

Основни морфометрски карактеристики на хромозомската гарнитура од *Vicia faba* L.

Број на хром	Вкупна должина (μm)		Голем крак L (μm)		Краток крак S (μm)		Однос на краци	Центро. индекс i	Процент (%)	Релат. долж. R _d	Хром тип
1	25,22	0,27±	13,42	0,15±	7,55	0,60±	1,78	29,24	30,62	100	sm
sat					4,25	0,55±					
2	12,47	0,15±	10,97	0,11±	1,50	0,35±	7,31	12,03	15,14	49,44	t
3	11,47	0,15±	10,40	0,65±	1,35	0,35±	7,70	11,49	14,27	46,59	t
4	11,45	0,12±	10,52	0,11±	0,92	0,07±	11,43	8,03	13,90	45,40	t
5	11,12	0,12±	9,85	0,80±	1,25	0,40±	7,88	11,24	13,50	44,09	t
6	10,35	0,90±	9,47	0,67±	0,87	0,22±	10,88	8,40	12,57	41,04	t

$$n = \sum c = 82,36 \quad 2n = 164,72 \quad i_{AC} = 78,47$$

Со идиограм всушност појасно можат да се истакнат карактеристиките и разликите помеѓу поедини хромозоми.



Сл. 11. Идиограм на *V. faba* L.

Кариотипот е извор на информации за основните карактеристики на хромозомите односно за одредување на хромозомскиот број односно степенот на пloidноста а може да се користи и за детерминација на одредени отстапувања т.е. хромозомски аберации. Графичкото претставување на хромозомите во идиограм, служи за детерминирање и идентификување на хомологните хромозоми и нивните структурни аберации, а тоа пак во голема мера се користи за студии со компаративни анализи на кариотипот кај видовите во даден род или фамилија. (пр. Со детална морфометриска анализа констатирано е дека хромозомската гарнитура на *V. faba* L., ја сочинуваат 6 пара хромозоми од кои I пар е субметацентричен и поседува сателит на пократкиот крак (Сл. 11 и 12). Овој хромозомски пар е со најголема морфолошка вредност, тој зазема околу 30,62% од вкупната должина на хромозомите во кариотипот (Таб. 2). Останатите 5 хромозомски парови (II, III, IV, V и VI) се акроцентрици, односно телоцентрични (*sensu amplo*), според класификацијата на Levan и сор., (1964) со јасно видливи, иако мали по димензии, кратки краци (Димеска и сор., 1998).

Кариолошка формула

Се изработува од податоците за кариотипот на видот добиени при морфометриската анализа. По точното определување на хромозомскиот тип се испишуваат хромозомите во формула по следниот редослед:

$$\mathbf{M + m + sm + st + sa + a + t + T + sat}$$

При тоа се запишува со бројка колку такви хромозомски типови содржи видот кој се анализира, па следи типот на хромозомот според некоја од класификациите. Редоследот на хромозомите не се совпаѓа со нивниот редослед во кариограмот и идиограмот на истиот вид. Во кариограмот и идиограмот, прв хромозом е тој што е најдолг (со најголема морфолошка вредност) независно од типот, односно од положбата на центромерот, а најмалиот хромозомски пар е на последната позиција. Пр:Кариолошката формула која произлегува од морфометриската анализа на *V. faba* L. е: 5t +

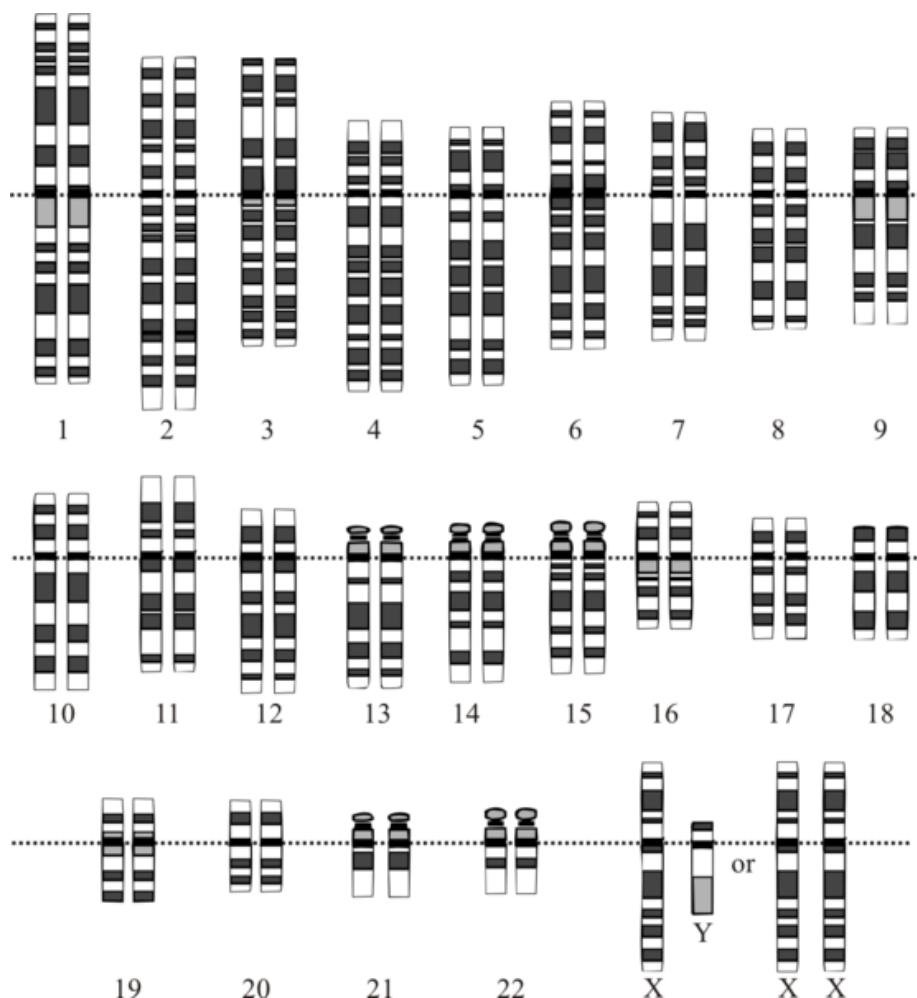
1 Sm-sat (според класификацијата на Levan и сор., 1964) односно 5A + 1Sm-sat (според класификацијата на Агапова и Гриф, 1982).

Морфометриската анализа (одредување на бројот и морфологијата) на хромозомите претставува еден од методите за утврдување на нормалната генетска конституција (генотипот), а се користи во биологијата, медицината, земјоделието и ветерината.

Познавањето на хромозомите со своите карактеристични морфо-функционални диференцијации, во голема мера зависи од методата на бојење и препарирање. Така главните морфолошки диференцијации на хромозомите воглавно се идентификуваат со стандардни методи на бојење со: фолген, оцетен кармин, оцетен орцеин и др.



Сл. 12. Кариотип (горе) и кариограм (долу) *V. faba* L., (бојење со базичен фуксин – фолген)

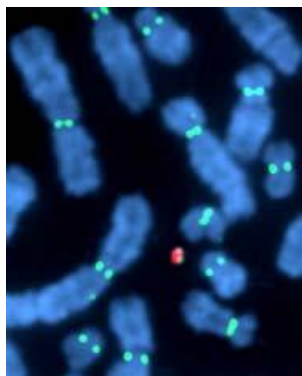
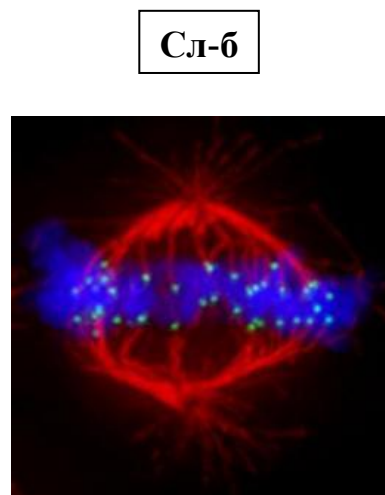
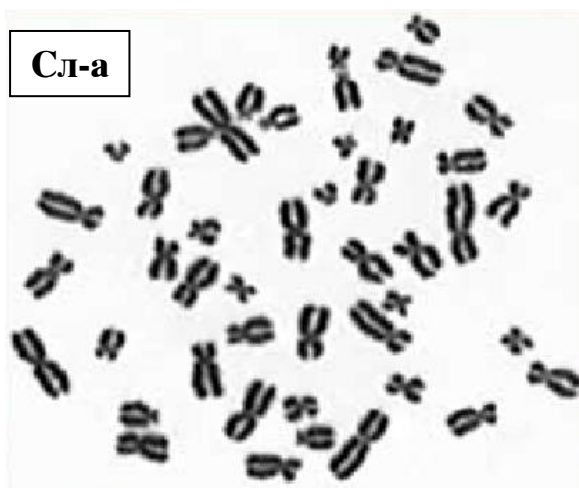


Сл. 13. Идиограм-шематски прикажан хуман кариотип со распоред на бендови

Меѓутоа, примената на современите бендинг техники на диференцијално боење, а посебно боењето на хетерохроматинските региони со Giemza, овозможуваат прецизна идентификација на хомологните хромозомски парови, со што се овозможува и идентификација и проучување филогенијата на поедини геноми.

Прашања:

- Означи што е претставено на сл-а
- На кое зголемување на светлосен микроскоп може да се набљудуваат хромозомите на човек со цел да се определи нивниот број и морфологија
- Колку хромозоми има во соматски клетки
- Какви се по боја хромозомите обоени со стандардна техника
- Како се бојат хромозомите со FISH
- Какво е обојувањето на сл б и в и што е претставено



МЕХАНИЗМИ НА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ПОЛОТ

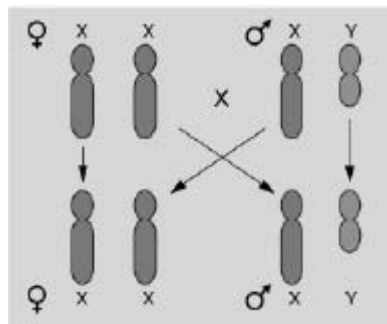
Полот на организмот обично е утврден со низа на комплексни настани за време на ембрионалниот развој кој се одвива под контрола на различните гени и хормони. Но, насоката во која ќе се одвива развојот кон едниот или другиот пол (машки или женски), обично се одредува од страна на еден или многу мал број на гени. Тие гени (switch genes) се наоѓаат на половите хромозоми, и тоа кај оние видови кај кои полот се утврдува врз основа на полови хромозоми. Се разбира, полот не мора да се утврдува само со полови хромозоми, но може да зависи од степенот на плоидноста, генетска рамнотежа, автозомни алели и еколошки фактори, како што е температурата.

Одредување на пол, врз основа на полови хромозоми

Половите хромозоми сами по себе не го одредуваат полот, туку гените кои тие ги носат. Општо земено, генотипот на еден организам го одредува видот на гонади кои произведуваат полови хормони важни за секундарните полови карактеристики на идната единка.

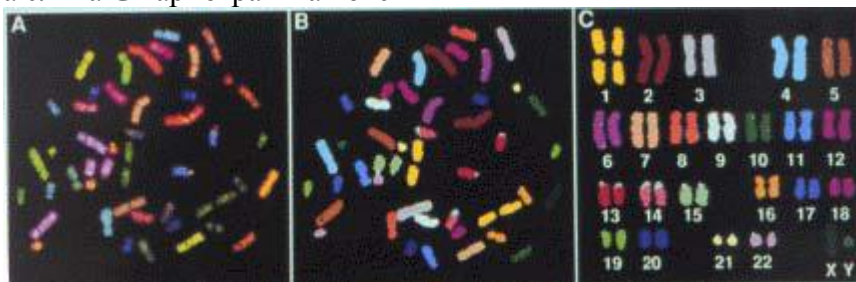
1. XX / XY тип на определување на пол

Овој вид на определба е типична за повеќето цицачи и некои инсекти (двокрилци). Женките се хомогаметни (XX) и машките се хетерогаметни (XY).



ЗАДАЧИ:

1. Сликите А и Б покажуваат кариотип на човек, а слика С кариограм на човек



- Зошто на сликите А и Б се илустрирани два кариотипа?
- Колку хромозоми се наоѓаат во соматските клетки на женските или машките?
- Колку хромозоми се наоѓаат во гаметите кај двата пола?
- Колку типови на гамети создаваат машките, а колку женските?
- Колкав е теоретски половиот сооднос во секоја генерација?

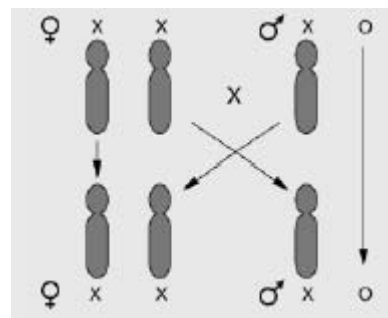
2. Домашното глувче има 40 хромозоми во соматските клетки.

- Колку хромозоми аследило глувчето од својот машки родител?
- Колку автозоми се наоѓаат во машките гамети на глувчето?

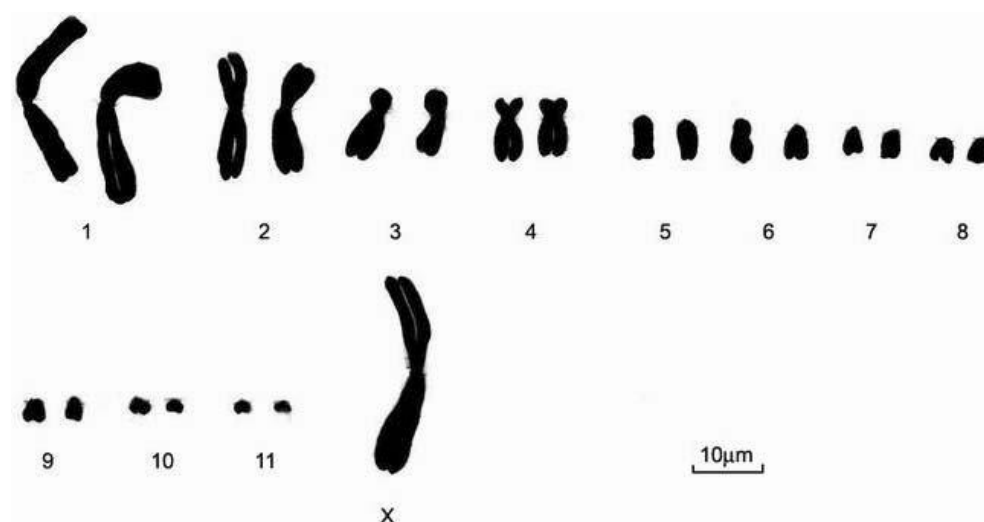
- в) Колку полови хромозоми се наоѓаат кај женските гамети?
г) Колку автозоми се наоѓаат во соматските клетки на женско глувче?

2.XX/X0 тип на определување на пол

Овој тип на одредување на полот е еволутивен дериват од типот XY, и се наоѓа кај некои видови на цицачи и некои инсекти: скакулци и бумбари. Женките се **хомогаметни** (XX), додека мажјаците (X0) **хетерогаметни**.



ЗАДАЧА:4 Сликата го прикажува кариотипот на инсект- *Bradyporus macrogaster macrogaster* (Orthoptera: Tettigonioidea, Bradyporini)

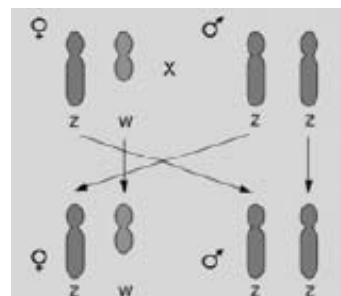


- а) Кој е полот на оваа единка?
б) Какви гамети произведуваат женките, а какви мажјаците?

3.ZW / ZZ тип на определување на пол

Половите хромозоми се назначени со Z и W со цел да се истакне разликата во односот XX / XY вид на определба, затоа што во овој случај **хетерогаметни** се женските (ZW) а машките **хомогаметни** (ZZ).

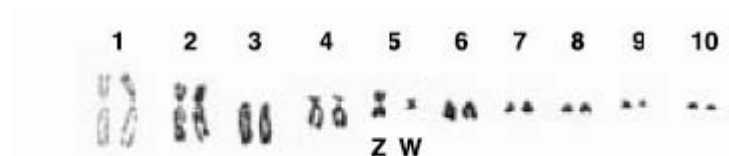
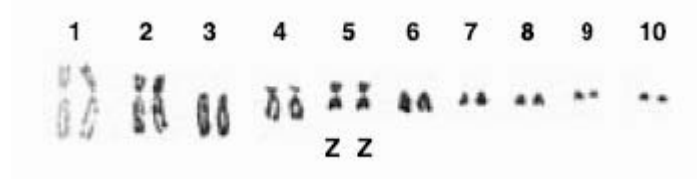
Овој вид на определба се наоѓа кај пеперутки, молци, некои риби и птици.



ЗАДАЧА:

5.Сликата покажува хромозоми на некои видови на птици.

а) Која единка е од женски а која од машки пол? б) Колку автозоми се наоѓаат во нивните гамети, односно соматски клетки?



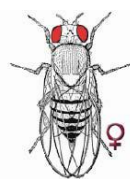
Одредување на пол, врз основа на генетската рамнотежа

Овој тип на определба е карактеристична за *Drosophila*. Иако постојат X и Y хромозоми за полово определување важни се само автозомите и хромозомот X. Хромозомот Y е важен за плодноста на машките форми на *Drosophila* (мобилноста и функционалноста на спермата), но никогаш не се вклучени во половото определување. Полот е определен со односот на бројот на X хромозомите, и бројот на хаплоидните автозоми.

Односот X / пол

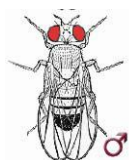
- 1 женски
- 0,5 машки
- > 1 суперженка *
- < 0,5 супермажјак *
- 0,5 до 1 меѓупол

* организми со слаба виталност, најмногу умираат во стадиум на кукла



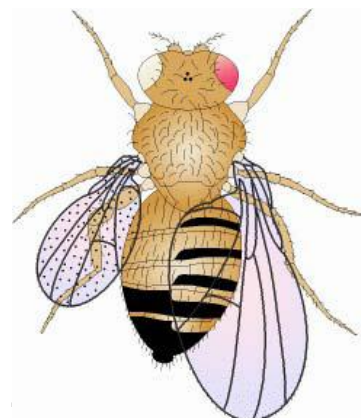
XX
XXY
XXYY

$$\frac{X}{\text{Autosome}} = 1$$



XO (sterile)
XY
XYY

$$\frac{X}{\text{Autosome}} = \frac{1}{2}$$



Идејата за полово определување кај *Drosophila* **гинандроморфизам**. Тоа е вид на мозаицизам: еден дел од телото покажува карактеристики на женски пол (клетки со два X хромозоми), а другиот дел карактеристики на машкиот пол (еден X хромозом).

Објасни го механизмот на **гинандроморфи**. На сликата нагласи карактеристични обележја на машко или женско! Каков вид на гинандроморфизам е? Кои генотипови се левата и десната страна на примероците поради бојата на очите (алел за бела боја на очите се наоѓа на хромозомот X).

Одредување на полот врз основа на степенот на плоидност

Женките пчели, матицата и пчелите работнички се секогаш диплоидни ($2n = 2x = 32$). Матицата може да изнесе диплоидни јајца или неоплодени хаплоидни јајца. Всушност, таа може да релаксира или контрахира сфинктер, мал кружен мускул, кој или овозможува или спречува на спермата да влезе или да помине, и на тој начин го контролира оплодувањето. Од оплодените јајца ќе се развијат женки кои, во зависност од начинот на исхрана, ќе извршуваат работа на матица или работничка. Од неоплодените јајца ќе се развијат машки односно трутови.



Одговорете на следниве прашања: 1. Какви се трутовите, со оглед на степенот на плоидноста?
2. Со кој процес настануваат гамети, во трутовите и зошто?

ПОЛОВО-ВРЗАНО НАСЛЕДУВАЊЕ

Полово врзани гени се оние гени кои се наоѓаат на хромозомот X или аналогниот хромозом Z. Кај повеќето организми Y хромозомот носи многу малку или воопшто нема активни гени, затоа кога велиме полово поврзани гени примарно се однесува на гени кои се наоѓаат на хромозомот X. Гените на Y хромозомот се наречени холандрични, бидејќи тие се среќаваат само кај машките единки.

За машките XY или XO тип се вели дека се **хемизиготни** бидејќи тие имаат само еден алел за полово поврзани својства.

Кај диплоидни организми со XY и XO тип на пол, својството е определено со полово-врска

а) **рецесивниот** ген се изразува на следниот начин:
- почесто се изразува кај машките отколку кај женските
- ретко се јавува кај машки родители и машки деца, освен ако женскиот родител е хетерозигот

- не се појавува кај жените, освен ако тој не се појавил во генерација на неговите родители и генерација пред

б) **доминантниот** ген се изразува на следниот начин:

- почесто се изразува кај жените отколку кај мажите

- се јавува кај женски деца, доколку истата особина ја имал машкиот родител

- не се пренесува од мајка на машко потомство доколку мајката не е носител

Наследување на бели очи кај *Drosophila*

Бојата на очите кај *Drosophila* е одредена од генот кој се наоѓа на хромозомот X. Црвената боја на очите е доминантна во однос на белата. Бидејќи женките имаат два X хромозоми, тие можат да бидат хомозиготни или хетерозиготни,

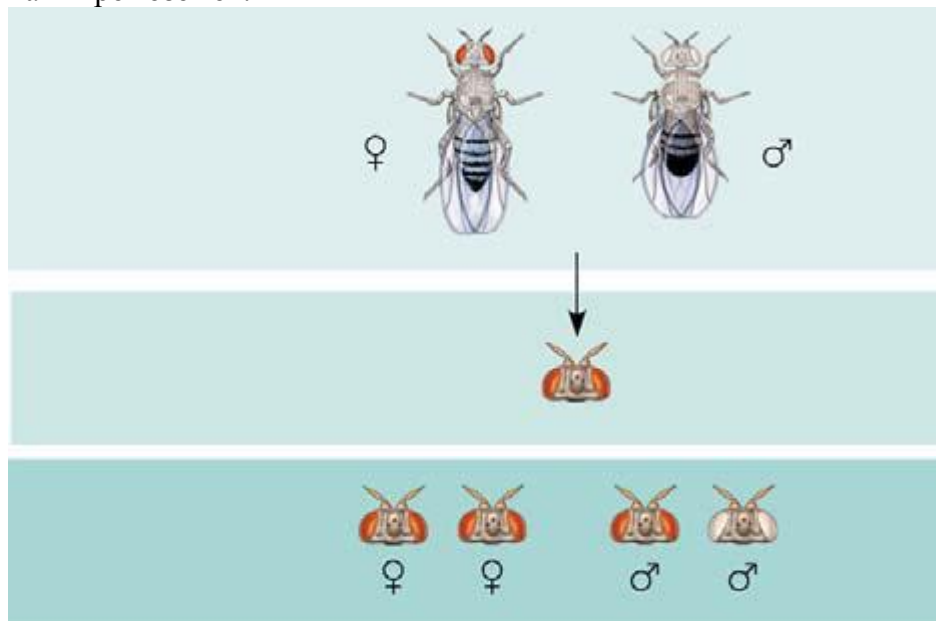
додека мажите можат да бидат само хемизиготни односно бојата на очите зависи од X хромозомот, кои го наследиле од мајката.

Наследување на бојата на пердувите кај кокошките

Шарените пердуви кај кокошките се утврдени со полово врзаниот доминантен алел B, а рецесивниот алел b определува еднобојни пердуви.

ЗАДАЧИ:

1) Дополни го следното вкрстување и објасни на кој начин тоа вкрстување го поттикнало Морган да заклучи дека генот за бојата на очите се наоѓа на X, а не на Y хромозомот!



2) Ако женката е хетерозигот за некое полово врзано својство и ако се земе предвид случајно активирање на еден од X хромозомите, каква ќе биде експресијата на алелите во соматските клетки за тоа полово врзано својство?

3) Замислете дека имате две чисти линии на канаринци, едната линија има жолти пердуви, а другата кафеави. При вкрстувањето на овие две линии, женски жолти и кафени машки имале само кафено потомство, додека пак обратно: кафени женски и жолти машки добиле кафени само машки деца, и жолти женски подмладок. Предложете хипотеза која ги објаснува овие резултати? Напиши го вкрстувањето?

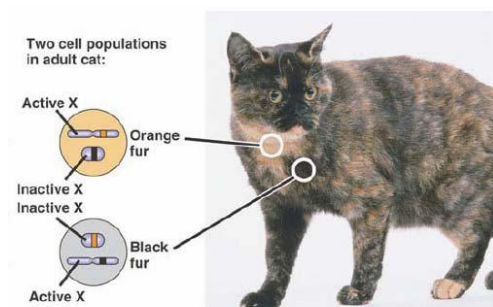
4) Вкрстени се женка *Drosophila* која има бели очи со мажјак див фенотип.

а) какво потомство очекувате во F1 генерација во однос на бојата на очите?

б) Кој пол се потомците, кои ја наследиле бојата на очите од машкиот родител, а кој пол потомците кои ја наследиле бојата на очите од женскиот родител?

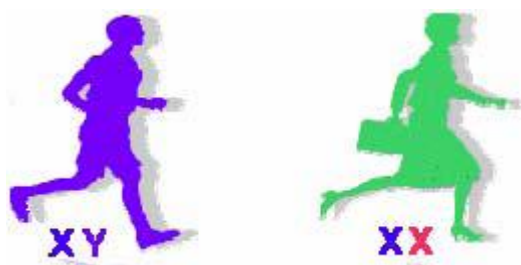
в) Објаснете го примерот на оваа задача, по принципот на вкрстено-наследување?

5) Кај маичките "Calico" крзното е определено од алелот кој се наоѓа на X хромозомот, и автозомниот алел. Полово врзаниот ген е одговорен за црната и портокаловата боја на крзното, а белата боја зависи од локусот на автозомниот алел.

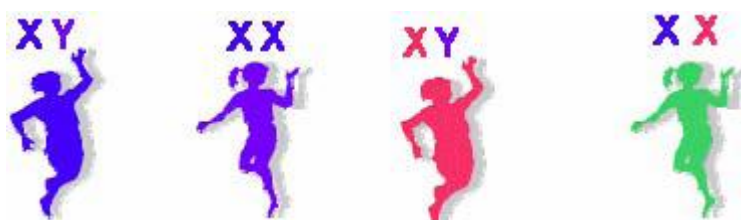




- а) Каква може да биде бојата на крзното кај женка а каква кај мажјак?
б) На кој начин експресијата на алелите влијае на бојата на крзното?
- в) Бојата на крзното кај коприварка, комбинација од портокалова и црна боја исклучиво зависи од полово врзаниот ген на X хромозомот од што зависи големината на крзното на едната или другата боја?
- 7) Какво потомство очекувате кај родителите кои се со фенотипски нормален вид, а мајката е воедно носител на генот за далтонизам.



Кај човекот далтонизмот, хемофилијата и јувенилната мускулна дистрофија се најчестите примери на полово поврзани рецесивни заболувања.



- 8)Момче далтонист има родители со нормален вид.
а) напишете го генотипот на момчето! б) Ако братот на момчето со нормален вид се ожени со една девојка која е хетерозигот за ова својство, кои се можните генотипови и фенотипови на нивните деца?
- 9) Жена со дефект на забната глеѓ (доминантно полово-врзано својство) има татко далтонист со здрави заби и мајка со нормален вид, но со недостаток на забната глеѓ, се венча со нејзиниот братучед кој е далтонист со нормална забна глеѓ. Која е веројатноста дека нивното дете ќе биде далтонист со нормална забна глеѓ?
- 10) Портокаловата и црната боја кај мачки е X-врзана особина. Шарена црно-портокалова мачка се спарила со портокалов мажјак. Прикажи го вкрстувањето. Какво потомство очекувате во однос на полот и бојата на кожата?
- 11) Мускулна дистрофија (MD) е болест кај луѓето предизвикана од редок X-рецесивен алел. Таа предизвикува прогресивно губење на мускулите и смрт пред 20-та година на живот.
а) Која е веројатноста да првиот син на жена чиј брат имал MD, исто така, да заболи од мускулна дистрофија?
б) Која е веројатноста да вториот син на жената чиј брат имал MD, заболи од MD ако првиот син, исто така, има MD?
в) Која е веројатноста да здраво дете чиј татко има брат со MD, оболи од MD?
- 12) Шарените пердуви кај кокошките се утврдени со полово врзаниот

доминантен алел В, а рецесивниот алел в определува еднобојни пердуви. Каков вид на пилиња да се очекува при вкрстување на еднобојна кокошка и шарен петел чиј женски родител бил еднобоен?

13) Да претпоставиме дека бојата на пердувите кај папагалите е полово-врзано својство и дека зелените пердуви се (П) доминантни над сините (п). Какво потомство очекувате по вкрстување на зелена женка и син мажјак?

НАСЛЕДУВАЊЕ ПОВРЗАНО СО ПОЛОТ (задачи за анализа)

1. Гените за хемофилија кај луѓето се полово врзани и се наоѓаат на Х-хромозомот. Луѓето кои боледуваат од хемофилија имаат недостаток на антихемофилен глобулин А кој овозможува активност на други фактори на коагулација на крвта. Од хемофилија боледуваат мажите, а жените се само пренесувачи и во ретки случаи може да бидат болни од хемофилија. Да се претстават неколку можни комбинации на различни родители и фенотипскиот однос за здрави и болни единки во потомството.

2. Далтонизмот исто така е поврзан за Х-хромозомот. Кај машките единки се изразува во хемизиготна состојба, а кај жените само во хомозиготна состојба. Во еден брак мажот е далтонист и поседува способност за коагулација на крвта, а жената нормално ги разликува боите и е хетерозиготна за хемофилија. Тие имаат ќерка, со нормален фенотип и хетерозиготна за хемофилија. Која се омажила за нормален маж. Да се одреди какво ќе биде потомството од овој брак при нормална оогенеза и доколку во тек на профаза I дошло до crossing over на споменатите гени.

3. Таткото е хемофиличар, мајката има нормален фенотип, а ќерката со 45,ХО генетска конституција, со нормална способност за коагулација на крв. Кај кој од родителите дошло до нераздвојување на хромозомите и во која фаза од делбата клетките.

4. Нормални родители добиле син хемофиличар и ќерка со трисомија на Х хромозомот со способност за коагулација на крвта, но носител на ген за хемофилија. Да се определат генетските конституции на родителите и да се даде објаснување кога и кај кој родител настанало нераздвојувањето на хромозомите.

5. Кај маж со Клинефелтеров синдром е констатирано слепило за бои. Двајцата негови родители имаат нормален вид. Да се даде соодветно генетско објаснување и притоа да се потенцира, кога и кај кој родител дошло до нераздвојување на хромозомите.

6. Елена и Стефан имаат татко со изразен сноп влакна на надворешната школка на ушите, појава позната како хипертрихоза во хуманата популација. Чии внуци ќе ги наследат гените кои го детерминираат ова својство, ако се знае дека ова заболување се наследува поврзано со полот, со Y хромозомот.

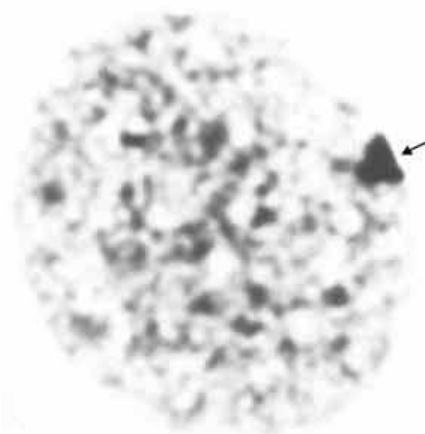
ХРОМАТИНСКИ ТЕСТ –ОДРЕДУВАЊЕ НА БАРОВО ТЕЛО

Според хипотезата на Мери Лајон (1961), еден од X хромозомите во клетките на женски цицачи од било кој вид, се инактивира во фаза на раниот ембрионален развој и останува инактивиран во соматските клетки. Ако по некоја случајност или дефект во клетката има повеќе X хромозоми, останува активен само еден, а другите се инактивираат. Бројот на Баровите тела се одредува според формулата $pX-1$. Нормална женска индивидуа поседува едно, додека нормална машка индивидуа не поседува Барово тело.

Постапка:

- Со шпатула се зема брис од букалната слузокожа (претходно устата се плакне со ладна вода)
- На чисто и суво предметно стакло се прави размаз и се остава да се исуши на собна температура. Пред да се исуши може да се фиксира со неколку капки метил алкохол, 15-20 минути и повторно се остава да се исуши на собна температура.
- Потоа на размазот се капнува 1-2 капки 2% орцеин, претходно исфилтриран, се покрива со покривно стакленце и се остава да се обои околу 5 минути.
- Вишокот на боја се упива со филтерна хартија со лесно притискање на покривното стакло. Со тоа е подготвен привремениот препарат за набљудување. При микроскопирањето се користи олеоимерзионен објектив.

Барово тело се набљудува како темно-црвена точка од внатрешната страна на јадрото (јадрената мембрана), како посветло црвено или розево обоено тело. Може да биде со различна форма: триаголна (свртено со врвот кон центарот на јадрото), правоаголна, овална форма, форма на леќа или пак само како задебелување на јадрената мембрана. Ваквиот препарат се набљудува веднаш или по неколку дена, при што треба да се чува во влажна и ладна комора. Од вака поготивениот привремен препарат може да се подготви и траен препарат.



Сл. 19. Клетка во чие јадро е потенцирано Барово тело со триаголна форма

Задачи:

1. Да се наведе колку Барови тела имаат следните индивидуи:

а) 46, XY_____;

б) 46, XX_____;

в) Клинефелтеров синдром 47, XXY;

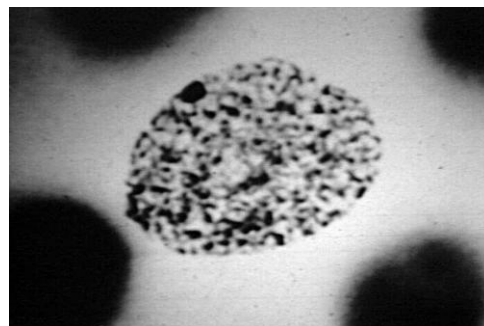
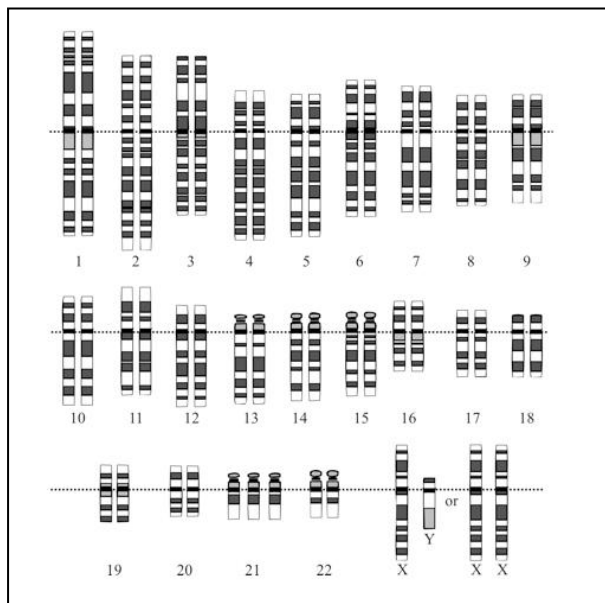
г) Тарнеров синдром 45, XO_____

д) 49, XXXXX_____;

ѓ) 47, XYY_____;

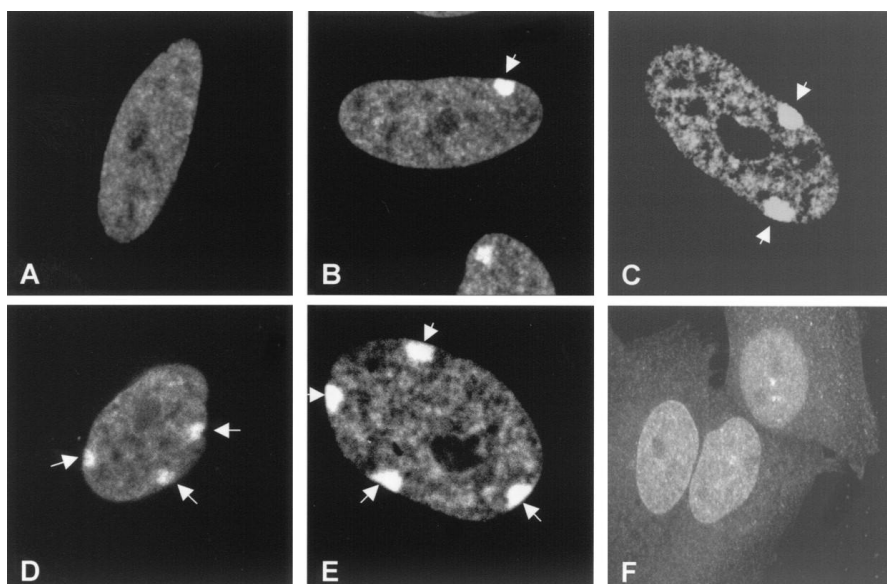
е) Едвардсов синдром 47, XX, 18+;

ж) Даунов синдром 47, XY, 21+_____



Колку барови тела се очекуваат во соматските клетки на човекот со кариотип на сликата лево? _____

Означете го половиот хетерохроматин во јадрото на сликата (десно)!



Напишете ги можните кариотипови на организмите под:

A: _____; B: _____; C: _____;

D: _____; E: _____; F: _____.

МЕНЛИВОСТ НА ГЕНЕТСКИОТ МАТЕРИЈАЛ

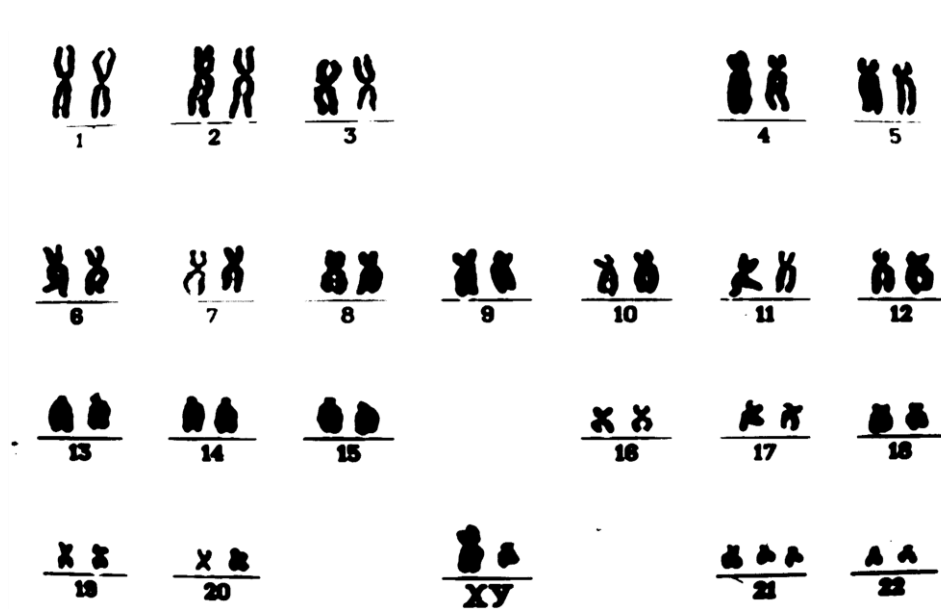
1. Промени во бројот на автосомни и полови хромозоми од типот на:

- **еуплоидии** - полиплоидии;
- **анеуплоидии** - хиподиплоидии а) нулосомија;
б) моносомија.

- хипердиплоидии а) трисомија;
б) тетрасомија;
в) полисомија.

- **миксоплоидија или мозаицизам**
- **акцесорни (прекубројни) или В хромозоми.**

1. а) промени во бројот на автозомни хромозоми



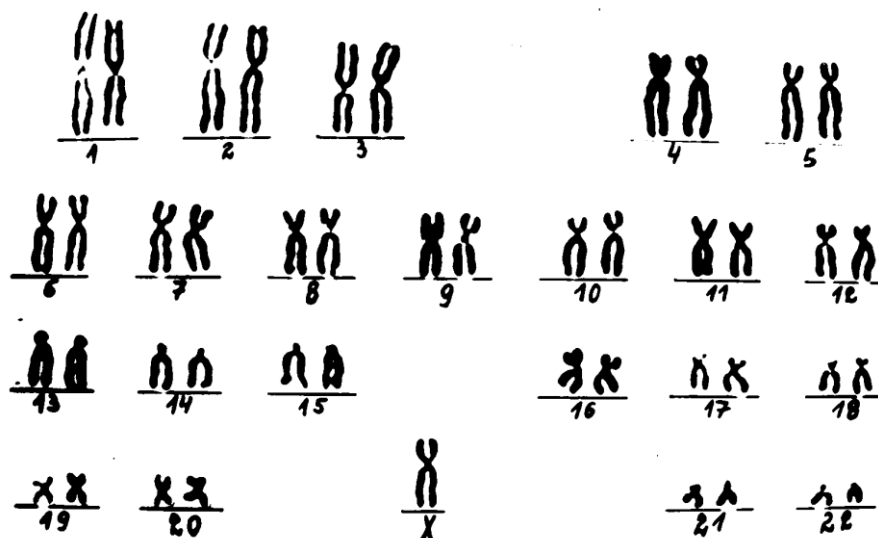
Сл. 15. Кариограм на Down-ов синдром

ТРИСОМИЈА

- Down-ов синдром (47,+21);
- Patau синдром (47,+13);
- Edwards-ов синдром (47,+18).

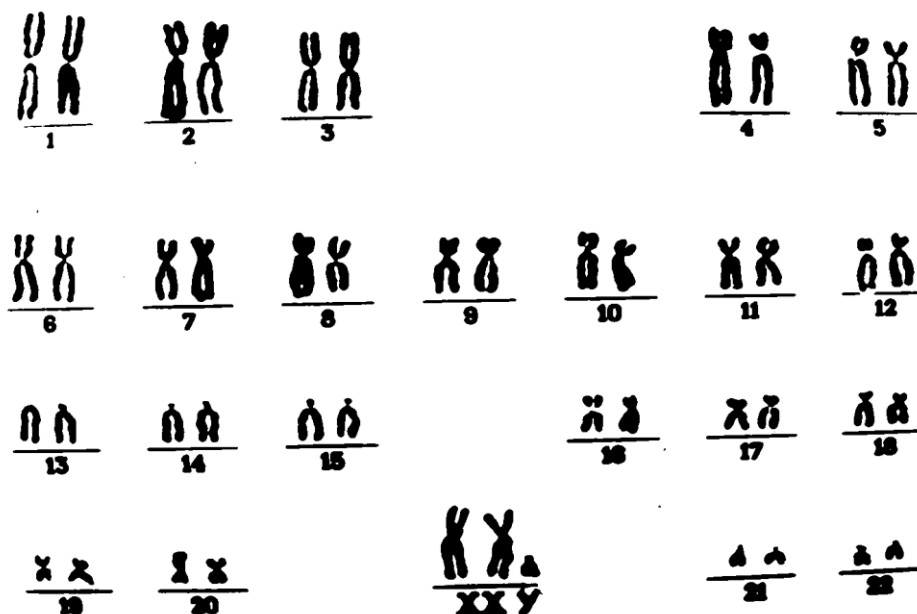
1. б) промени во бројот на половите хромозоми

- моносомија- Turner-ов синдром (45, XO);



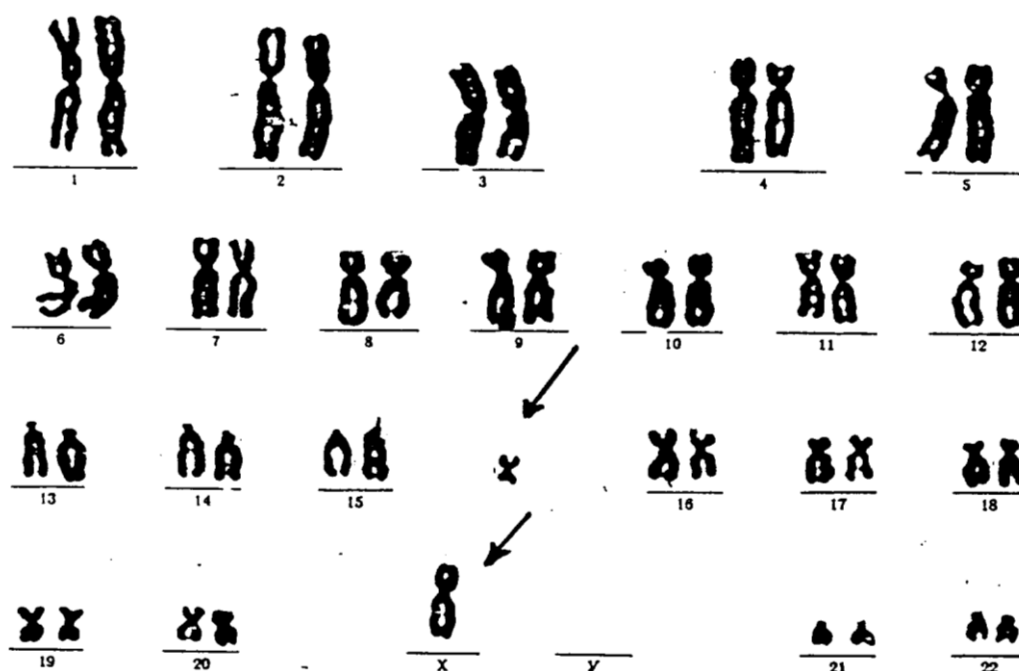
Сл. 16. Turner-ов синдром

- Klinefelter-ов синдром, типична форма (47, XXY);



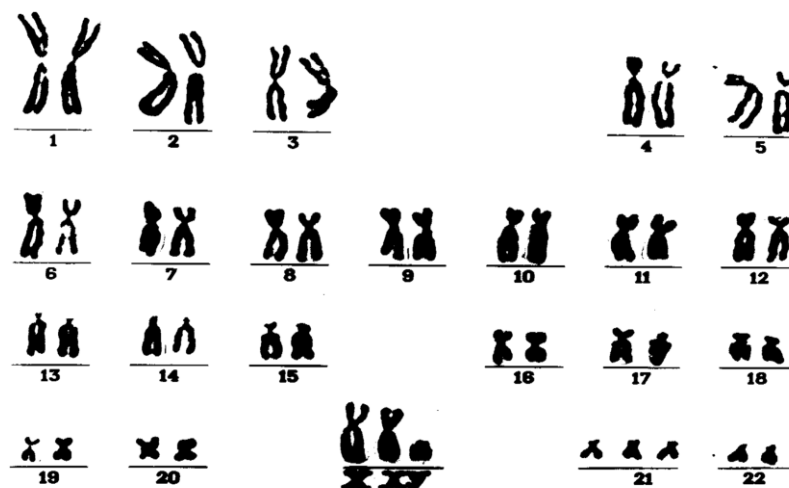
Сл. 17. Klinefelter-ов синдром

- Triple X, трисомија на X хромозомот-суперженки (47, XXX);
- Двоен Y хромозом- (47, XYY);
- Полисомиина гоносоми- екстреман Klinefelter-ов синдром (48, XXYY; 48, XXXY; 49, XXXXY).
- комбинирана нумеричка аберација- моносомија (Turner), со прекуброен метацентричен хромозом (46,XO+met)



Сл. 18. Комбинирана нумеричка аберација- моносомија (Turner), со прекуброен метацентричен хромозом (46,XO+met)

- комбинирана нумеричка аберација на полови и автосомни хромозоми



Сл. 19. Двојна анеуполидија на 21-от и X-хромозомот

СТРУКТУРНИ ХРОМОЗОМСКИ АБЕРАЦИИ

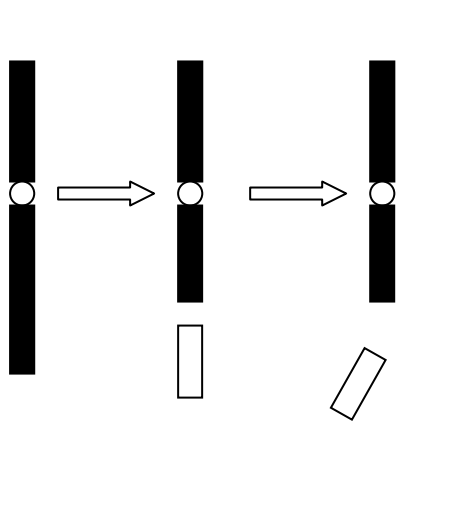
Хромозомите претставуваат структури кои во клеточниот циклус подлежат на циклични промени. Меѓутоа, нивната структура може да се промени и под влијание на различни хемиски и физички мутагени агенси спонтано во природни услови или во тек на експеримент. Овие промени во историскиот развој на видот и во индивидуалниот развој на единката, во одредени случаи можат да бидат летални со што предизвикуваат угинување и на самите промени, меѓутоа во други случаеви промените на хромозомската структура можат да имаат т.н. благопријатен биолошки ефект, со што се задржуваат во генотипот (кариотипот) како негова постојана карактеристика. Структурните промени на хромозомите познати се како хромозомски аберации. Можат да бидат:

1. Интрахромозомски аберации

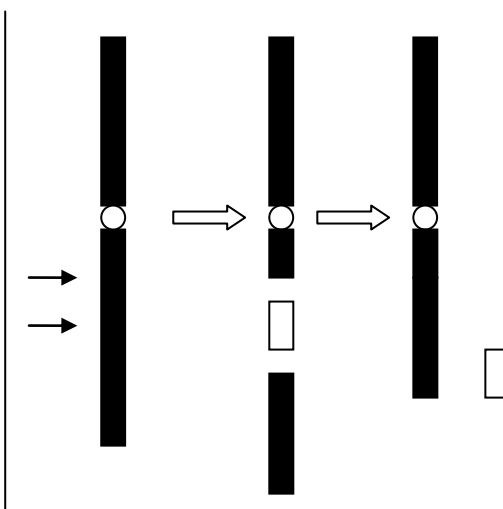
- Делеции:
 - а) терминални
 - б) интерстициелни
- Дупликации
- Инверзии
 - а) парацентрични
 - б) перицентрични
- Ринг-хромозоми
- Изохромозоми

2. Интерхромозомски аберации:

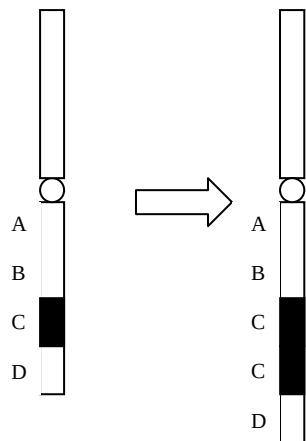
- Robertson-иева транслокација
- реципрочна транслокација



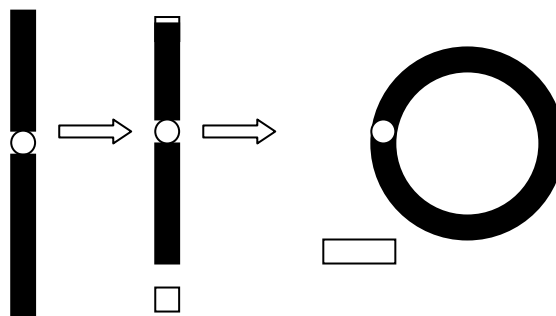
Терминална делеција



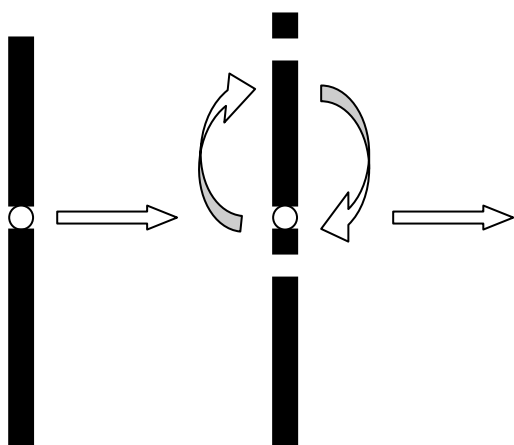
Интерстициелна делеција



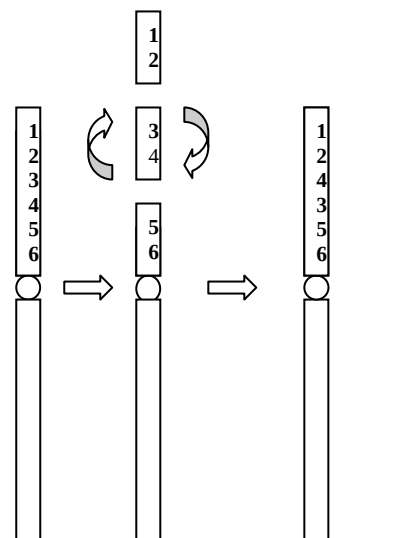
Дупликација



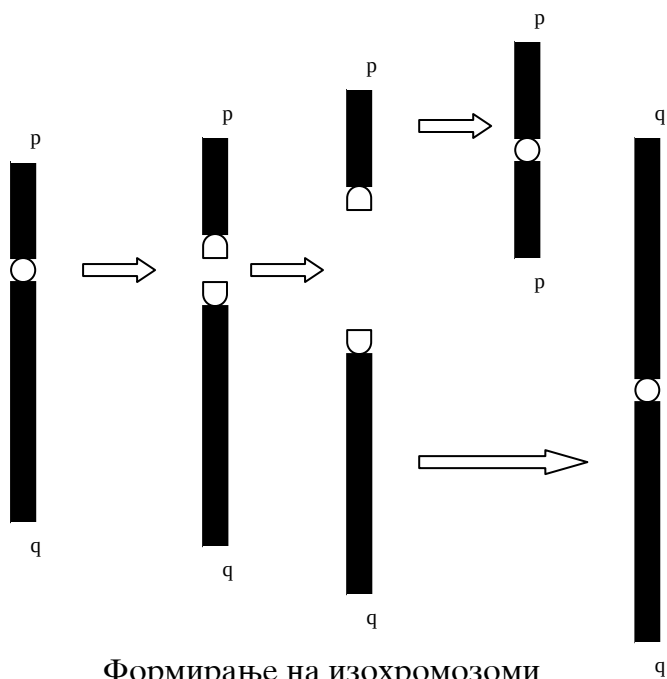
Ринг хромозом



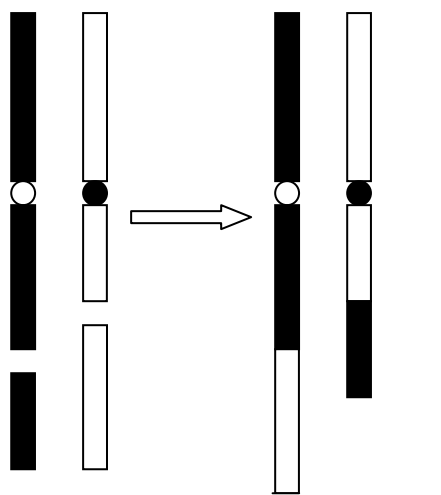
Перицентрична инверзија



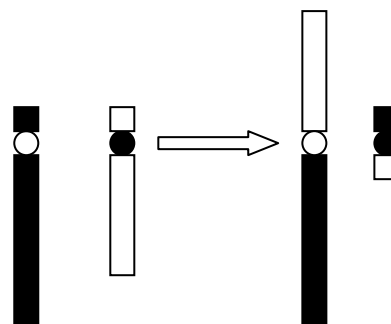
Парацентрична инверзија



Формирање на изохромозоми

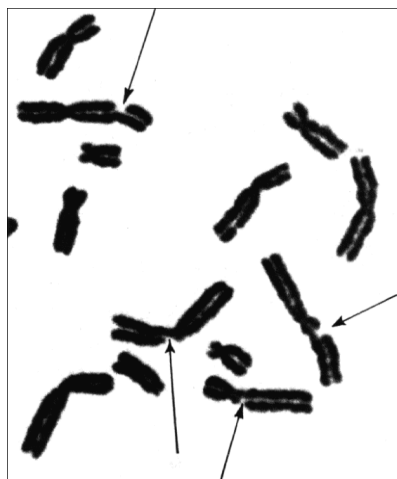


Решипрочна транслокација

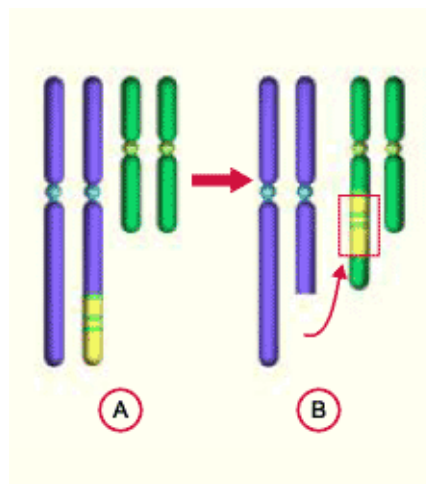


Robertson-ова транслокација

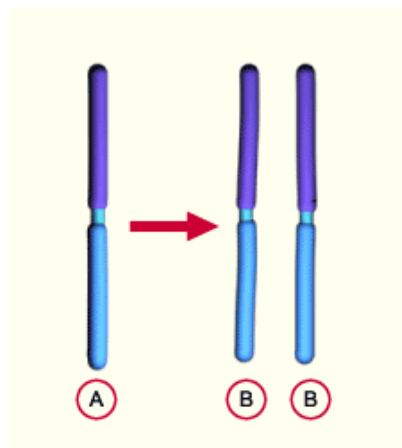
Задача: опишете ги структурните промени на дадените шеми-



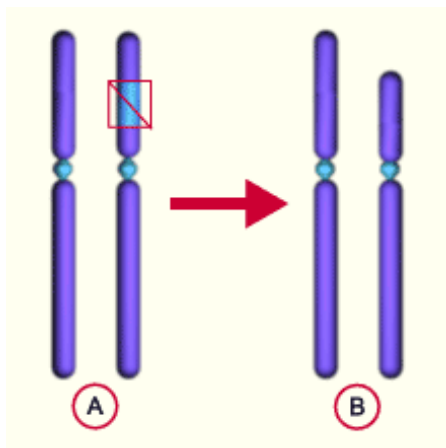
1



2



3



4

ПОЛИТЕНИ ХРОМОЗОМИ

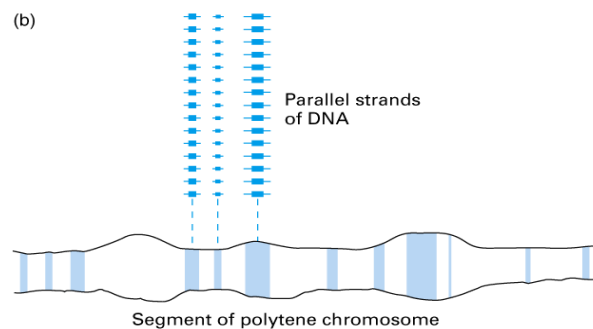
Метода за подготовка на препарати од политени хромозоми на плункови жлезди кај *Chironomus sp.*

Balbani 1881 година утврдил дека плунковите жлезди кај ларвените стадиуми кај некои *Diptera* содржат големи, политени хромозоми, а Nagl (1969) пронашол вакви хромозоми во растителните ембриони на некои легуминози. Нивните морфолошки вредности се: околу 100 пати подолги и до 1000 пати пошироки на напречен пресек од обичните хромозоми во метафаза поради што се смета дека настануваат со непрекината делба во синтетскиот период од интерфаза. Настанатите хроматиди не се одвојуваат туку цврсто се споени една за друга (соматско спарување). Ваква структурна репликација на хромозомите која не е проследена со делба и на јадрото и клетката се нарекува ендомитоза. По должината на хромозомите наизменично се повторуваат светли и темни дискови што преставува посебна карактеристика на овој тип на хромозоми. При тоа, С јазловидните поврзувања на хромонемите од хомологните хромозоми кои се цврсто поврзани ги формираат обоените дискови, додека меѓујазлите ги формираат светлите сегменти помеѓу нив. На одделни места се образуваат задебелувања (puffs) кои содржат големи количини на DNA. Од засега неразјаснети причини, центромерниот регион од хромозомите не се ендореплицира правилно и како резултат на тоа центромерите од сите хромозоми се слеваат во еден, наречен хромоцентар.

Оваа лабораториска процедура го објаснува процесот на отстранување и подготовка на плунковите жлезди што овозможува подготовка на препарати за проучување на политените хромозоми. Употребена е ларва од *Chironomus sp.* наместо најчесто употребуваниот лабораториски објект *Drosophila melanogaster* поради нејзините поголеми димензии што овозможува полесна изолација на плунковите жлезди.



Сл. 20. Изглед на политените хромозоми на светлосен микроскоп



Сл. 21. Структура на политените хромозоми



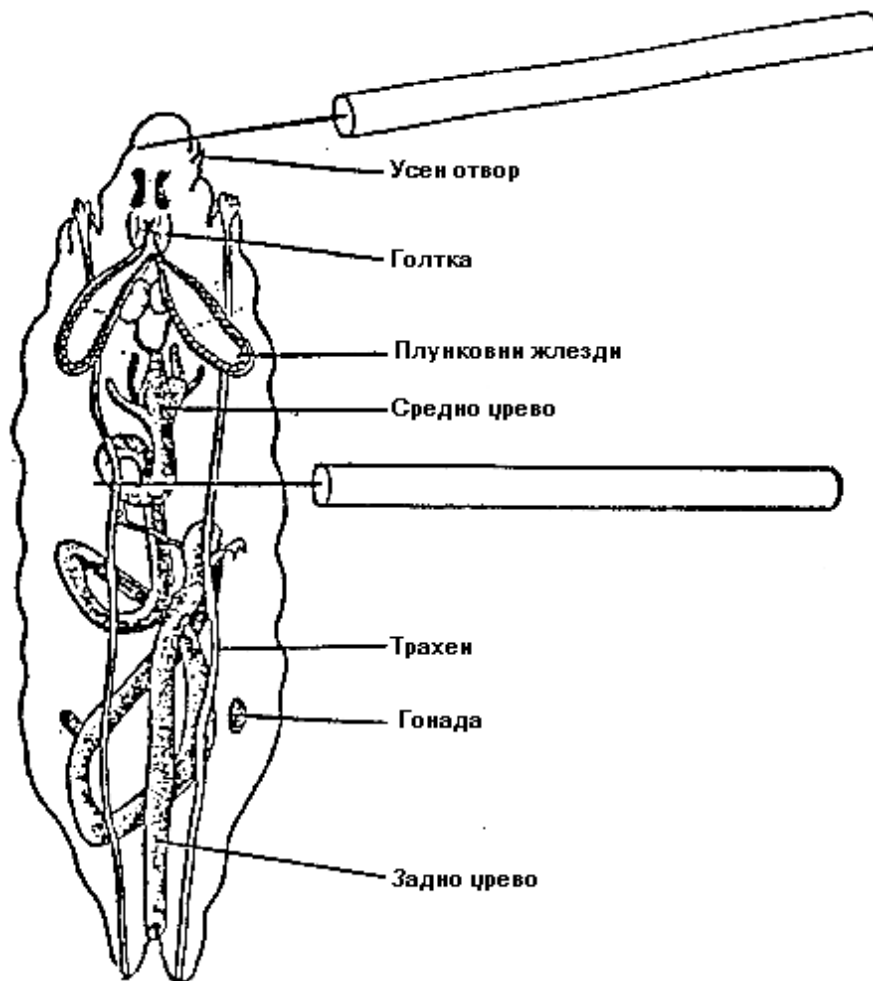
Сл. 22. Изглед на ларвен стадиум кај *Chironomus sp.*

Материјал и прибор за работа

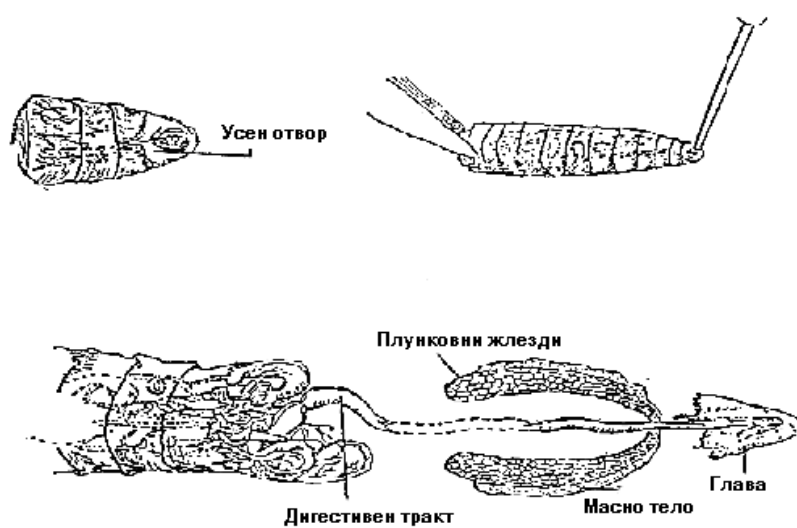
1. Ларви од *Chironomus sp.* (последен стадиум на ларва, пред метаморфоза во кукла);
2. Боја - орцеин или кармин;
3. Подлога (белков глицерин);
4. 45% CH_3COOH ;
5. 0,65% р-р на NaCl (физиолошки раствор);
6. Пинцети, иглици, пипети, стаклени плочи со бела и црна подлога, спиртна ламба, филтерна хартија (формат на предметно стакло), саатни стакла, лупа и микроскоп.

Подготовка на привремени препарати од плунковите жлезди на *Chironomus sp.* (ларви)

1. На предметно стакло се става една капка физиолошки раствор;
2. Од саатното стакло каде ларвата е потопена во вода, се пренесува во физиолошкиот раствор;
3. Се отстранува главата од телото на ларвата, на тој начин што со иглица се притиска телото зад третиот сегмент, а со друга иглица се сече. Потоа, внимателно се истиснува содржината од трите предни сегменти тоа по дорзалната страна, од задниот кон предниот дел на телото;
4. Предметното стакло се става на темна подлога, со цел полесно да се уочат плунковите жлезди. Нивниот изглед наликува на две безбојни кесички;
5. Под микроскоп се набљудува нивната форма;
6. Чисто предметно стакло се премачкува со многу тенок слој од белков глицерин;



Сл. 23. Внатрешна градба на ларва од *Chironomus sp.*



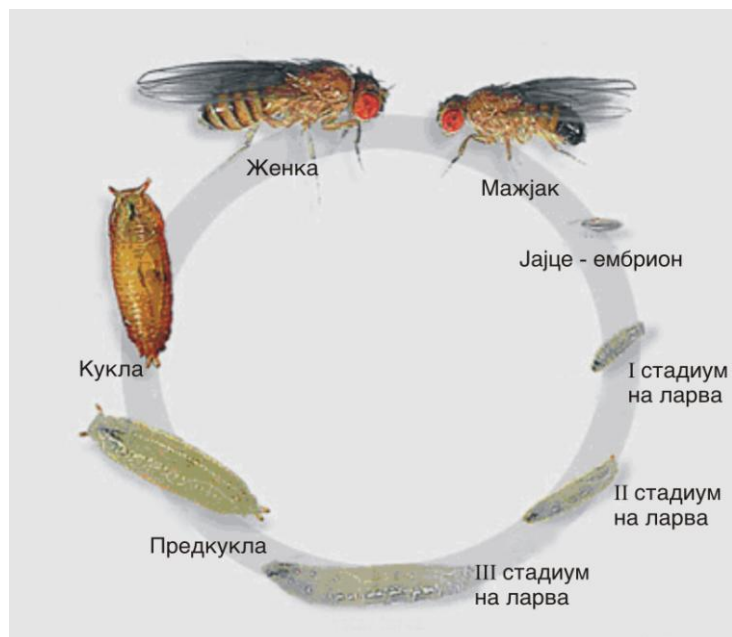
Сл. 24. Локација на плунковните жлезди на ларвата од *Chironomus sp.*

7. Централно на подготвеното предметно стакло се капнува една капка боја;
8. Плушковите жлезди од физиолошкиот раствор со игла се пренесуваат во бојата;
9. Боењето трае 30 минути. Постојано се контролира бојата да не испари, при што плушковите жлезди би останале на суво. Во таков случај се додава боја, бидејќи плушковите жлезди не е добро да останат ни еден момент без боја;
10. По 25 минути боење се подготвува покривно стакло на истиот начин како и претходното предметно стакло (точка број 6);
11. По завршеното боење со помош на филтер хартија се впира вишокот на боја;
12. На жлездите се капнува 45% CH_3COOH , поради диференцирање на бојата;
13. Покровното стакло подготвено во точка број 10 кратко се загрева на пламен и тоа свртено со непремачканата страна кон пламенот. Стаклото не смее да се прегрее, туку едноставно се поминува 1 -2 пати со истото непосредно над пламенот;
14. Со зегреаното покривно стакло се покриваат плушковите жлезди а потребно е премачканата страна да е свртена кон нив.
15. Препаратот се поставува на филтер хартија. Со друго парче филтер хартија истиот се прекрива и точно на местото каде што се наоѓа покривното стакло силно се притиска. Притисокот мора да е силен и е цел да се раскинат јадрените мембрани и хромозомите да се распоредат по препаратот;
16. Потоа подготвениот препарат се провлекува 1-2 пати низ пламенот.

(Забелешка: за подготовка на успешни препарати потребно е препарирањето опишано во постапките од 11 до 16 да се врши брзо и без застој).

**Политени хромозоми во
клетки на плушкови жлезди
кај винска мушичка
(*Drosophila melanogaster*)**

Работата со *Drosophila* е релативно лесна и таа претставува одличен објект за набљудување и проучување на бројни појави. При работата со *Drosophila* може да се користат методи и техники за кои не е потребна премногу комплицирана опрема, а воедно самите мушички се доволно адаптабилни и лесно се прилагодуваат кон условите во лабораторијата. Животниот циклус на *Drosophila* започнува со



Сл. 25. Животен циклус кај *Drosophila melanogaster*

положување на јајца кои се со овална форма. Должината на јајцата е околу 0,5 mm, а дијаметарот е околу 1,8 mm. По 12 - 15 часа од јајцата се изведува првиот стадиум на ларва.

Во периодот меѓу вториот и третиот ден првиот стадиум поминува во втор стадиум на ларва, а по четвртиот ден во трет стадиум на ларва. Околу шестиот ден се формира куклата која по четири дена преминува во адултна форма. Податоците дадени за должината на одделните фази од развитокот на *Drosophila melanogaster* се однесуваат за услови каде оптималната температура е константно 25°C. Во клетките од плунковите жлезди на ларвите од *Drosophila* и некои други претставници од Diptera се наоѓаат гигантски хромозоми наречени политени хромозоми. Важноста на овие јадрени тела ја докажале E. Heitz и H. Bauer во 1933 година. За првпат T. S. Painter ја искористил *Drosophila* (нејзините политени хромозоми) во цитолошки и генетски испитувања при што ги поврзал бандовите со гените. Почнувајќи во 1934 Bridges извршил екстензивни и детални испитувања и притоа изработил цитолошки хромозомски мапи како дополнување на дотогаш постоечките рестрикциони мапи.

Метода за подготовка на препарати

Материјал и прибор за работа

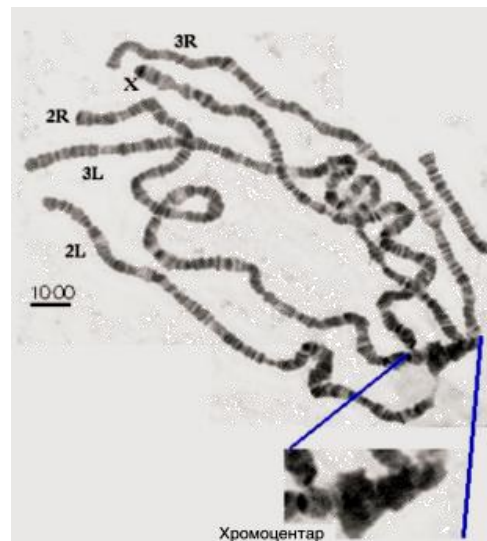
За да се направат успешни препарати потребно е прво да се изолираат плунковите жлезди. При одбирањето на ларва од културата се внимава на фактот дека поголема ларва полесно се препарира. Исто треба да се внимава и таа да е активна т.е. да не е во фаза на формирање на кукла. Ларвата е црвенокамена, сегментирана и со црни вилици. Се храни ненаситено, впрочем тоа е

единственото нешто кое таа го прави. На двата свои краја ларвата има спиракулуми кои водат кон трахеалниот систем. Ова и овозможува размена на гасови кога барем едниот дел од телото е на површината на хранливата подлога. Хранејќи се, ларвата расте и се развива, но како и кај сите инсекти нејзината кутикула е слабо растеглива, па за да се развие комплетно таа периодично се лупи - ја менува кожата и брзо расте пред новата кутикула да се стврдне. Откако два пати ќе се пресвлуче, ларвата излегува од медиумот и на суво формира кукла. Во лабораториски услови таа се качува по сидот на садот во кој се развива и таму ја формира куклата.

Се користи истиот прибор како и за работа со ларвите од *Chironomus*.

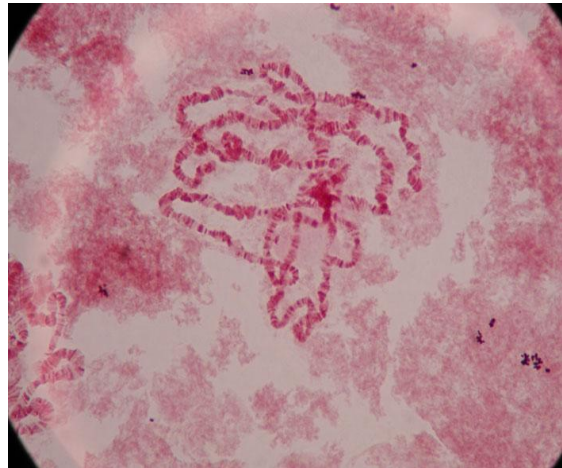
Изолирање на плунковите жлезди

Со ларвата се работи под бинокулар при што најпрво треба да се определат anteriorniот и posteriorniот крај. Овие два краја се разликуваат по тоа што на anteriorniот крај може да се забележат црните вилици на ларвата. Откако ќе ја фиксираме ларвата треба да ја изолираме плунковите жлезди. Тие се белузлави, прозрачни и топчести и се наоѓаат во третиот сегмент од телото на



Сл. 26. Политени хромозоми со хромоцентар и Puff

ларвата. Откако ларвата во трет стадиум ќе се искачи по сидот на садот, нејзината кутикула се стврднува, добива потемно обојување и преминува во предкукла. Во овој стадиум се случува уште едно лупење, но старата кутикула не се отфрла туку останува и служи како надворешна обвивка на куклата. Конечно ларвата преминува во кукла. За време на овој стадиум специфични островчиња од клетки, кои се дормантни од ембрионалниот стадиум, брзо се развиваат во ткива на адултната единка. Овие ткива комплетно ги заменуваат сите ткива на ларвата кои пак се апсорбирани и се користат како извор на енергија.



Сл. 27. Политени хромозоми од *Drosophila melanogaster*

ЗАДАЧИ И ПРАШАЊА ОД ГЕНЕТСКА АНАЛИЗА

МОНОХИБРИДНО ВКРСТУВАЊЕ

1. При вкрстување на пченица без и пченица со осилки прикажете каква пченица се добива во F1 и F2 генерација. Својството без осилки се наследува доминантно, а со осилки рецесивно. Ако при вкрстување на пченица без и со осилки во F2 генерација се добиени 936 растенија пресметајте

- а) колку од тие растенија се со, а колку без осилки;
- б) колку од растенијата без осилки се хомозиготни, а колку хетерозиготни.

2. При вкрстување на црни свињи мајки од родот Berkshir со бел вепар од родот Landras во потомството се добиени 46 бели и 39 црни прасиња. Дали вепарот татко е чиста линија од родот Landras и каков е неговиот генотип во случај да е добиено вакво потомство во F1 генерација.

3. Кај кокошките генотип за обраснати нозе е доминантен над генот за голи нозе. Родители со познат фенотип, а непознат генотип го дале следното потомство:

родители		потомство	
мајка	татко	обраснати	голи
обраснати	обраснати	60	21
обраснати	голи	52	50
обраснати	голи	70	/

Потребно е да се најде генетската конституција на родителите и да се изврши вкрстувањето.

4. Кај човек се среќава фиброза на жлезда која се наследува рецесивно. Болен маж би сакал да се ожени со здрава жена, но стравува дека би можело да се родат болни деца од тој брак. Открива дека во последните 3 поколенија кај идната сопруга се нема појавено тоа заболување. Каков е советот за него?

5. Во хуманата популација, генот за пигментирани очи е доминантен над генот за сини очи и во поголем број случаи ова својство се наследува многу едноставно. Кај брачен пар од кој мажот е со светла боја на очи, жената со пигментирани очи, а првото дете со сина боја на очи, да се одреди генетската конституција на родителите, да се изведе вкрстувањето и да се одреди која е веројатноста нивното второ дете да има пигментирани очи.

6. Способноста за надолжно свивање на јазикот се наследува доминантно, наспроти неспособноста за надолжно свивање, која се наследува хомозиготно рецесивно. Јана, Бојан и Мартин имаат способност за надолжно свивање на јазикот исто како и нивниот татко. Нивната мајка е хомозигот за рецесивните гени. Да се покаже која е можната генетска конституција на таткото.

7. Фенотипски нормални родители добиваат дете заболено од фенилкетонурија (Фелинг-ово заболување). Со цел да се проследи трансмисијата на рецесивниот алел или да се утврди де ново мутација, а во обид да се изготви хередограм за семејството каде се појавува заболувањето, на родителите им е инјектирана стандардна доза фенилаланин, а потоа во одредени временски интервали е мерена концентрацијата во плазмата. Кај овие родители е утврдено присуство на 2 пати поголема концентрација на фенилаланин во споредба со друга родителска двојка, кои во својот хередограм немаат заболени од фенилкетонурија, а кај кои на почетокот од испитувањето исто е убризгана еднаква киличина фенилаланин. Да се определи генетската конституција на родителите и да се даде совет за понатака и образложување на веројатноста ова заболување да се појави и кај следните деца!

8. Дедото и бабата по мајка, дедото по татко и мајката имаат сини очи. Бабата по татко, таткото и синот имаат темни очи. Да се одреди генетската конституција на сите членови на семејството.

9. Кај глувците генот **уу** условува сиво обојување, **Уу** жолто, а **УУ** угинуваат уште на почетокот од ембрионалниот развиток.

а. какво потомство може да се очекува при вкрстување на жолт со сив глушец

б. какво би било потомството ако и двата се жолти

в. од кое вкрстување и зошто е реално да се очекува поголем број на единки од потомството?

10. Кај кучињата, тврдото, оштро крзно се наследува доминантно над мекото. Од родителска двојка кучиња со тврдо крзно, во F1 генерацијата се добиени 6 кученца, сите со тврдо крзно. Како може да се провери дали родителите се хомозиготни или се хетерозиготи?

11. Кучињата од родот Ирски сетер понекогаш се раѓаат слепи, својство кое е детерминирано од рецесивни гени. Доминантниот алел (+), условува нормален развото на очи. Од два родитела со нормален фенотип во неколку последователни раѓања добиено е следното распаѓање на својствата:

- а. 5 кученца, сите слепи
- б. 4 кученца вкупно, 3 нормални и едно слепо
- в. 5 кученца сите со нормално развиени очи

Определете ја генетската конституција на родителите и веројатноста за таквото потомство.

ИНТЕРМЕДИЕРНО ДЕЛУВАЊЕ НА ГЕНИ

1. При вкрстување на кокошка со екстремно кадрави пердуви со петел со прави пердуви сите единки во F1 генерацијата имале умерено кадрави пердуви. При тоа за нормален ген се смета оној кој условува екстремно кадрави пердуви, а негова мутирана форма е оној кој условува прави пердуви. При едно вкрстување во F1 генерацијата добиени се 10 единки со екстремно кадрави пердуви, 20 со умерено кадрави и 12 со прави пердуви. Пронајди ја можната генетска конституција на родителите на ваквото потомство.

2. Кај растенијата *Mirabilis jalapa* и *Antyrium majus*, генот за црвена боја е парцијално доминантен над генот за бела боја. Со вкрстување на единки од F1 генерацијата во F2 се добиваат 10 црвени, 20 розеви и 12 бели растенија. Какво потомство ќе се добие со вкрстување на:

- а) црвени со црвени растенија; б) црвени со бели; в) црвени со розе;
- г) розе со розе; д) бели со црвени; е) бели со розеви; ж) бели со бели.

3. Во подрачјето на Медитеранот се јавува тип на анемија позната како *Thalassemia*, крвна болест што се манифестира во два облика- како *Thalassemia major*, при што симптомите се најизразени, а заболените се хомозиготни за рецесивниот ген (**tt**) и *Thalassemia minor*, која се изразува во многу послаба форма, а заболените се хетерозиготи (**Tt**). **Здравите** се хомозиготи за доминантен ген (**TT**).

а) каква застапеност на *Thalassemia* може да се очекува кај деца од брак во кој мажот боледува од **T. minor**, а жената е здрава;

б) каква е фреквенцијата и обликот на *Thalassemia* кај деца ако и двата родители имаат **T. minor**;

в) детето има **T. major**, каква е можната генетска конституција на неговите родители.

4. Во едно семејство, едниот родител има рамна коса, која се наследува хомозиготно доминантно, додека мајката има кадрава коса, својство кое се наследува хомозиготно рецесивно. Во првата генерација, сите потомци се со умерено кадрава (брановидна) коса т.е. имаат карактеристичен фенотип кој е помеѓу фенотипот на родителите. Каква би била фреквенцијата на фенотиповите и генотиповите во потомството ако и двата родители се хетерозиготи.

Кодоминантно наследување

1. Една близначка е со **B** крвна група и има промени на забите (кое рецесивно се наследува) како и нејзината мајка. Другата близначка е со **A** крвна група и со нормални заби. Таткото и мајката имаат **AB** крвна група. Одредете ги фенотиповите на сите индивидуи и утврдете дали сестрите се монозиготни или се дизиготни близнаци.

Дихибридо вкрстување

1. Кај одредени растенија генот кој условува високо стебло е доминантен (**T**) над генот кој условува ниско стебло (**t**). Кај истите растенија облото зрно е условено од доминантен ген (**O**) за разлика од набрано зрно кое е резултат на рецесивен ген (**o**).

а) Каков однос на фенотипови ќе се добие при вкрстување на растенија од F1 генерација добиени со вкрстување на родители со генетска конституција **TTOO** x **ttoo**;

б) Проверете дали ќе се добие ист однос на фенотипови во F2 генерација при вкрстување на растенија од F1 чии родители биле со следната генетска конституција **TToo** x **tT OO**;

в) Каков резултат ќе се добие од единка од F1 генерацијата која е вкрстена со единка која има ниско стебло и набрани зрна.

2. Кај винската мушичка *Drosophila melanogaster* сивата боја на телото се наследува доминантно (**E⁺**), додека црната се наследува рецесивно (**e**). Долгите крила се наследуваат доминантно (**Vg⁺**) над кратките (**vg**) крила. При вкрстување на мушички со познат фенотип (сиви долги со сиви кратки), но непознат генотип, во F1 генерација добиени се 90 единки кои се сиви и со долги крила, 88 единки кои се сиви но со кратки крила, 30 црни единки со долги крила и 32 црни единки со кратки крила. Да се одреди генетската конституција на родителите и де се изведе вкрстувањето ако се знае дека женската единка е сива со долги крила, додека машката единка е сива со кратки крила. Потоа изведете ги вкрстувањата следејќи ги податоците дадени во табелата.

родители		потомство			
женска единка	машка единка	сиви, долги	сиви, кратки	црни, долги	црни, кратки
сиви, кратки	сиви, кратки	/	32	/	10
црни, долги	сиви, долги	52	/	50	/
сиви, долги	сиви, долги	90	32	/	/
сиви, долги	сиви, долги	93	32	30	10
сиви, кратки	сиви, долги	41	43	/	/

3. Кај пченицата, својството без осилки е доминантно (**G**) над генот кој условува присуство на осилки (**g**). Црвената боја на класот е условена од ген кој доминантен (**C**) над генот кој условува бела боја на класот (**c**). При вкрстување на пченица без осилки која има црвен клас со пченица со осилки и бела боја на класот, во F1 генерацијата се добиваат еднотипни растенија, а во F2 генерацијата се добиваат вкупно 1136 растенија со различни фенотипови. Да се пресмета:

- по колку од растенијата добиени во F2 генерација имаат различни фенотипови;
- колку од тие растенија имаат црвена боја на класот и се без осилки.

4. Кај говедата, генот за црвената боја на влакното е доминантен (**R**) над генот за бела боја (**r**), меѓутоа се работи за парцијална доминантност, така што хетерозиготните индивидуи (**Rr**) се шарени. Единките кои имаат комбинација на адели **HH** и **Hh** се без рогови, а пак оние со **hh** имаат присуство на рогови.

- Каков фенотип се добива во F1 генерацијата при вкрстување на женска единка која е хомозиготна за двете доминантни својства и машка единка која е хомозигот за двете рецесивни својства;
- Каков е фенотипскиот однос во F2 генерацијата.

5. Кај патлицанот генот за виолетова боја на стеблото е доминантен над генот за зелена боја, а во однос на формата на листот- насечен лист е доминантен над целокраен лист. Да се даде генетската конституција на родителите при даден фенотип и односна фенотипови во потомството и да се изведе вкрстувањето.

♀ Родители ♂ x	Потомство			
	V⁺N⁺	V⁺N	VN⁺	VN
Виолетов, насечен x зелен, насечен	321	101	310	107
Виолетов, насечен x виолетов, целокраен	219	207	64	71
Виолетов, насечен x зелен, насечен	722	231	/	/
Виолетов, целокраен x зелен насечен	70	90	86	77

6. Претпоставете дека генот **C** и неговиот алел **c** покажуваат непотполна доминација во однос на бојата на цветот, така што генотипот **CC** дава црвен цвет, генотипот **Cc** виолетов цвет и генотипот **cc** бел цвет. Претпоставете, исто така дека генот **S** и неговиот алел **s** покажуваат непотполна доминација во однос на бојата на семките, така што генотипот **SS** дава црвено црна семка, генотипот **Ss** виолетова, а генотипот **ss** бела семка. Одредете ги фенотиповите и нивните очекувани пропорции во потомството при следните вкрстувања:

- SSCC x Sscc;**
- SsCc x SsCc;**
- Sscc x SsCc**

7. Катааркт на очи (**AA**) и нормален вид (**BB**) се наследуваат доминантно, а нормални очи без катааркт (**aa**) и кратковидост (**bb**) рецесивно. Светлана и Бранко се хетерозиготи со вроден катааркт, а нормален вид. Нивните баба и дедо по мајка се исто така хетерозиготи по однос на двете својства. Да се определат можните генетски конституции на родителите. Мајката е со катааркт, а кратковида, таткото без катааркт со нормален вид.

ТРИХИБРИДНО ВКРСТУВАЊЕ

1. Ако се вкрстат грашок со жолта боја (**A**), со округло зрно (**B**) и виолетов цвет (**C**) со грашок со зелена боја (**a**), набрано зрно (**b**) и бел цвет (**c**) во F1 генерацијата сите единки се со изразени доминантни својства, а во F2 генерацијата односот е сосема поинаков. Да се провери каков е тој однос.
2. Двајца хетерозиготни родители се со темна коса, со нерамен раб на косата на челото и без бемки (својства кои се наследуваат доминантно). Која е веројатноста во потомството да се појави дете со црвена коса, рамен раб на коса на челото и со присуство на бемки (својства кои се наследуваат хомозиготно рецесивно).
3. При вкрстување на грашок со мазно, жолто семе и со виолетов цвет, со грашок кој има зелени, набрани зрна со бели цветови, во потомството се добиени вкупно 3218 растенија. Да се пресмета колку од нив се хомозиготи за доминантните а колку хомозиготи за рецесивните својства и дали теоретски се очекуваат таквите генетски конституции и при тест вкрстувањето.
4. Колку видови на гамети може да даде индивидуа со генотип:
a) **AaBbCCddEeFF**
b) **AaBbCcddEeFF?**

МУЛТИПЛИ АЛЕЛИ

1. Кај зајакот има серија од мултипли алели за боја на крзното. **C** е дивiot тип, **C^{ch}** е темна чинчила, **C^d** е светла чинчила, **C^m** е боја на куна златица, **C^{ha}** е хималајско албино и **C^a** е албино. Подредувањето е извршено според интензитетот на обојувањето т.е пигментираноста и по доминантноста и тоа на тој начин што и обете одејќи од дивiot тип кон албино постепено се намалуваат. Тоа значи дека дивiot тип е најтемно обоен и притоа доминантен над сите други, а на пример темната чинчила е малку посветла и доминантна над сите освен над дивiot тип. При вкрстување на див зајак со албино добиени се 8 единки со дива боја и 6 единки со боја на куна златица. Да се одреди генетската конституција на родителите.
2. За наследување на бојата на перикарпот кај *Zea mays* одговорни се серија алели означени како **P^r**-црвен перикарп, **P^c**-црвен перикарп со бел врв, **P^v**-вариегате, **P^m**- мозаик, **P^o**- портокалов, **P^w**- безбоен перикарп. Да се определи потомството ако се вкрсти пченка со:
a) **P^rP^r x P^oP^o**;
б) **P^rP^v x P^wP^w**;
в) **P^rP^m x P^mP^o**.
3. Кај морско прасе бојата на влакното е одредена од 4 генски алели и тоа:
C-црна боја; **C^k**-сепија; **C^d**-крем; **C^a**-албино.
Следејќи ги информациите дадени во следната табела обиди се да ги изведеш вкрстувањата.

парентална генерација	филијална генерација			
женска x машка единка	црни	сепија	крем	албино
црни x албино	10	11	/	/
крем x крем	/	/	32	10
сепија x крем	/	20	9	10
црни x албино	5	/	4	/
црни x крем	12	10	/	/
црни x сепија	17	18	/	/
сепија x сепија	/	31	11	/

4. Во случај на спорно татковство да се одреди таткото на детето чија крвна група е **A Rh⁻ M**, а мајката има **AB Rh⁺ MN**. Првиот можен татко е со **A Rh⁺ MN**, а вториот е **B Rh⁻ N**.

5. Ако маж од крвната група **AB** се ожени со жена од крвната група **A** (чиј татко ја имал крвната група **O**), кои сè крвни групи би можело да ги има потомството на овој пар?

6. Во болница, случајно се измешани 4 бебиња. **ABO** крвните групи на четирите бебиња се знае дека се: **O, A, B** и **AB**. **ABO** типовите на родителските парови се детерминирани. Наведете кое бебе на кој родителски пар му припаѓа: (а) **AB** x **O**, (б) **A** x **O**, (в) **A** x **AB**, (г) **O** x **O**.

7. Да разгледаме други видови на крвен полиморфизам кај луѓето. Алелите **L^M** и **L^N** ги детерминираат **M, N** и **MN** крвните групи. Доминантниот алел **D** кој му припаѓа на друг ген детерминира **Rh⁺** фенотип, додека хомозиготот за рецесивниот ген (**d**), е **Rh⁻** фенотип. Двајца мажи водеа родителски спор преку суд, обајцата тврдејќи дека се родители на трите деца. Крвните групи на мажите, на децата и на мајката се следните:

Индивидуа	Крвна група		
Мажот	O	M	Rh ⁺
Љубовникот на жената	AB	MN	Rh ⁻
Жената	A	N	Rh ⁺
Првото дете	O	MN	Rh ⁺
Второто дете	A	N	Rh ⁺
Третото дете	A	MN	Rh ⁻

Дали врз основа на приложените докази може да се утврди татковството?

8. Крвните групи кај човекот од ABO системот опфаќаат 4 фенотипа- **A, B, O, AB** крвни групи, кои се детерминирани од генски алели I^A , I^B и рецесивен ген i . I^A и I^B се секогаш доминантни над i , а меѓу себе се кодоминантни. Во случај на спорно татковство определете кој е татко на детето со **O** крвна група, ако мајката е **B**, едниот можен татко со **A**, а другиот со **AB**.

9. Кои би биле можните крвни групи ако едниот родител има **A**, а другиот **B** фенотип.

10. На една породилна клиника направена е грешка при што се заменети бројчињата на две бебиња. Да се определат вистинските родители, искористувајќи ги податоците од имунолошките анализи:

- Првото бебе е со **A**, а второто е со **AB** крвна група.
- Првата родителска двојка- мајката со **O**, а таткото со **AB** крвна група
- Втората родителска двојка- мајката со **A**, а таткото со **B** крвна група

11. Маж со **A** крвна група и жена со **B** крвна група имаат две деца. Едното дете е со **AB** крвна група, а второто со **O** крвна група. Да се одреди генетската конституција на родителите и да се изведе вкрстувањето.

12. Од различни комбинации крвни групи и Rhesus фактор утврдете ги можните родителски парови на дадено дете.

Дете	Мајка	Татко
O, M	A, M	B, MN
O	O	AB
A, MN, Rh ⁺	O, N, Rh ⁻	AB, M, Rh ⁻
AB, M, Rh ⁻	AB, N, Rh ⁺	A, MN
B, N, Rh ⁺	O, MN, Rh ⁻	O, N, Rh ⁺

ПЛЕОТРОПНОСТ НА ГЕНИ ЛЕТАЛНИ И СУБЛЕТАЛНИ ГЕНИ

1. Во Берлин со инциденца 1:1000 луѓе се појавува аномалија на белите крвни клетки, многу слична на Пелгрова аномалија кај зајациите. Аномалијата се наследува доминантно, но сèуште не е откриен доминантен хомозиготен вид во хуманата популација. Да се даде генетско објаснување за оваа појава ако се има предвид аналогитата на наследувањето на Пелгеровата аномалија кај зајациите. На пример, кога зајаци со Пелгрова аномалија ќе се спарат меѓусебе, резултираат со приближен сооднос 2:1 или 439 единки со Пелгрова аномалија и 223 нормални потомци. Во рамките на потомството се јавуваат и 39 екстремно абнормални потомци кои не само што имаат дефекти во белите крвни клетки туку и тешки деформитети на скелетот, па набрзо по раѓањето изумираат. Која би била генетската конституција на овие екстремно форми и кое е објаснувањето за ваквата појава.

2. Кај расата Каракулски овци доминантниот ген (**We**) ја условува сивата боја на влакната, а рецесивниот ген, црната (**we**). При вкрстување на сиви овци со сиви

овни, приближно една третина од приплодот со сива боја на влакната умираат веднаш по преминувањето кон самостојно хранење. Резултатите од ветеринарните патоанатомски истражувања покажале дека кај сите изумрени јагниња постојат аномалии во градбата на желудникот и хранопроводот, при што се јавува недоволно развиен предстомак. Да се одреди генетската конституција на родителите и да се даде објаснување за ваквата појава.

3. Кај лисицата доминантниот ген **P** кој условува платинесто крзно во исто време е и со летално дејство врз организмот. Рецесивниот ген **p** условува сребрено црно крзно и нормална виталност. Каков е генотипот на возрасни единки со платинесто крзно и какви единки треба да се вкрстуваат за да селекционерите ги избегнат економските загуби при производството на крзна од лисици.

4. Кај говедата доминантен ген (**D**) предизвикува скусување на главата и нозете при развојот. Во хомозиготна состојба предизвикува смрт кај животните. Каков ќе биде фенотипскиот и генотипски распад ако се вкрстат две хетерозиготни индивидуи?

ПОЛИГЕНО НАСЛЕДУВАЊЕ

1. Бојата на кожата е определена од 3-4 пара генски алели. Ако е поголем бројот на гените кои ја определеле белата боја на кожата, кожата е помалку пигментирана и обратно. Ако претпоставиме дека бојата на кожата е определена од два пара алелни гени, какво потомство ќе се добие:

а) во брак меѓу бела жена и црнец, а какво потомство ако во брак стапат двајца мелези?

б) колкава е веројатноста да се роди дете со изразен светол тен, ако родителите се со генетска конституција ($A_1a_1A_2a_2a_3a_3 \times a_1a_1A_2a_2A_3$)

2. Кај пченката неопходно е присуство на три доминантни гена (**A**, **C** и **R**) за појава на црвено семе. Обоено растение со непознат генотип е вкрстено со три растенија со познат генотип и добиен е следниот резултат:

- Со растението со генотип **aaccRR** добиено 50% обоено семе;
- Со растението со генотип **aaCCrr** добиено 25% обоено семе;
- Со растението со генотип **AAccrr** добиено е 50% обоено семе.

Каков е генотипот на обоеното растение кој служел за сите три вкрстувања?

3. Бојата на зрното на пченицата ја одредуваат два гена, сместени на различни хромозоми. Со вкрстување на пченица со црвено зрно со пченица со бело (безбојно) зрно добиено е црвено потомство. Со меѓусебно вкрстување на припадниците на F1 генерација добиено е потомство со црвено и бело зрно во однос 15 : 1. За каква генска интеракција се работи и каков е генотипот на родителите?

ЕПИСТАТИЧКО И ХИПОСТАТИЧКО ДЕЛУВАЊЕ НА ГЕНИ

1. При вкрстување на сорти овес чии плевички се со црна боја и овес со сиви плевички во F1 генерацијата добиени се растенија со црни плевички, а во F2 генерацијата се јавило раздвојување на фенотиповите во сооднос: 12 со црна, 3 со сива и 1 со бела боја. Станува збор за полигено наследување каде генот **A** има епистатичко дејство и е доминантен над генот **B**, што резултира со црна боја. Ако има хомозиготна рецесивна состојба на генот **aa**, а доминантна на **BB** или **Bb**, тогаш резултира со сива боја. Само хомозиготна рецесивна состојба во однос на двата гена резултира со бела боја. Да се покаже со Панетова мрежа вкрстувањето.

2. Кај човекот хетерозиготната состојба на генот (**Bb**), хомозиготната доминантна (**BB**) или хомозиготната состојба на генот **a** доведува до појава на еден вид слепило (**Retinitis pigmentosa**). Само генотипот **A_bb** е нормален. Слепа жена чии родители имаат нормален вид се омажила за човек со генотип **AaBb**. Каква ќе биде генотипската и фенотипската конституција на потомството?

КОМПЛЕМЕНТАРНО И СУПЛЕМЕНТАРНО ДЕЛУВАЊЕ НА ГЕНИ

1. Американскиот генетичар Емерсон (1932), дошол до заклучок дека бојата на алеуронскиот слој во зрна од *Zea mays* е условена од интеракција на повеќе гени сместени во повеќе генски локуси кои се наоѓаат на неколку хромозоми. На пример, црвената боја на алеуронот се изразува ако во трите локуси се присутни само доминантни гени, а ако било кој од нив е рецесивен, се развива безбоен алеурон. Овие гени се наречени комплементарни бидејќи се дополнуваат во експресијата на тоа својство и поради таквата интеракција можно е од фенотип со безбоен алеурон да се добие потомство со црвен алеурон. Обиди се да покажеш какво потомство ќе се добие при вкрстување на **AaBbRR** x **AaBbRR**, а какво со вкрстување на **AABBRR** x **aabbRR**.

2. Полигената особина детерминирана со мал број на генски алели е една форма на глувонемост. За да може нормално да слуша и зборува човекот мора да поседува барем по еден вроен различен немутиран ген од гените кои ја детерминираат оваа особина. За полесна анализа ќе претпоставиме дека глувонемоста е определена од два пара генски алели и дека таткото е нормален, со генотип **AABB**, а мајката е глувонема, со генотип **aabb**. Какво ќе биде потомството ако и мајката и таткото се фенотипски нормални, но се хетерозиготи и за која интеракција на гени станува збор?

ИНХИБИТОРНИ ГЕНИ

1. При вкрстување на растенија со бели и црвени цветови во F1 генерацијата се добиваат растенија со бели цветови, а во F2 доаѓа до раздвојување на фенотипот во однос 3 црвени : 13 бели. Ова се објаснува така што покрај генскиот локус за

боја на цвет има уште еден инхибиторен генски локус кој го спречува развојот на бојата, односно експресијата на генот за боја. Поради тоа родителите имаат различна генетска конституција. Цветовите со бела боја задолжително мора да поседуваат инхибиторен ген кој ќе биде доминантен. Каков фенотип и генотип ќе се добие ако се вкрстат две растенија со бели цветови и со генотип **RrIi** x **RrIi**, а каков ако се вкрстат **rrII** x **RRii**?

2. Бојата на перјата кај кокошката е под контрола на два пара генски алели. Доминантниот алел **C** условува создавање на пигмент, но неговата функционалност бара присуство на рецесивниот алел на генот **I**. Со вкрстување на две бели единки добиена е бела F_1 генерација. Со меѓусебно вкрстување на единки од F_1 , добиена е F_2 генерација во која се јавуваат бели и обоени потомци во сооднос 13:3. Одредете ги генотиповите на родителите, F_1 и F_2 генерации и објаснете го типот на наследување.

СВРЗАНИ ГЕНИ

1. Катаракт и полидактилија се сврзани доминантни својства. Една млада жена наследила катаракт од таткото и полидактилија од мајката. Нејзиниот маж е со нормална конституција. Да се пресмета веројатноста нивниот потомок да:

- а) ги искаже двете аномалии;
- б) искаже само една од нив;
- в) да биде потполно нормален;
- г) ако го земеме предвид crossing-over-от каков е одговорот?

ПОЛОВО УСЛОВЕНО, ПОЛОВО ОГРАНИЧЕНО И МАЈЧНСКО НАСЛЕДУВАЊЕ

1. На една фарма за млеко, фармер и генетичар дискутираат за поврзаноста на полот и бојата кај расата Ayrshire. Фармерот поседува крава со махагони боја, и новородено црвено теле, па би сакал да го знае полот на телето. Генетичарот му објаснува дека полот на телето се познава по бојата- кај расата Ayrshire генотипот **AA** е со махагони боја, генотипот **aa** е со црвена боја, а генотипот **Aa** е со махагони боја кај машките форми, додека кај женските форми е со црвена боја. Кој пол е телето?

2. Еден вид на полжав (*Limnea peregra*) е хермафродит и може да се размножува со вкрстено оплодување или со самооплодување. Декстралниот тип на навиткување на черупката (во правец на стрелките на часовникот) е детерминиран од доминантен ген. Меѓутоа, со вкрстување на декстрален мажјак со синистрална женка секогаш се добива потомство со синистрално навиткана черупка. Како би можело да се објаснат овие резултати?

3. Порано се сметало дека ќелавоста е полово сврзана особина поради тоа што претежно се јавува кај мажите. Денес се знае дека оваа особина ја предизвикува автозомниот доминантен ген **B**, кој се експресира само кај мажите. Човек кој не е ќелав се оженил со жена чиј татко исто така не е ќелав. Нивниот син, меѓутоа, е ќелав. Каков генотип имала жената?

РОДОСЛОВНИ СТЕБЛА- ХЕРЕДОГРАМИ

Еден од класичните генетички методи за откривање разни патолошки и нормални карактеристики е генеалошкиот метод, односно изработката на родословни стебла или хередограми. Во класични генетички методи, кои се карактеристични за Менделовата анализа, спаѓаат најразлични вкрстувања на животни и растенија, експерименти што секако не се можни во хуманата генетика, не само поради фактот што човекот не може да биде експериментален објект (од хумани причини), туку и поради самото репродукциско време кај човекот, кое е многу подолго од животот на еден експериментатор. Поради тоа, хуманата генетика користи многу поедноставен метод како што е генеалошкиот, односно изработка на хередограми, во кои, со помош на унифицирани симболи, се внесуваат податоци за најразлични карактеристики кои се следат во повеќе генерации, користејќи ги принципите на наследување кои ги поставил Мендел.

Студиите на следење на едно својство секогаш започнува со "афицираната" индивидуа, која се означува како **proband** или **propozitus** (за жени понекогаш се користи и терминот **proposita**), додека личноста која бара совет и учествува во составувањето на хередограмот се нарекува **консултант**. Генетската историја на пациентот и сите информации поврзани со наследувањето овозможуваат да се конструира **семејно сџебло** или **хередограм**. Тоа се оформува со помош на одредени симболи, кои на предлог на Американското Биро за Еугеничка евиденција (ERO-Eugenics Records Office), се прифатени и стандардизирани од страна на Англиското Друштво за еугеничко образование (Eugenics Education Society), така што претставуваат универзални знаци за исцртување на шеми за семејни стебла.

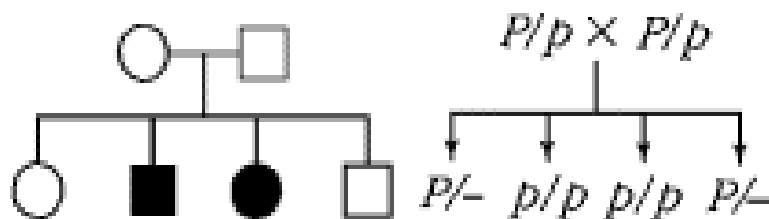
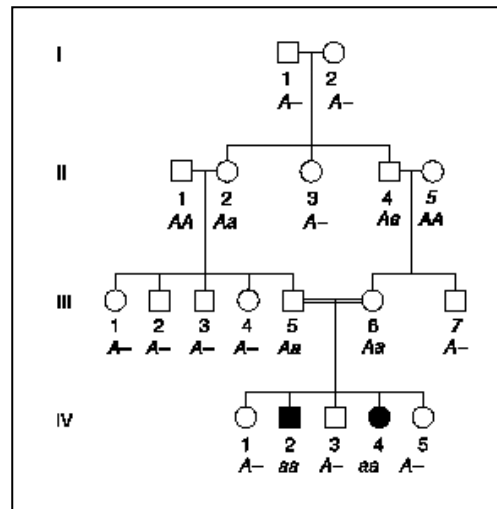
Потоа следи пополнувањето на деталите во хередограмот од машката и женската страна. Вообичаено е татковата линија да се црта од лева, а мајчината од десна страна. При тоа, различните генерации се обележуваат со римски бројки, а индивидуите со арапски бројки, и тоа од лево кон десно по хронологија на раѓање. За сите членови на семејството се внесуваат општи податоци (дата на раѓање, име и кратки медицински информации). Во текот на изработката на хередограмот можни се и некои проблеми кои потекнуваат од неискреноста на консултантот, односно намерно да се премолчат некои информации, како прељуба или абортус итн. Друг тип на проблеми се оние кога за одредена индивидуа која е умрена неможат да се добијат информации за дадената карактеристика, со што хередограмот може да биде и неуспешен.

Автозомни рецесивни карактеристики

Ваквите карактеристики се јавуваат со иста фреквенција и кај машки и кај женски, а се многу ретки, бидејќи и двата родитела (нормален фенотип) мораат да бидат хетерозиготи за даденото својство, за да дадат рецесивен хомозигот. Тоа најчесто е случај кај родители кои се во крвно сродство. Сродни родители имаат поголема можност да носат исти рецесивни гени за дадена болест, отколку родители кои не се роднини.

Од потомците на два хетерозиготни родители би се очекувало една четвртина од нив да бидат афицирани (3:1), а три четвртини здрави. Меѓутоа во потомството може и да не се јави рецесивен хомозигот. Токму поради тоа може да се заклучи дека се работи за брак помеѓу два хетерозиготни родители во моментот кога ќе се роди афицирано дете. До тој момент, не постои можност да се види за какви родители станува збор. Има и примери каде во потомството помеѓу два хетерозиготни родители се јавуваат повеќе од една четвртина афицирани деца.

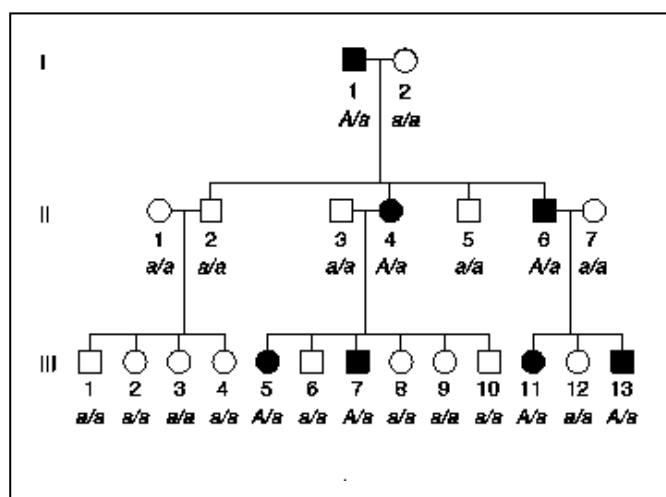
Како да го препознаеме автозомно-рецесивното својство? Бидејќи болеста се јавува и кај машки и кај женски индивидуи и фенотипските пропорции се еднакви, тогаш може да се претпостави дека се работи за автозомно својство, а не за X поврзано, а бидејќи во потомството се јавуваат болни деца од здрави родители се заклучува дека тоа е рецесивно својство кое се изразува само во хомозиготна состојба. Следниот хередуграм е пример за ваквата појава.



Класичен пример за автозомно рецесивно наследување е наследувањето на **фенилкетонуријата**. Еве еден хередуграм во кој се анализираат болни деца од родители кои се во крвно сродство. Типичен пример за вакво наследување е **албинизмот**, кој не ретко се јавува кај луѓето, а особено го има кај животните.

Автозомно доминантно наследување

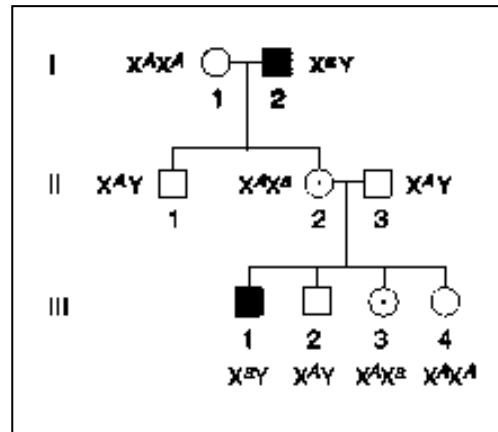
При автозомно доминантно наследување, доколку се работи за гени кои условуваат одредена патолошка состојба во организмот, носителите на немутиран ген се болни а мутираните гени кои се и рецесивни, условуваат сосема нормален развој и здрав организам. Доминантните летални гени брзо исчезнуваат од популацијата, додека рецесивните, како тивки носители на одредено заболување, во хетерозиготна состојба се шират во популацијата, се додека не се најдат во хомозиготна состојба и не се експресираат.



При анализа на хередограми, еден од главните аргументи при констатацијата дека се работи за доминантно автозомно наследување е дека дадениот фенотип се појавува во секоја генерација и дека афектираните татковци и мајки "го пренесуваат фенотипот на ќерките и на синовите". Присутноста на двата пола од кои дел се заболени, а дел здрави, укажува на врзаноста на ова својство за автозомите, а не за гоносомите. Доволно е само едниот родител да има еден доминантен алел за во потомството да се јави болно дете. Еве еден хередограм во кој е претставено автозомно доминантно наследување на **брахидактилија** (кратки прсти), која се наследува во однос 1:1 ако едниот родител е хетерозигот, а со тоа и носител на тој фенотип.

X врзано рецесивно наследување

Карактеристика врзана за X хромозомот може да биде доминантна или рецесивна кај женските индивидуи, бидејќи тие поседуваат два X хромозома. Додека машките индивидуи се хемизиготни за карактеристиките врзани за X хромозомот, затоа што поседуваат само еден X хромозом. Од тие причини независно дали карактеристиката е рецесивна или доминантна, таа фенотипски ќе се експресира. Класичен пример за вакво наследување е **хемофилијата** (неможност за коагулација на крвта), во родословното стебло на кралицата Викторија.

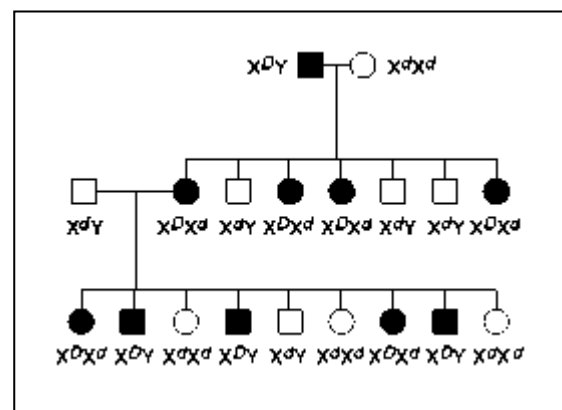


X врзано доминантно наследување

Хередограмите за ова наследување ги имаат следните карактеристики:

1. Заболениите машки ги пренесуваат своите карактеристики само на своите ќерки, но не и на синовите.

2. Жени хетерозиготи за дадено својство во брак со неафектирани мажи може да дадат пола од потомството-синови и ќерки болни. При тоа би потенцирале дека ваквата распределба се однесува на очекуваните генотипови односно на коефициентот на веројатноста доминантните алели да се појават во следната генерација, што значи дека во практиката можни се секакви комбинации па дури и сите здрави деца.

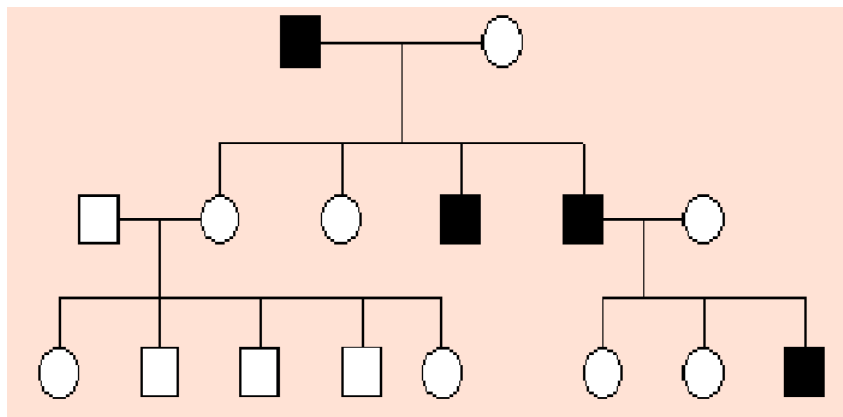


Постојат неколку примери за овој тип на наследување, но најкарактеристичен е тој за хипофосфатемијата.

Y врзано (холандрично) наследување

За гените кои се сместени само на едниот полов хромозом (X или Y), индивидуите се хемизиготни бидејќи немаат соодветен алел на другиот гоносом и се експресираат дури и во рецесивна состојба. За таквите гени велиме дека се псевдодоминантни и како мутирани гени.

Во хуманата популација машките единки се хетерогаметни, Y - хромозомот се предава од таткото на синовите па од таму гените кои се само во Y - хромозомот ќе покажат **холандрично наследување**. Тие се предаваат само на машките потомци и лесно можат да се следат низ генерациите.



Сл. Хередограм за начин на трансмисија на холандрични гени

Пример, кај луѓето има еден специфичен тип на влакнатост на уши во вид на издолжен сноп на влакна што се јавува само кај машките единки, *хипертрихоза*.

Се смета дека таа особина е резултат на мутација на генот што се наоѓа на Y - хромозомот.

Кај човекот Y- хромозомот покрај гени за диференцирање на семеници, содржи и гени за манифестирање на специфичен машки антиген за хистокompatibilност, ген кој покажува влијание врз големината на забите, и др.

1.Симболи

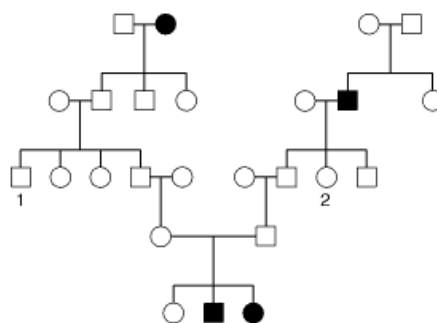
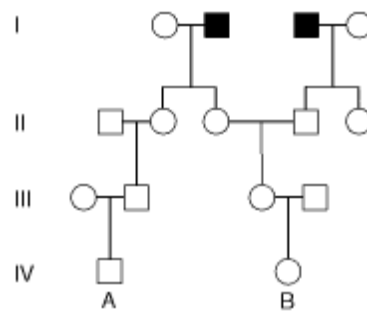
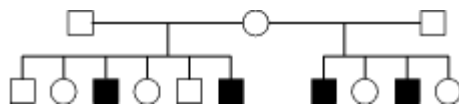
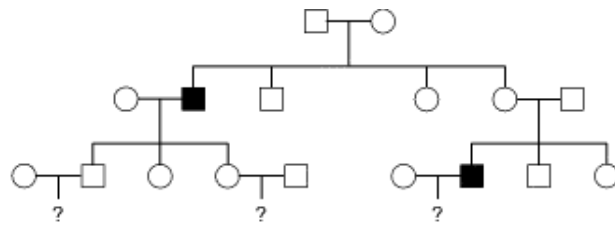
	женски пол		заболена женска индивидуа
	машки пол		заболена машка индивидуа
	брак		пробант
	консангвинитет		хетерозигот за автозомно рецесивни гени
	вонбрачна врска		хетерозигот за полово врзани гени
	родители и потомство		умрени особи (генетски здрави)
	дизиготни близнаци		испитани
	монозиготни близнаци		мртво родени
	абортус		хромозомски нормални
	неможност за потомство		носители на хромозомски балансиран аберации
	неутврден пол		редослед на заболени потомци
	број на потомци по пол		
	бременост		
	усвоен син		

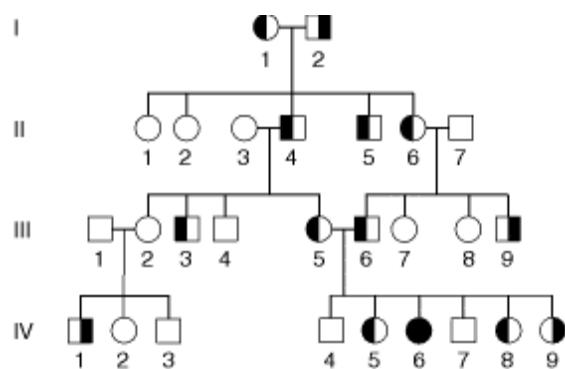
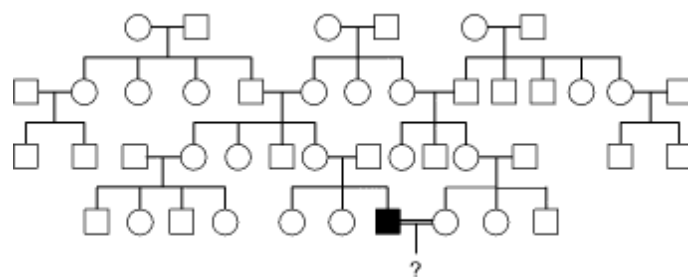
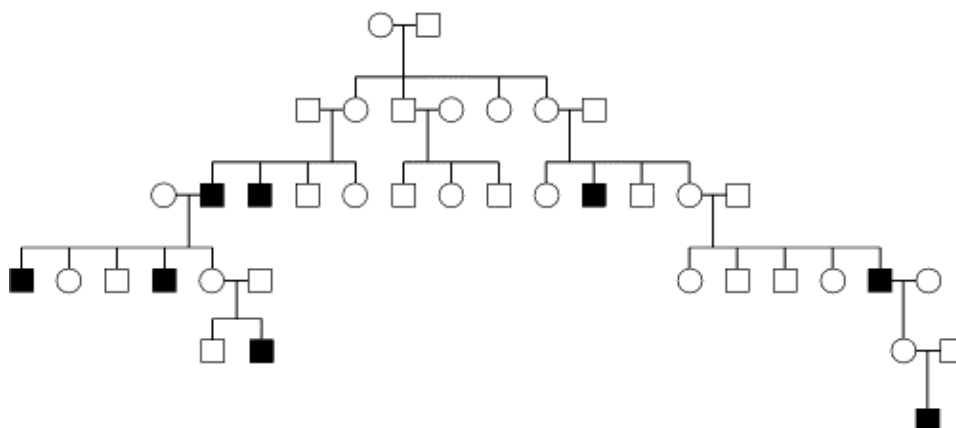
2. Цртање на хередуграми.

3. Анализа на дадени хередуграми и одредување на тип на наследување.

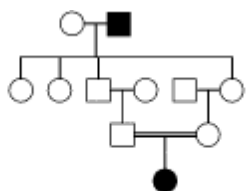
4. Да се формира хередуграм според дадени податоци.

5. Да се формира хередограм според податоците за боја на очи во сопственото семејство.
6. Да се одреди какво наследување е претставено на хередограмите

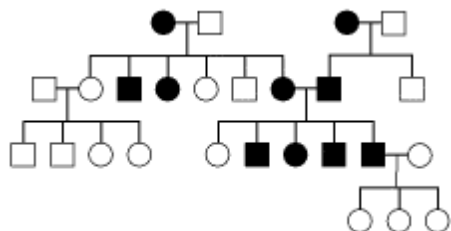




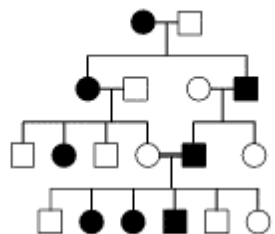
1



2



3



4

