

MANUAL DE PRÀCTIQUES DE GENÈTICA

J. Balanyà
D. Bueno
E. Juan
F. Mestres
M. Papaceit
M. Pascual
M. Riutort
R. Romero

Departament de Genètica
Facultat de Biologia



TEXTOS DOCENTS

337

MANUAL DE PRÀCTIQUES DE GENÈTICA

J. Balanyà
D. Bueno
E. Juan
F. Mestres
M. Papaceit
M. Pascual
M. Riutort
R. Romero

Departament de Genètica
Facultat de Biologia

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



ÍNDEX

PRIMERA SESSIÓ. LA MEIOSI	9
SEGONA SESSIÓ. OBSERVACIÓ DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	15
TERCERA SESSIÓ. EXPERIMENT DE LOCALITZACIÓ	25
QUARTA SESSIÓ	27
Primera part de la sessió. Experiment de localització	27
Segona part de la sessió. Experiment de lligament	27
CINQUENA SESSIÓ	31
Primera part de la sessió. Experiment de lligament	31
Segona part de la sessió. Experiment de localització	31
SISENA SESSIÓ	33
Primera part de la sessió. Experiment de localització	33
Segona part de la sessió. Experiment de lligament	33
Tercera part de la sessió. Cromosomes politènics	33
SETENA SESSIÓ	37
Primera part de la sessió. Experiment de lligament	37
Segona part de la sessió. Experiment de localització	37
VUITENA SESSIÓ. EXPERIMENT DE L·LIGAMENT	39
NOVENA SESSIÓ	41
Primera part de la sessió. Experiment de localització	41
Segona part de la sessió. Experiment de lligament	42
PRÀCTICA INTENSIVA DE LABORATORI	43
HIBRIDACIÓ DE DNA AMB UNA SONDA NO RADIOACTIVA	43
PROTOCOL EXPERIMENTAL DE LA PRÀCTICA	43
Primer dia: hibridació	43
Segon dia: detecció immunoenzimàtica	45

PRIMERA PRÀCTICA D'ORDINADOR. DNA: la molècula mestra	51
SEGONA PRÀCTICA D'ORDINADOR. Explorer Genetics	55
PER A LA VOSTRA SEURETAT	61
BIBLIOGRAFIA	63

ESQUEMA DE LES SESSIONS DE PRÀCTIQUES

<i>Dies</i>		<i>Encreuament localització</i>	<i>Encreuament lligament</i>	<i>Hores</i>
	Meiosi			3
	Observació <i>Drosophila</i>			3
		Encreuar soques paternes		2
		Matar pares	Encreuar soques paternes	2
		Anàlisi F ₁ Encreuar F ₁	Matar pares. Deducció resultats	2
	Cromosomes politènics	Matar pares	Encreuar F ₁	3
		Anàlisi F ₂	Matar pares	3
			Anàlisi F ₂	3
		Discussió	Discussió	3
	Intensives DNA	M5, M6, T6, T7		6
	Ordinador	M3, M4, T4, T5		6
	Intensives DNA	T1		6
	Ordinador	M1, M2, T2, T3		6
	Intensives DNA	M3, M4, T4, T5		6
	Ordinador	M5, M6, T6, T7		6
	Intensives DNA	M1, M2, T2, T3		6
	Ordinador	T1		6

A la primera columna pots apuntar la data en què has de fer cada pràctica.

PRIMERA SESSIÓ. LA MEIOSI

L'objectiu d'aquesta sessió és analitzar i estudiar la meiosi mitjançant l'obtenció de preparacions de cèl·lules que estan en diferents fases d'aquesta divisió cel·lular.

Material

Flors masculines de blat de moro (*Zea mays*) i/o gònades masculines de llagosta (*Locusta migratoria*). Ambdós materials estan fixats en alcohol al 70 %.

Colorants

Carmí acètic per a la meiosi de blat de moro i orceïna acètica al 50 % per a la meiosi de llagosta.

Metodologia per obtenir preparacions de meiosi de blat de moro

Les inflorescències masculines de blat de moro són un material molt idoni per estudiar les diferents fases de la meiosi, tant de la primera divisió com de la segona. En una mateixa inflorescència és possible observar totes les fases, des del leptotè fins als grans de pol·len madurs.

Sobre un portaobjectes, separeu les glumes d'una flor i extraieu-ne les anteres. Afegiu-hi directament unes gotes de carmí acètic (carmí saturat en àcid acètic obtingut escalfant a reflux 0,5 g de carmí en 100 ml d'àcid acètic al 45 % durant 10 min) i trossegeu enèrgicament l'antera amb una

llanceta de ferro per extreure les cèl·lules germinals. El ferro de la llanceta actua com a mordent i facilita la tinció. Quan el colorant canviï de color, cobriu-ho suaument amb el cobreobjectes.

Metodologia per obtenir preparacions de meiosi de llagosta

Cada llagosta mascle té un testicle format per una sèrie de túbuls. Dins de cada túbul hi ha els cists, que contenen cèl·lules en procés de meiosi. Totes les cèl·lules del mateix cist es troben en la mateixa fase de la meiosi, de manera que maduren a la mateixa velocitat. Aquest teixit és un bon material per estudiar l'entrecreuament i els quiasmes en el diplotè i la diacinesi.

En primer lloc, cal fer la dissecció de la llagosta per extreure'n el testicle. Es fa una incisió en forma de *T* per la part dorsal de l'abdomen. Al costat de l'intestí hi ha el testicle, que és una massa de color taronja formada per túbuls. Tenint cura que no s'assequin, es posen dos o tres túbuls en un portaobjectes. S'hi afegeixen dues gotes d'orceïna acètica al 50 % (diluïda amb aigua destil·lada). Es deixa tenyir durant uns 10 minuts. Passat aquest temps, es cobreix la preparació amb un cobreobjectes, tenint cura que no es formin bombolles d'aire, i es fa un *squash*. Si la preparació no queda prou tenyida, s'augmenta la concentració de colorant o bé s'escalfa. En un mateix túbul es poden observar totes les fases de la meiosi.

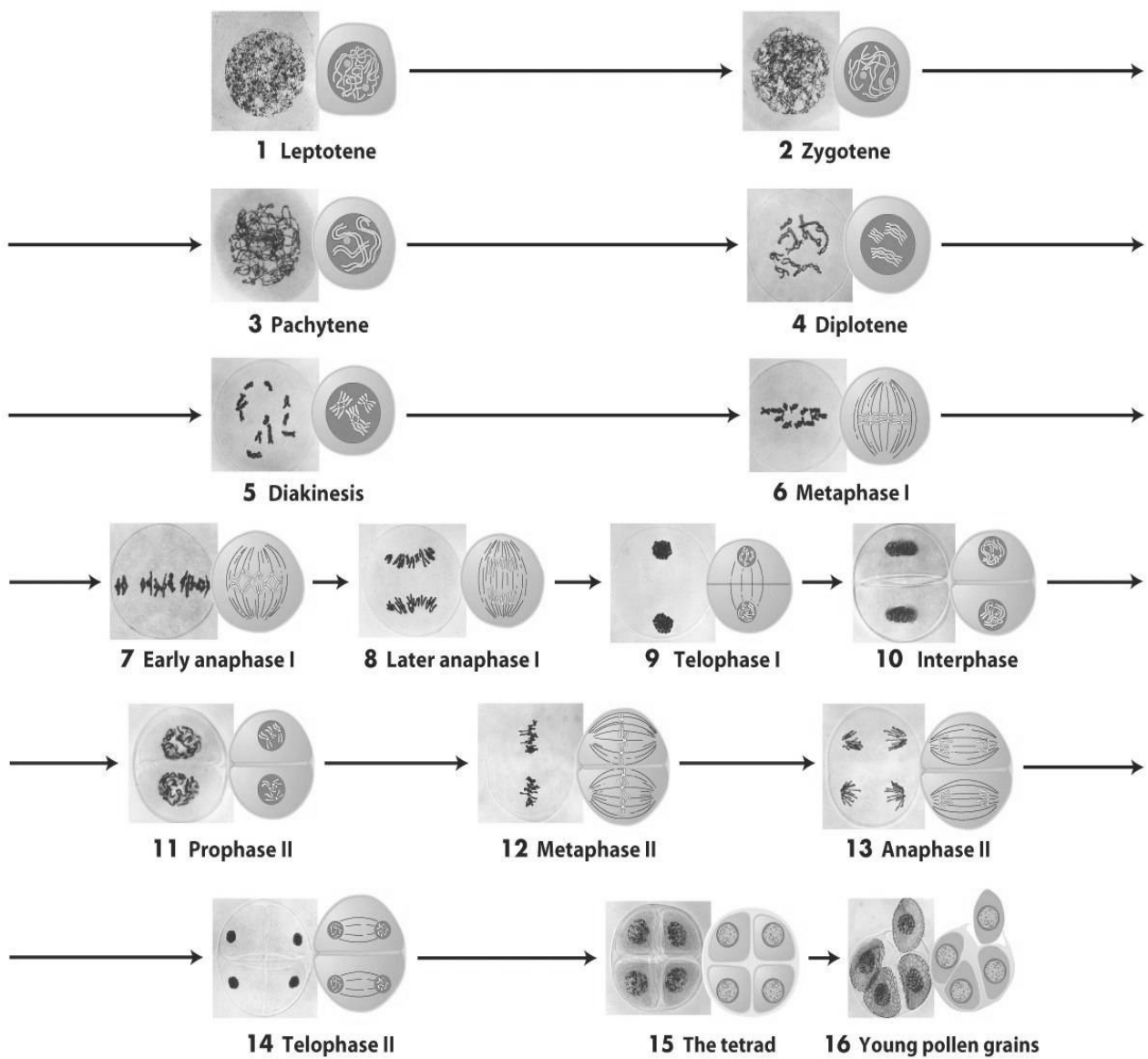


Figura 1. Fases de la meiosi de blat de moro (Pierce, 2005).

Preguntes

Després d'analitzar les preparacions, contesteu les preguntes següents:

1. Feu un dibuix de cada una de les fases o subfases que heu pogut observar. Indiqueu la fase o subfase en qüestió i si es tracta de blat de moro o de llagosta.
2. Heu pogut observar cromòmers? En quina subfase?
3. En quines fases heu pogut observar quiasmes?
4. Quina és la conseqüència genètica dels quiasmes?
5. Heu pogut determinar el nombre de quiasmes d'algun bivalent?
6. Heu pogut comptar el nombre de bivalents en la diacinesi? Quants n'hi havia? El nombre de bivalents representa el nombre diploide de l'espècie?
7. En quina fase de la meiosi té lloc la segregació dels al·lels de cada parella de gens?
8. Descriviu la segona llei de Mendel i indiqueu quina fase de la meiosi en proporciona la base física.

Problemes

1. Una espècie animal que s'autofecunda es caracteritza per tenir $2n=8$ cromosomes. En un individu qualsevol quatre cromosomes són d'origen matern —A1, B1, C1, D1— i els altres quatre són d'origen patern —A2, B2, C2, D2. Els cromosomes A1 i A2 són homòlegs, i així successivament.

- a) Quants tipus diferents de gàmetes es poden formar?
b) Quina és la probabilitat d'obtenir un gàmeta del tipus:

A₁B₁C₁D₁

A₁B₁C₂D₂

A₂B₂C₂D₂

En la fecundació s'uneixen dos gàmetes per formar un zigot diploide

- c) Quants tipus diferents de zigots es poden obtenir
d) Quina és la probabilitat d'obtenir un zigot amb la següent dotació cromosòmica:

A₁A₂B₁B₂C₁C₂D₁D₂

A₁A₁B₁B₁C₁C₁D₁D₁

A₂A₂B₂B₂C₂C₂D₂D₂

2. Un individu heterozigot $a_1a_2 b_1b_2$ pot produir quatre tipus de gàmetes — a_1b_1 , a_1b_2 , a_2b_1 , a_2b_2 — en la mateixa proporció, aproximadament ($a_1a_2 b_1b_2$ són cromosomes homòlegs).

- a) Què t'indica això sobre la separació dels cromosomes a la meiosi?
b) Dibuixa un diagrama amb l'orientació dels dos parells de cromosomes en la placa equatorial de la metafase i que expliqui la formació dels següents gàmetes: a_1b_1 i a_2b_2 ; a_1b_2 i a_2b_1 .

3. Un espermatozoide d'una determinada espècie animal conté 30 picograms de DNA i 10 cromosomes. Completeu la taula inferior indicant la quantitat de DNA en picograms, el nombre de cromosomes i el nombre de bivalents que hi haurà en el nucli de les cèl·lules que es troben en les següents fases:

	<i>Picograms</i>	<i>Cromosomes</i>	<i>Bivalents</i>
Diacinesi			
Metafase I			
Anafase I			
Profase II			
Metafase II			
Anafase II			
Metafase mitòtica			
Anafase mitòtica			
G ₁			

SEGONA SESSIÓ. OBSERVACIÓ DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

L'objectiu d'aquesta sessió és aprendre a treballar amb *Drosophila melanogaster* per poder realitzar diverses pràctiques d'anàlisi genètica. La sessió s'inicia amb la projecció d'un vídeo explicatiu sobre la morfologia i la manipulació de *Drosophila melanogaster*. Tot seguit es passa a la pràctica, per a la qual s'utilitzen una soca de tipus salvatge i diverses soques mutants.

Drosophila melanogaster és una espècie cosmopolita, molt abundant a l'estiu a la nostra latitud. És un bon material per fer estudis genètics, ja que:

1. És abundant a tot el món.
2. Es manté fàcilment al laboratori. És fàcil de manipular i ocupa poc espai.
3. És relativament resistent.
4. Produeix un gran nombre de descendents.
5. En 10 dies es pot tenir una nova generació.
6. Té pocs cromosomes i estan ben estudiats.
7. Té cromosomes politènics que per la seva grandària permeten fer estudis d'estructura, funció i organització cromosòmica, impossibles de dur a terme en els cromosomes normals.
8. S'ha utilitzat per a estudis relatius a l'herència des de 1909. Per aquesta raó, hi ha molta bibliografia sobre aquesta espècie i se n'han descrit molts mutants.
9. Les mutacions són freqüents i són fàcilment induïbles.

Classificació taxonòmica de *Drosophila melanogaster*

Tipus: artròpodes

Classe: insectes

Ordre: dípters

Família: *Drosophilidae*

Gènere: *Drosophila*

Espècie: *Drosophila melanogaster*

Estadis del desenvolupament

Drosophila melanogaster és un insecte holometàbol, és a dir, presenta una metamorfosi completa (figura 2). Els estadis del desenvolupament són:

	20° C	25° C
Ou	8 dies	5 dies
Larva		
Pupa	6 dies	4 dies
Adult		

La duració d'aquests estadis varia segons diferents factors, el més important dels quals és la temperatura. A 25° C, el període ou-larva es redueix a 5 dies i el de pupa, a 4 dies, i s'obté una nova generació en només 10 dies.

Medi de cultiu de *Drosophila*

Se'n coneixen diverses composicions. El que s'utilitza en aquestes pràctiques és el següent:

Aigua	2.200 ml
Farina de blat de moro	285 g
Llevat	83 g
Agar	20 g
Sucre	30 g
Metil-4-hidroxibenzoat (Fluka)	4g/10 ml àcid propiònic

El metil-4-hidroxibenzoat s'utilitza per retardar el creixement dels fongs. S'afegeix després de coure tots els ingredients i quan el medi s'ha refredat a una temperatura aproximada de 75° C.

Diferències morfològiques entre mascles i femelles

- **Mida:** el mascle és, normalment, més petit que la femella.
- **Forma de l'abdomen:** en el mascle, l'abdomen presenta l'extrem arrodonit. La femella té l'abdomen més ovalat i punxegut (figures 3 i 5A).
- **Coloració de l'extrem de l'abdomen:** si mirem les mosques per la part ventral, veurem que el mascle té l'extrem pigmentat. A simple vista es pot veure un punt negre. Les femelles no tenen la part ventral de l'abdomen pigmentada.
- **Genitals:** la diferent pigmentació de mascles i femelles en la part ventral de l'extrem de l'abdomen forma part de les diferències morfològiques dels genitals. En els genitals de la femella es pot apreciar la placa vaginal, i en els del mascle, la diferenciació de l'arc genital, més difícil de veure a causa de la pigmentació (figures 3 i 5A).

- **Les pintes tarsals** o pintes sexuals: són unes estructures que només presenten els mascles en el primer segment tarsal de les potes anteriors (primer parell de potes) (figura 4).

Femelles verges

Les femelles de *Drosophila melanogaster* poden aparellar-se a partir de les 6 hores, aproximadament, d'haver emergit de la coberta pupal. La femella, un cop aparellada, conserva l'esperma del mascle i va fecundant els ous a mesura que els va ponent. Per tant, per fer encreuaments entre diferents soques cal utilitzar femelles que no hagin estat fecundades (femelles verges). Només podem estar segurs que una femella és verge si fa poc que ha sortit de la coberta pupal i, per tant, presenta una aparença fràgil, és poc pigmentada i moltes vegades té les ales encara totalment plegades. En aquesta fase cal tenir una cura especial a no confondre els sexes, ja que els mascles que fa poc temps que han emergit presenten les mateixes característiques morfològiques que les femelles i la menor pigmentació fa que la diferència entre sexes sigui menys aparent. Podeu observar les característiques de les femelles verges a les figures 5B, 5C i 5D.

Soques mutants

En aquesta pràctica analitzarem soques mutants que afecten diverses parts de la morfologia de *Drosophila melanogaster*. Observeu les figures 6 i 7.

Preguntes

Després d'observar les diverses soques, contesteu les preguntes següents:

1. Indiqueu les diferències morfològiques entre cadascuna de les soques mutants i la soca de tipus salvatge. Digueu quin òrgan o part de la mosca afecta cadascuna de les mutacions.
2. Quina característica permet diferenciar millor els mascles de les femelles?
3. Quines característiques indiquen que una femella és verge?

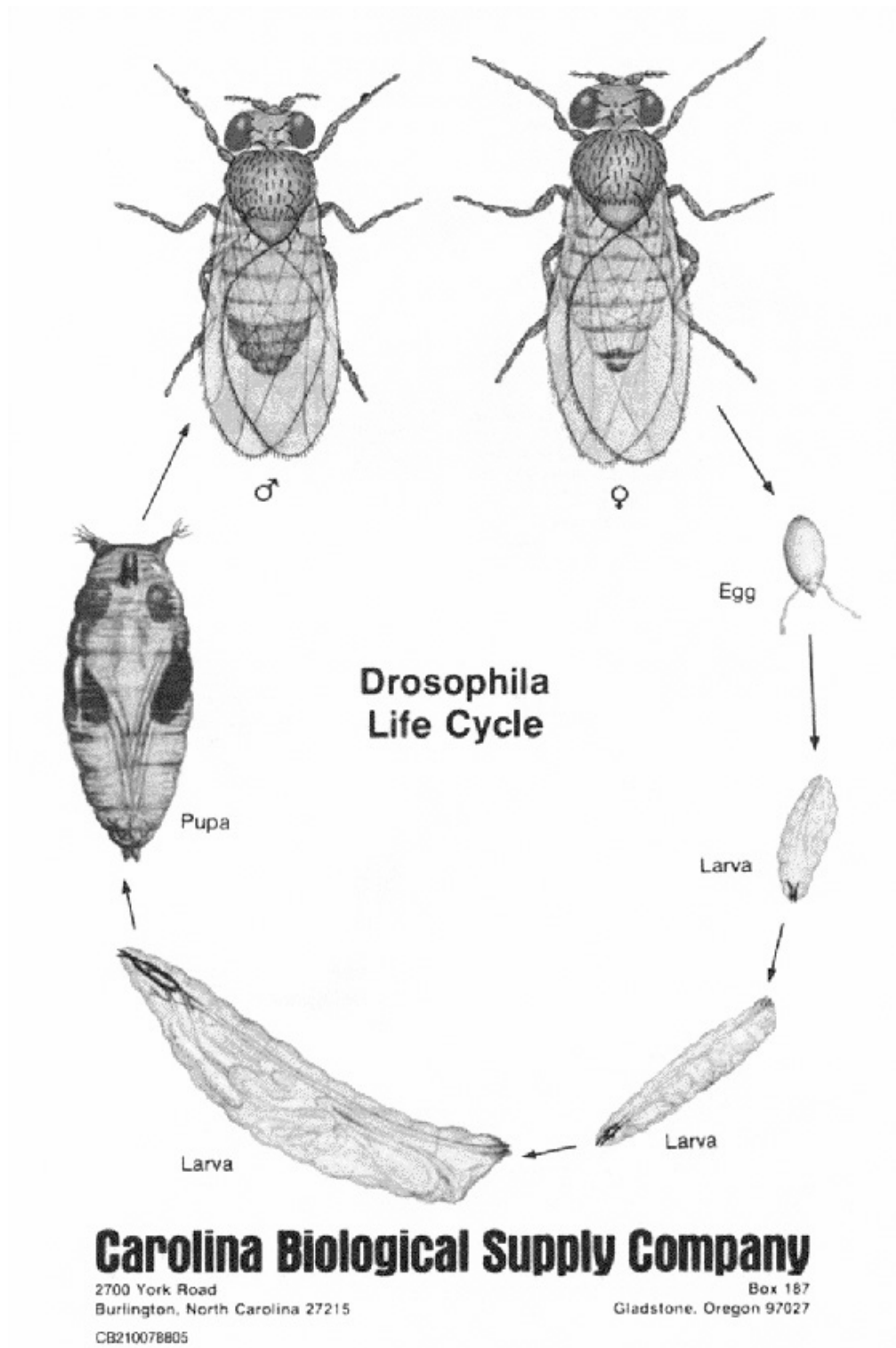


Figura 2. Cicle biològic de *Drosophila melanogaster*.

(https://www2.carolina.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?jdeAddressId=&catalogId=10101&storeId=10151&productId=4224&langId=-1&parent_category_rn=&crumbs=n).