

TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Ü.PAVEL

**PRAKTILISI TÖID
GENEETIKAS**

TARTU 1967

A-28339

NA

TARTU RIHKLIK ÜLIKOOL

GENEETIKA JA DARVINISMI KATEEDER

Ü.PAVEL

**PRAKTILISI TÖID
GENEETIKAS**

TARTU 1967

I. PÄRILIKKUSE MATERIAALSED KANDJAD.

Tänapäeval loetakse DNH üheks põhiliseks karakteristiks nukleotiidset koostist, kusjuures suhet (A+T) : (G+C) võib pidada DNH spetsiifilisuse kvantitatiivseks näitajaks, mis summeerib koostise kõikvõimalikud erinevused. Mikroorganismidel varieerub see näitaja 0,36 - 2,70 piirides. Taksonoomiliselt lähedastel organismidel on spetsiifilisuse koefitsiendi väärtused lähedased.

1. DNH isoleerimine. Baktereid lõhustatakse lüsotsüümiga. Saadud lüsaadile lisatakse võrdne hulk veega küllastatud fenooli (pH 8,3) ja loksutatakse 1 tund. Selle tulemusena DNH ja RNH deproteineeruvad ja lähevad vesifaasi. Fenool eemaldatakse tsentrifugimisega ja veekihist sadestatakse nukleiinhapped 2 - 2,5 mahuosaga etanooliga (temperatuuril - 4° 1 tund). Nukleiinhapete sade eemaldatakse tsentrifugimisega ja sadet ekstraheeritakse etanooli seguga (1 : 1) 1-2 päeva.

RNH ja vabade nukleotiidide kõrvaldamiseks lisatakse 0,5 g nukleiinhappe preparaadi kohta 4 - 5 ml 0,75 N NaOH, segatakse ja hoitakse temperatuuril 37° 18 tundi. (RNH hüdroolüüsib ribonukleotiid-monofosfaatideks). Hüdroolüsaat jahutatakse ja neutraliseeritakse HClO₄-ga lakmuse järgi. Lahusesse jäänud ribonukleotiidid eemaldatakse tsentrifugimise teel. Allesjäänud DNH-sadet pestakse 2 korda normaalse HClO₄-ga (e. 1,06), viimane eemaldatakse etanooli abil kahekordse pesemisega.

DNH sade kuivatatakse vaakuumeksikaatoris, seejärel lahustatakse 8 - 10 ml-s 10%-lises NaCl-lahuses, leelistatakse küllastatud NaHCO₃-lahusega pH 8 - 8,5-ni ja hoitakse 1 tund keeval veevannil. Kuumutamise vältel hoida lahuse

reaktsioon nõrgalt leelisesena. Kuumutamisel deproteineerub DNH lõplikult. DNH-lahus jahutatakse ja sadestunud valgud eemaldatakse tsentrifugimisega. Sadet pestakse kaks korda 10%-lise NaCl-lahusega ja DNH-d sisaldavad tsentrifugaadid ühendatakse. DNH sadestamiseks lisatakse lahusele 3 mahuosa 96%-list etanooli ja jäetakse ööks jääkapi temperatuuril -4° .

DNH sade eemaldatakse tsentrifugimisega, pestakse kaks korda 70%-lise etanooliga soolade eemaldamiseks ja üks kord 96%-lise etanooliga ning kuivatatakse temperatuuril $100-105^{\circ}$ 1-2 tundi.

2. DNH hüdrolyüs ja kromatograafia. Kuiv DNH sade viiakse klaasampulli, lisatakse mõni tilk 72%-list HClO_4 ja hüdrolyüsitakse suletud ampullis keeval veevannil 1 tund. Hüdrolyüsiaadile lisatakse HClO_4 lahjendamiseks mõni tilk bidestilleeritud vett. N-aluste lahutamiseks on sobiv kasutada ühesuunalist laskuvat paberchromatograafiat (paber^x "Aeglane" või Leningradi Nr.2) Kirby süsteemis: CH_3OH - konts. HCl - H_2O vahekorras 7 : 2 : 1. Selleks kantakse eelnevalt 2 N CH_3COOH -ga ja bidestilleeritud veega pestud paberiribale (25 x 40 cm) proovist umbes 20_{μ} l hüdrolyüsiaati. Üks või mitu riba jäetakse kontrolliks. N-aluste lahutamine toatemperatuuril toimub 12-15 tunni kestel. N-aluste asetus kromatogrammil on järgmine (vooluti sisenemisest arvates) :
G, A, C, T.

3. Elueerimine ja spektrofotomeetrimine. Aluste asukohad kromatogrammil avastatakse ultrakemiskooobi abil ja märgitakse tavalise pliiatsiga, lõigatakse välja, tükeldatakse, asetatakse katseklaasidesse ja elueeritakse 5 ml 0,1 N HCl -lahusega temperatuuril 37° 12 tundi. Kontrolliks kasutatakse kontrollribast väljalõigatud paberi eluaati.

^x) Paber tuleb enne pesta 2 N CH_3COOH -lahusega, seejärel destilleeritud veega kuni neutraalse reaktsioonini ja kuivatada toatemperatuuril.

Eluaadid spektrofotomeetritakse järgmiste lainepikkuste juures: G - 250 $\mu\mu$ ja 290 $\mu\mu$, A - 260 $\mu\mu$ ja 290 $\mu\mu$, C - 276 $\mu\mu$ ja 290 $\mu\mu$ ning T - 260 $\mu\mu$ ja 290 $\mu\mu$.

Aluste hulga arvestamiseks kasutatakse järgmisi koefitsiente.

Alus	Aluste hulk μM	5 ml eluaadis
Guaaniin	0,714 x	Δ 250
Adeniin	0,399 x	Δ 260
Tsütosiin	0,940 x	Δ 276
Tümiin	0,743 x	Δ 260

Δ tähistab neeldumise erinevust antud lainepikkuse ja 290 $\mu\mu$ juures. DNH nukleotiidne koostis esitatakse mooliprotsentides.

Tulemuste kontrollimiseks määrata vastavus Chargaffi seadustele (G + T = A + C, A : T = 1, G : C = 1 ning

$$\frac{G + T}{A + C} = 1).$$

II. MIKROORGANISMIDE JA VETIKATE GENEETILINE ANALÜÜS.

Geneetilise analüüsi põhilised meetodid on mutatsiooniline ja hübriidoloogiline meetod. Mutatsiooniline meetod seisneb pärilikkuse uurimises erinevate mutantide võrdlemise teel. Hübriidoloogiline meetod aga põhineb järglaste uurimisel. Mõlemad meetodid on leidnud laialdase rakendamise mikroorganismide pärilikkuse uurimisel. Hübriidoloogiline meetod on kasutatav põhiliselt suguliselt sigivatel organismidel, kuna mutatsioonimeetod on rakendatav ka mittesugulisel teel paljunevate organismide juures.¹

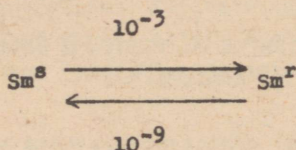
¹ Bakteritel ja viirustel kasutatakse genotüübi määramiseks ka transformatsiooni- ja transduktsiooninähtust ning rekombinatsiooni analüüsi.

A. M u t a t s i o o n i m e e t o d.

Mutatsioon - pärikkuse hüppeline muutumine - toimub geneetilistes struktuurides. Mutatsiooniline muutus on püsiv, kandudes edasi järglastele (muutunud raku järglastel on sama tunnus, mis muteerunud emarakul).

Mutatsioonide tekkimise sagedus looduslikul foonil on küllaltki väike (näiteks 10^{-6} , s.t. üks muutus ühe miljoni raku kohta). Selliseid mutatsioone nimetatakse spontaanseteks. Vastandina spontaansetele mutatsioonidele nimetatakse teatud faktoritega (mitmesugused kiirguse liigid ja teatud keemilised nn. mutageensed ained, nagu H_2O_2 , formaldehüüd, fenoolid, etüleeniimiin jt.) esilekutsutud mutatsioone indutseerituiks. Nende tekkimise sagedus on sadu kuni tuhandeid kordi kõrgem. Nii indutseeritud kui ka spontaansed mutatsioonid põhinevad kaasaegsete vaadete kohaselt raku tuumaaine (täpsemalt DNH) struktuuri muutumisel.

Mutatsioone võib jaotada otse- ja pöördmutatsioonideks (e. reversioonideks). Viimaste sagedus on alati palju väiksem kui esimestel. Näiteks:¹



Mutatsioonide ja mutantide tähistamine. Mutante tähistatakse tavaliselt lookuse lühendatud nimetuse järgi, kasutades kahte-kolme tähte (näiteks arg - arginiin, his - histidiin), lisades kas (+)- või (-)-märgi (ala⁺ = alanini biosünteesivõime, ala⁻ või ala = alanini biosünteesivõimetus). Elutähtsate ainete (vitamiinid, aminohapped, puriinalused jt.) sünteesivõimelisi mutante nimetatakse vastavate ainete suhtes prototroofseteks, sünteesivõimetuid aga auktroof-
¹Sm^S = streptomütsiinitundlik, Sm^R = streptomütsiiniresistentne.

seteks.

1. Mutatsioonide indutseerimine klorellal.

Mutatsioonide esilekutsumiseks (indutseerimiseks) võib kasutada väga mitmesuguseid mutageenseid faktoreid, nagu pehmeid röntgenikiiri või ultraviolettkiirgust. Esimese puhul kasutatakse röntgeniaparati PYM-7 (anoodpinge 40 kV, filter 0,1 mm Al, ekspositsiooni võimsus 8000 r/min), valides ekspositsioonidoosi 40-70 kr piirides, lähtudes aparaadist kiirgavast energiast. Ultraviolettkiirguse allikana võib kasutada kahte lampi BYB-30 (intensiivsus 50 erg/mm²/sek), kiiritades 5 cm kauguselt, või lampi HPK-4, kiiritades 0, 2 ja 4 min.

Klorella (Chlorella vulgaris) kiiritamisel tekivad tumerohelisest metsikust lähtetüvest väga mitmesuguse värvusega mutandid - kollased, helerohelised, salatirohelised jt. Väiksemate kiirgusannuste puhul ilmuvad helerohelised mutandid, suurte annuste korral - pruunid.

Kiirguse mutageenset ja letaalist toimet hinnatakse tekkinud mutatsioonide sageduse ja ellujäänud rakkude arvu järgi. Nii ellujäänud rakkude kui ka indutseeritud mutantide hulka (protsentides) määratakse iga kasutatud kiirgusannuse puhul eraldi.

Katse skeem.

Suspensioon	25 . 10 ⁶ /ml	25 . 10 ⁶ /ml	25 . 10 ⁶ /ml
Kiiritamine	2 min.	4 min.	-
Lahjenduste valmistamine	1 : 2500 1 : 25000	1 : 5000 1 : 25000	1 : 2500 1 : 25000
Külvamine ja inkubeerimine			
Tulemuste analüüs			

Töö käik.

1. Suspensiooni valmistamine. Kahe ööpäeva vanusest kultuurist agarsöötmele valmistatakse suspensioon vees 25 10⁶

rakku ml (Gorjajevi kambris) (rakkude arv 5 suures ruudus).

20

. 10^6 -rakku mlj/ml. Kiiritamiseks valatakse suspensioon 2,5 ml kaupa kaaluklaasidesse ning kaetakse tsellofaaniga.

2. Kiiritatakse 2 ja 5 min. (kontrolli ei kiiritata).

3. Valmistatakse järgmised lahjendused, kasutades iga lahjenduse puhul uut pipetti:

- a) 2 min. - valmistame lahjendused 1 : 50, 1 : 2500 ja 1 : 25000. Katseklaasi võetakse 4,9 ml vett ja lisatakse 0,1 ml suspensiooni (saadakse lahjendus 1 : 50). Sellest võetakse 0,1 ml uude katseklaasi, mis sisaldab 4,9 ml vett ja saadakse lahjendus 1 : 2500. Lahjendust 1 : 2500 lahjendatakse veel 10 korda, võttes 0,5 ml lahjendust 1 : 2500 ja lisades 4,5 ml vett (saadakse lahjendus 1 : 25 000);
- b) 4 min. - valmistatakse lahjendused 1 : 5000 ja 1 : 25000. Tehakse lahjendus 1 : 50, nagu kirjeldatud punktis a, ja lahjendatakse seda 100 korda, viies 0,1 ml lahjendust 1 : 50 9,9 ml vette. Saadakse lahjendus 1 : 5000, mida seejärel lahjendatakse veel 5 korda;
- c) kontroll - tehakse lahjendused 1 : 2500 ja 1 : 25 000, nagu näidatud punktis a. Iga lahjendus (A 0,05 ml) külvatakse 6 FGA-söötmele ja inkubeeritakse vähemalt 6 ööpäeva.

4. Tulemuste analüüs. Määratakse üleelanud rakkude arv ja pigmentmutatsioonide sagedus erinevate ekspositsioonide puhul.

Pigmentmutandid külvatakse ümber (5-6 erinevat mutanti ühte tassi). Selleks suspendeeritakse eraldi mutandid 1 ml vees ja külvatakse 4 tassi. Kaks tassi inkubeerida valges, kaks pimedas (kestusega 5 ööpäeva) ning jälgida mutandi fenotüübi muutumist olenevalt kasvutingimustest.

Näide.

<u>Ekspositsioonidoos</u>	<u>2'</u>	<u>4'</u>	<u>Kontroll</u>
Tassides	264/2
pesi/mutante	194/9
.

Keskmine:	Keskmine:	Keskmine:	

Üleelanud rakkude hulk 1 ml-s määratakse järgmiselt:
raku/ml = $x \cdot 20 \cdot 1$,

kus x tähistab keskmist kolooniate arvu plaadil, 20 - osa milliliitrist (kõlvati 0,05 ml ehk 1/20 ml) ja 1 - lahjenduse astet (näiteks lahjenduse 1 : 5000 puhul 1 = 5000). Analoo­giliselt määratakse ka mutantide arv 1 ml-s.

$$\text{Üleelamise \%} = \frac{\text{kiiritatud suspensioon: rakkude arv 1 ml-s} \cdot 100}{\text{kontrollsuspensioon: rakkude arv 1 ml-s}}$$

$$\text{Mutatsioonisagedus (\%-des)} = \frac{\text{mutantide arv 1 ml-s}}{\text{üleelanud rakkude arv 1 ml-s}} \cdot 100$$

Kui näiteks 0,05 ml lahjendust 1 : 5000 sisaldas keskmiselt 200 vetikat (s.o. plaadil esines 200 kolooniat), siis 1 ml lahjendamata suspensiooni peab sisaldama $200 \cdot 20 \cdot 5000 = 20 \cdot 10^6$ vetikat. Kui plaadil (lahjendus 1 : 5000) esines 1 mutantne koloonia, siis järelikult peab 1 ml suspensioonis olema $1 \cdot 20 \cdot 5000 = 1 \cdot 10^5$ mutanti. Seejuures mutatsioonisagedus %-des = $(1 \cdot 10^5 : 20 \cdot 10^6) \cdot 100 = 0,5\%$.

Saadud andmeid töödeldakse statistiliselt, määrates, kas ekspositsioonidooside efekti erinevus on usaldatav. Selleks võib kasutada kas t -testi või χ^2 -meetodit (vt.pt.V).

Töövahendid ja materjalid.

Petri tassid, katseklaasid, pipetid mahuga 1 ml, pipetid mahuga 5 ml, kaaluklaasid, spaatlid, Gorjajevi loenduskamber, 48 tunni vanune kultuur.

Sõde F G A

Glükoos	20 g/l
KNO ₃	1,44 g/l
KH ₂ PO ₄	156 mg/l
MgSO ₄	100 mg/l
CaSO ₄	10 mg/l
Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	0,02 mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01 mg/l
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,04 mg/l
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	1 mg/l
Na ₃ BO ₃	1,4 mg/l

$(\text{NH}_4)_2 \text{MoO}_4$	0,5 mg/l
FeSO_4	0,013 mg/l
EDTA (etüleendiamiin-tetraatsetaat)	0,05 mg/l
Agar-agar	20 g/l

2. Auksotroofsete mutantide isoleerimine.

Enamik indutseeritud mutantidest on auksotroofsed. Auksotroofseid mutante saab indutseerida nii füüsikaliste kui ka keemiliste mutageensete faktoritega. Moodustunud mutante isoleeritakse selektiivsöötmetel. Viimased kujutavad endast rikastatud söödet, s.t. minimaalsöödet, millele on lisatud:

- 1) 0,3% pärmiekstrakti (täissööde) või
- 2) 0,1% kaseiinihüdrolüsaati + 0,5 mg/l trüptofaani
(= aminohapped),
- 3) mõnda vitamiini (näiteks biotiini),
- 4) 0,1% pärmisüsihappe leelishüdrolüsaati
(lämmastikalused).

Kui näiteks saadud mutant osutub sünteesivõimetuks mõne puriinaluse suhtes (kasvab ainult söötmel 1 ja 4), siis edasiseks uurimiseks tuleb seda külvata selektiivsöötmetele, mis sisaldavad vastavaid puriinaluseid. Samuti võib uurida, millist suhkrut on näiteks vastav mutant võimeline kasutama (selleks külvatakse mutant minimaalsöötmele, mis sisaldab 0,2% vastavat süsivesikut).

E. coli ja mõnede teiste bakterite puhul võib kasutada järgmise koostisega minimaalsöötmeyid:

glükoosi - 1 g/l, K_2HPO_4 - 7 g/l, KH_2PO_4 - 2 g/l,
 Na_3 - tsitraati $\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -
 - 0,1 g/l
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1 g/l, agar-agarit 15 g/l.

Saccharomyces cerevisiae puhul on soovitatav kasutada järgmise koostisega söödet:

glükoosi - 20 g/l, K_2HPO_4 - 2 g/l, $MgSO_4$ - 1 g/l,
 $(NH_4)_2SO_4$ - 1 g/l, biotiini - $2 \mu g$ /l, tiamiini - $200 \mu g$ /l,
ja β -alaniini - $400 mg$ /l (kasvu kiirendamiseks), agar-agarit - 20 g/l.

Tuleb märkida, et ainult osa esialgselt kasvanud kolooniatest kujuneb stabiilseteks mutantideks.

Pärmi auksotroofsete mutantide isoleerimine.

Mutantide saamiseks kiiritatakse 2-3 ööpäeva vanust haploidset Saccharomyces cerevisiae kultuuri ultraviolettkiirtega ja moodustunud auksotroofsete mutantide olemasolu määratakse kindlaks jäljendkülv meetodiga.

Katse käik.

1. 2-3 ööpäeva vanune kultuur uhitakse tardsöötme pinnalt 3-5 ml steriilse kraaniveega ja valmistatakse suspensioon tihedusega ligikaudu $25 \cdot 10^6$ raku/ml (Gorjajevi kambri valemi järgi:

$$\frac{\text{rakkude arv} \cdot 5 \text{ suures ruudus}}{20} \cdot 10^6 = \frac{500}{20} \cdot 10^6).$$

2. a 2 ml suspensiooni kiiritatakse kvartslambiga ПРК - 4 kuni 6 cm kauguselt 2 ja 4 minutit või kahe bakteritsiidse lambiga БУВ- 30 5 cm kauguselt 1 ja 2 minutit.

3. Valmistatakse lahjendused: 0 min. 1:2500 ja 1:25000,
2 min. 1:2500 ja 1:5000,
4 min. 1:500 ja 1:2500.

Lahjendused külvatakse Petri tassidesse a 0,1 ml. Nii ultraviolettkiirtega kiiritamine kui ka kultuuri kasvamine peavad toimuma pimedas, et vältida fotoreaktivatsiooni. Inkubeerida 5 ööpäeva vältel.

4. Auksotroofsete mutantide avastamiseks tuleb teha plaadilt, kus on umbes 100 kolooniat, jäljendkülv minimaalsöötmele. Selleks kasutatakse 10 cm kõrgust ja 7,8 cm läbimõõduga puitsilindrit, millele pingutatakse steriilne samet. Samet (15 x 15 cm) asetatakse puitsilindrile ja pingutatakse metallvõru abil. Jäljendkülv tehakse järgmiselt.

Väljavallitud tass, millest soovitakse teostada jäljendkülv, surutakse vastu puitsilindrit katvat sametit. Viimasega aga puudutatakse söötmete pindu, millele soovitakse teha jäljendkülv. Külvatud söötmeid inkubeeritakse 5 ööpäeva. Täissöötmeel esinevad punased kolooniad (ad⁻) külvatakse aga kohe edasi rikastatud söötmele.

Auksotroofsete mutantide avastamine. Otsitakse välja kolooniad, mis ei kasva minimaalsöötmele.

Töövahendid ja materjalid.

Petri tasse, puitsilindreid ja sametlappe ning söötmeid. Minimaalsööde (vt. lk. 11).

Rikastatud sööde: minimaalsööde, millesse biotiini ja tiamiini asemel on lisatud 1 l söötme kohta 10 ml pärmi autolüsaati.¹

Vedel täissööde: agar-agarita täissööde.

Mutatsioonide indutseerimine bakteritel.

Eri bakteriliikidel on mutantide indutseerimiseks vajalik kiirgusannus erinev. Näiteks on osal bakteritest mutatsioonide tekkimise sagedus suurim, kui ellu jääb 1% kiiritatud baktereid, teistel aga, kui ellu jääb ainult 0,001%.

Bakterite puhul kasutatakse mutantide eraldamiseks ka penitsilliinimeetodit.² Selle meetodi kasutamisel külvatakse kiiritatud bakterid minimaalsöötmele, et eelmiselt söötmele kaasa sattunud ained saaksid ära kasutatud. Edasi külvatakse bakterid penitsilliini sisaldavale minimaalsöötmele, kus penitsilliin hävitab paljunevad prototroofsed bakterid. See tõttu suureneb auksotroofsete mutantide hulk 50 - 100-kordseks.

¹ Võetakse 1 kg pärmi ja 1 l dest.vett ning hoitakse temperatuuril 56° 3 ööpäeva. Tsentrifugeeritakse ja pinnal ujuv vedelik autoklaavatakse 0,5 Atm juures 40 min.

² See meetod on rakendatav penitsilliinitundlike bakterite puhul.

Katse käik:

1. 6 ml E. coli 18 tunni vanust puljongikultuuri pestakse 3 korda fosfaatpuhvriga (tsentrifuugides 3000 t/min.) ja suspendeeritakse 6 ml puhvis. 5 ml suspensiooni kiiritatakse (avatud Petri tassis) 5 cm kanguselt (2 lampi EYB-I2) järgmiselt:

- 1) 16 sek. ($1000 \text{ erg/mm}^2\text{-sek.}$), võetakse 1 ml suspensiooni ja pannakse katseklaasi;
 - 2) 16 sek. ($32 \text{ sek.} = 2000 \text{ erg/mm}^2\text{-sek.}$) - pannakse 1 ml suspensiooni katseklaasi;
 - 3) 16 sek. ($48 \text{ sek.} = 3000 \text{ erg/mm}^2\text{-sek.}$) - pannakse 1 ml suspensiooni katseklaasi,
 - 4) 16 sek. ($64 \text{ sek.} = 4000 \text{ erg/mm}^2\text{-sek.}$) - pannakse 1 ml suspensiooni katseklaasi.
2. Nii kontrollist (kiiritamata suspensioon) kui ka kiiritatud suspensioonidest tehakse 0,1-ml-stes kogustes külvid kahele minimaalsöötmele, et määrata tekkinud mutatsioonide sagedus.
3. Tehakse järgmised lahjendused, et määrata ellujäänud bakterite arv.

Mõjutamine	Lahjendus	Lahjenduste tegemine
Kontroll	10^8	$100 \times 100 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10$
16 sek.	10^7	$100 \times 100 \times 10 \times 10 \times 10$
32 sek.	10^6	$100 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10$
48 sek.	10^5	$100 \times 10 \times 10 \times 10$
64 sek.	10^4	$100 \times 10 \times 10$

Tabelis toodud lahjenduste valmistamine toimub järgmiselt. Näiteks viimases reas on ette nähtud 3 lahjendust. Selleks võetakse 3 katseklaasi - esimeses tehakse 100-, teises 10-, ja kolmandas 10-kordne lahjendus:

Suspensioon 0,1 ml
 ↓
 Katseklaasis oleva 1 ml 1 ml
 9,9 ml 9 ml 9 ml
 puhverlahuse hulk

4. Igast kahest viimasest lahjendusest tehakse kÜlv (0,5 ml) kahele rikastatud söötmega tassile (45° temperatuuriga Hottingeri agar inokuleeritakse ja katseklaasi sisu valatakse Petri tassi) ja inkubeeritakse temperatuuril 37° 24 tundi.
5. Tulemuste analüüs. Määratakse tekkinud mutantide sagedus 10⁸ ellujäänud bakteri kohta erineva kiirgusannusega mõjustatud bakterite suspensioonis.

An- nus	Bakteri- te arv Lah- jen- dus (1 ml)	Elusbakte- rite arv 1 ml kii- ritatud suspen- sioonis	Ellujäänud bakterite arv %-des kontrol- list	Mutanti- de arv tassis (0,1 ml)	Mutantide arv 10 ⁸ ellujäänud bakteri kehta
------------	---	--	--	--	--

Kontroll

10 ⁻⁸	52+48=100	100.10 ⁸ =10 ¹⁰	100	0	0
$\frac{16 \text{ sek.}}{10^{-7}}$	62+38=100	100.10 ⁷ =10 ⁹ . 10		2	20

Järgnevalt joonistatakse kõver, mis iseloomustab üleelamist ja mutatsioonisagedust olenevalt kasutatud kiirguse ekspositsioonideest.

Katseks vajalik materjal.

Puhver: Na₂ HPO₄ - 1,35 g/l
 KH₂PO₄ - 0,42 g/l, pH 7,0

Minimaalsõde

NH₄Cl 5 g/l MgSO₄ . 7 H₂O 0,1 g/l
 NH₄NO₂ 1 g/l Glükoos 1% , pH 7,0

Na_2SO_4	2 g/l
K_2HPO_4	3 g/l
KH_2PO_4	1 g/l

Selektiivsõde.

Minimaalsõutmele lisada 100 $\mu\text{g/ml}$ leutsiini.

Poolvedel agar-agar.

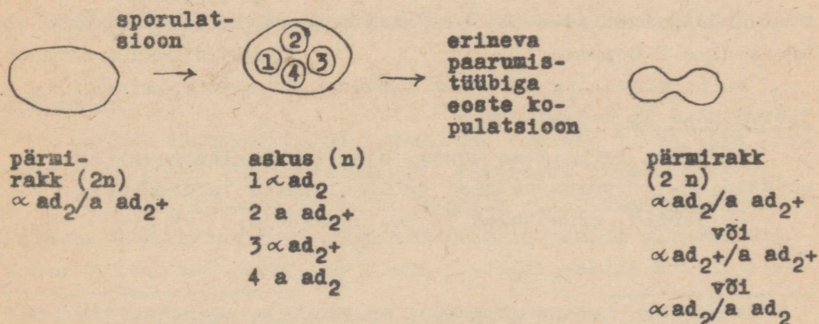
1000 ml Hettingeri puljengit (sisaldab 100 mg amiin - N)
+ 5 g/l NaCl + 0,7% agar-agarit pH 7,0.

B. H ü b r i d o l o o g i l i n e m e e t o d.

Geneetilise analüüsi põhiliseks meetodiks on hübriidoloogiline meetod. See seisneb organismi pärilike omaduste hindamises järglaste välimiku kaudu. Hübriidoloogiline meetod on rakendatav ka suguliselt sigivate mikroorganismide ja vetikate puhul.

Bakteritel moodustuvad rekombinandid ka geneetilise transformatsiooni, transduktsiooni ja konjugatsiooni tulemusena.

Paljudel seentel ja vetikatel haploidsed rakud kopuleeruvad ja moodustavad diploidse organismi. Halbades toitumistingimustes moodustab viimane kas eoseid või gameete:



pärmirakk (2n)
 $\alpha ad_2/a ad_2+$

askus (n)
1 αad_2
2 a ad_2+
3 αad_2+
4 a ad_2

pärmirakk (2n)
 $\alpha ad_2/a ad_2+$
või
 $\alpha ad_2+/a ad_2+$
või
 $\alpha ad_2/a ad_2$

Geen ad_2+ määrab adenini biosünteesivõime, kuna alleelid a ja α paarumistüübi.

1. Hübriidsete pärmseente isoleerimine.

Hübriide on kerge isoleerida, kui kahe auktroofse vanemvormi kopulatsioonil tulemusena moodustub prototroofne hübriid. Seda saab hõlpsasti isoleerida minimaalsõtmel.

Vanemvormidena kasutatakse Sacch. cerevisiae haploidseid rakke. Sobiv on kasutada adeninmutante, mida on hõlpus eraldada punase värvuse tõttu. α $ad_2^- ad_3^+$ ja a $ad_2^+ ad_3^-$ kopulatsioonil moodustub nendest punaste kolooniatena kasvavatest haploidsetest rakkudest hübriid α $ad_2^- ad_3^+ / a$ $ad_2^+ ad_3^-$, mis kasvab valge kolooniana. ad_2 ja ad_3 tähistavad lookusi, mis määravad vastavaid etappe adenini biosünteesis. Sacch. cerevisiae'l on neid seni avastatud 8.

Töö käik.

1. Ristamine. 2-3 ööpäeva vanustest vanemkultuuridest tehakse külvid 0,5 ml vedelasse rikastatud sõõtmesse ja segatakse.¹ Inkubeeritakse temperatuuril 25-30° 1 ööpäev.

2. Hübriidide isoleerimine. Külv tehakse nii agariseeritud minimaal- kui ka rikastatud sõõtmesse (à 2 tassi). Igasse tassi tehakse joonkülvi mõlemast vanemast ja kopuleerunud kultuurist. Inkubeeritakse 5 ööpäeva.

3. Tulemuste hindamine. Hübriidsed rakud, mis kasvavad minimaalsõtmel, külvata edasi atsetaatsõõtmel sporulatsioonil indutseerimiseks (et kindlaks teha diploidsus). Inkubeeritakse 2 ööpäeva.

4. Sporuleeriva hübriidi kultuuri mikroskoopimine.

Töövahendid ja materjalid.

1. Vedel rikastatud sõõde, steriilsed katseklaasid, pipetid, 2-3 ööpäeva vanused vanemkultuurid tard sõõtmel.

2. Tassid, rikastatud ja minimaalsõõde.

¹ Kopulatsioon toimub hõlpsasti keskkonnas, mis sisaldab pärmil autolüsaati, Mg^{++} ja glükoosi.

Minimaalsõde

Glükoos	20 g/l	
K_2HPO_4	2 g/l	
$MgSO_4$	1 g/l	
$(NH_4)_2SO_4$	1 g/l	
Biotiin	2 μ g /l	pH 5
Tiamiin	200 μ g /l	
Agar-agar	20 g/l	

Rikastatud sõde: minimaalsõdtele (biotiini ja tiamiini asemel) lisada pärm autolüsaati 10 ml/l.

Vedel rikastatud sõde: agarita rikastatud sõde.

Atsetaatsõde

Na-atsetaat	10 g/l
KCl	5 g/l
Agar-agar	20 g/l

2. Pärseente lahkemise uurimine.

Uuritakse heterosügootse diploidi haploidset järglas-konda (segregante). Näiteks diploid $ad_2^- ad_2^+ lac^- lac^+$ lahkemise produkte - segregante - võib selekteerida adenii-ni sünteesivõime alusel, kusjuures valitud segregantidel saab määrata laktoosi kääritamise võimet indikaatori (näiteks broomtümoolsinise) abil. Minimaalsõdmel kasvavad $ad_2^+ lac^+$ ja $ad_2^- lac^-$, rikastatud sõdmel aga veel $ad_2^- lac^+$ ja $ad_2^- lac^-$ punaste kolooniatena.

Töö käik.

1. Sporulatsiooni indutseerimine diploidil. Selleks kül-vatakse diploid atsetaatsõdtele. Inkubeeritakse 2 ööpäeva.

2. Eoste saamine ja nende ülekülv rikastatud sõdmele. Kultuur atsetaatsõdmel mikroskoobitakse. Rakud suspendeeri-takse 0,1 ml teo maomahlas¹, mis lõhustab askuse kesta. Inku-

¹ Helix lucorum taurica või H. pomata maomahl lahjendatakse veega 1:10, filtreeritakse läbi asbestfiltri. Säilib temperatuuril 0° kuni 1 aasta.

beeritakse 1 tund¹ temperatuuril 30° ja loksutatakse 1 tund. Suspensioonile lisada 1 ml vett² ja tsentrifuugida poolteist minutit 1000 t/min. Tsentrifugaadist valmistatakse suspensioon tihedusega $2 \cdot 10^6$ eost/ml (Gorjajevi kambris 5 suures ruudus olgu 40 eost). Suspensioonist valmistada lahjendused 1 : 10 ja 1 : 100 ja külvata 0,05 ml kaupa a 5 tassi nii rikastatud söötmele kui ka minimaalsöötmele. Inkubeerida 6 ööpäeva.

3. Segregantide analüüs. ad_2 -mutant kasvab ainult rikastatud söötmel punase kolooniana, ad_2^+ kasvab nii rikastatud kui ka minimaalsöötmel valge kolooniana.

Genotüüp	Rikastatud söötmel	Minimaalsöötmel laktoosiga
ad_2lac^+	punane	ei kasva
ad_2lac^-	pruunikas-punane	" "
$ad_2^+lac^+$	valge	kasvab
$ad_2^+lac^-$	valge	

Näide: 840 kolooniast oli 380 ad_2lac^+ ja 460 ad_2lac^- . Kas saadud suhe erineb oluliselt suhtest 1 : 1? Selleks võrdleme teoreetilisi ja faktilisi andmeid statistiliselt, kasutades kas χ^2 -meetodit või t-testi.

Et $n = 840$, siis teoreetiline suhe peaks olema 420:420. Kasutades χ^2 -testi, saame:

t	q	t - q	$(t - q)^2$	$(t - q)^2 : q$
380	420	40	1600	3,8
460	420	40	1600	3,8

$$\chi^2 = 7,6$$

$d_f = 2 - 1 = 1$. Tabelist selgub, et nullhüpoteesi tõenäosus on $0,1 < p > 0,01$. Seega esineb oluline erinevus teoreeti-

¹ Inkubeerimise aeg oleneb maomahla aktiivsusest.

² Diploidsed rakud võib hävitada etanooliga, lisades seda 1/3 osa ja mõjustades 5-20 min. (mõjustamise aeg peab olema varem kindlaks määratud).

lise ja faktilise suhte vahel, s.t. katse ei kinnita eeldust, et lahknemissuhe on 1 : 1. Tuleb uurida, kas ei ole tegu metoodilise veaga.

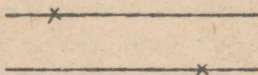
3. Tetraadanalüüs.

Põhjened eoste eemaldamisel mikromanipulaatori abil eeskotist ja isoleeritud eoste jälgimisel. Selleks pannakse söötme ühte mikrotilka askus ja selle kest purustatakse peene nõela abil. Jämeda nõela abil kantakse pool eeskotist üle uude mikrotilka ja poolitatakse samal viisil veelkordselt. Saadud eosed viiakse eraldi tilgakestesse, et saada haploid-
sed kultuurid. Erinevast paarumistüüpi eosest moodustunud rakud võivad kopuleeruda ja moodustada diploidse kultuuri.

Hübridiseerimiseks mikrotilkades olevatele eostele lisatakse teist kultuuri või samast diploidsest kultuurist saadud erinevaid eoseid.

4. Alleelide komplementatsioon.

Alleelide komplementatsiooniks nimetatakse osalist met-siku fenotüübi taastumist, mis kaasneb kahe mutantse alleeli interaktsiooniga (kui muutused asuvad transasendis):

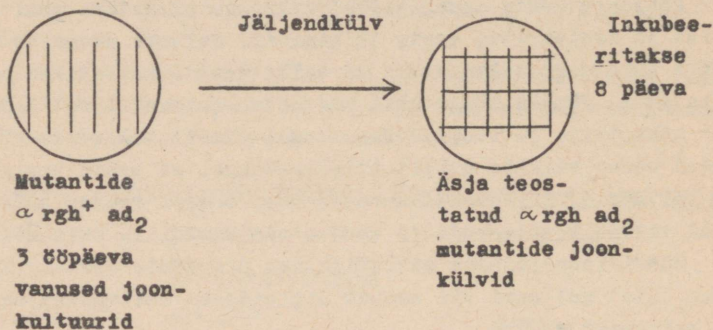


Ristamiseks kasutatakse haploidseid Sacch.cerevisiae ad₂-mutante (punane kolooniavärvus, vajavad adenini, paarumistüüp a), lisamarköörina aga rgh (rough - kare koloonia kuju või rgh⁺ sile koloonia kuju).

Töö käik.

1. 6 erinevat mutanti (a rgh⁺ ad₂) külvatakse joonkülvidena rikastatud söötmega agariplaadile. Mutandid \propto rgh ad₂ külvatakse igaks eraldi längagarile. Inkubeeritakse 2 ööpäeva.

2. Kolmandal päeval valmistatakse α rgh ad_2 mutantide suspensioonid ja külvatakse 5 mutanti joonkülvina ühele minimaalsöötmele tassile. Pärast joonkülvide kuivamist tehakse varem külvatud 6 mutandi kultuurist sameti abil jäljendkülv minimaalsöötmele.



3. Tulemuste registreerimine. Komplementaarsusele viitab kasvu olemasolu joonkülvide ristumiskohal. Lookuse rgh suhtes on heterosügootsed hübriidid (rgh/rgh⁺) sileda kolooniapinnaga.

Näiteks annavad komplementatsiooni järgmised kombinatsioonid:

	1	2	3	4	5
5	+	0	0	0	
4	0	0	+		
3	+	+			
2	+				
1					

Komplementatsioonikaardi koostamiseks tähistatakse mutante joontega (kusjuures joonte projektsioonide kattumine tähistab mittekomplementeerumist):

Katse käik.

1. Vanemkultuuride ettevalmistamine. Kahte 100-ml-sesse kolbi, kus on 10 ml puljongit (LPP), külvatakse eraldi Hfr- ja F⁻-tüve materjali, mida võetakse agarsõetmelt ainult ühest kolooniast. Kolvid asetatakse õks termostaati (37°). Kommi- kul lahjendatakse F⁻-kultuuri ca 5-kordselt (lisatakse 40 ml 37° temperatuuriga LPP), Hfr-kultuuri 10-kordselt (kolvis, kus on 9 ml puljongit temperatuuriga 37°, lisatakse 1 ml õõvanust kultuuri). Kolvid asetatakse Warburgi aparaati ja loksutatakse temperatuuril 37° poolteist kuni kaks tundi.

Kahte tsentrifuugiklaasi viiakse a 7 ml F⁻-bakterite suspensiooni, tsentrifuugitakse 10 minutit 6000 t/min. ja saadud sade resuspendeeritakse 5 ml värskes puljongis.

2. Ristamine. 50-ml-sesse kolbi võetakse 2 ml F⁻-ja 1 ml Hfr-kultuuri ning raputatakse Warburgi aparaadis temperatuuril 37°. Ristamine viiakse läbi neljas kolvis. Lastakse konjugeerida:

1. kolvi 60 min.,
2. kolvi 90 min.,
3. kolvi 120 min.,
4. kolvi 150 min.

3. Määratakse elusate bakterite arv Hfr-kultuuris. Selleks võetakse 6 katseklaasi, kuhu on valatud a 4,5 ml Adamsi sõõdet. Esimesse katseklaasi lisatakse 0,5 ml Hfr-suspensiooni ja tehakse ülekanded 0,5 ml kaupa (saadakse lahjendused: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶). Viimasest lahjendusest (10⁻⁶) võetakse 0,6 ml ja külvatakse 0,1 ml kaupa kuuele agariplaadile (lihapeptonagar).

4. Pärast vastava konjugatsiooniaja möödumist võetakse vastav kolb Warburgi aparaadist ja segakultuur lahjendatakse 4 katseklaasis (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴). Lahjendust 10⁻⁴ külvatakse selektiivsõõtmele (iga sõõdet a 6 tassi). Esimese 3 kolvi puhul on soovitatav teha külv lahjendusest 10⁻³, sest sel ajal ei ole rekombinantide arv veel suur.

5. Lähtekülvide kontrollimise eesmärgil külvatakse konjugeerimiseks võetud vanemvormide suspensioonid enne ristamist

kõikidele selektiivsõõtmetele. F⁻-kultuuri tuleb enne külvi puljongist pesta (tsentrifuugimise teel).

Kõik külvatud plaadid asetatakse termostaati (37°) ja inkubeeritakse 48 t. Seejärel määratakse rekombinantide saadus protsentides ristamiseks võetud elusate Hfr-bakterite arvust.

6. Tulemuste registreerimine plaatidel.

Plaadid	Kolooniad	arg ⁺	his ⁺	ura ⁻	sm ^r
---------	-----------	------------------	------------------	------------------	-----------------

Edasi arvutatakse rekombinantide arv 10⁶ Hfr-bakteri kohta.

Katse skeem:

1. Ettevalmistatud lähtekultuurid	<u>Hfr + F⁻</u>			
2. Konjugeerimine	60	90	120	150 min.
3. Lahjendamine	10 ⁻³		10 ⁻⁴	
4. Külvid	4 6 tassile.			

Töövahendid ja materjalid.

500-ml-ne kolb täissõõtmega, 500-ml-seid kolbe kolme erineva selektiivsõõtmega (HASB, AUSB, HUSB), 1000-ml-ne kolb Adamsi sõõtmega, 1-ml-seid pipette - 20, 10-ml-seid pipette - 2, 5-ml-seid pipette - 2, 50-ml-seid kolbe - 5, 10 katseklaasi, 1 süstal, 10 klaasspaatlit, 90 Petri tassi.

Täissõõde: LPP (lihapeptonpuljong).

Minimaalsõõde (Adamsi sõõde)

NH ₄ Cl	- 1 g/l
KH ₂ PO ₄	- 1,5 g/l
Na ₂ HPO ₄	- 3,5 g/l
MgSO ₄	- 0,1 g/l

Lisatakse 0,2% glükoosi. Tardsõotme saamiseks lisatakse 2% agar-agarit.

Selektiivsõõtmed.

Adamsi tardsõõde, millele on lisatud

- 1) histidiini 100 mg/l+arginiini 100 mg/l+50 μ g/ml streptomütsiini = HASB,
- 2) uratsiili 25 mg/l+arginiini 100 mg/l+streptomütsiini = AUSB,
- 3) histidiini 100 mg/l+uratsiili 25 mg/l+ "-" = HUSB.

6. Geneetiline transduktsioon.

Doonorina kasutatakse E. coli K 12 lac⁺B₁⁻-tüve, retsiipiendina E. coli K 12 lac⁻B₁⁻. Transduktsiooni (lac⁺-segmendi ülekannet) teostab mõõdukas faag. Lac⁺-transduktante loendatakse laktoosiga minimaalsõõtmel.

Katse käik.

1. Faagi saamine.

a. Kultuuride ettevalmistamine. Nii retsiipiendi kui ka doonori õövanused kultuurid P-puljongis (inkubeeritakse tugeval õhustamisel) külvatakse üle 0,1 ml kogustes värskesse P-puljongisse (5 ml) ja inkubeeritakse temperatuuril 37° kaks kuni kaks pool tundi tugeval õhustamisel. Selle tulemusena saadakse kultuurid tihedusega ca 5 · 10⁸ raku milliliitris.

Doonorkultuuris (faagiga nakatatud) hakkab faag vabane-
ma.

b. Faagi allikat (doonorkultuuri lüsaati) hoitakse veevannil. Lüsaat tsentrifuugitakse 4000 t/min. 15 min. jook-
sul ja tsentrifugaadile (lüsaat) lisatakse 0,5 ml kloroformi ning raputatakse. Pärast 30-minutist seismist eemaldatakse kloroform ja suspensioon õhustatakse temperatuuril 37° 30 min., et eemaldada kloroformi jäägid. Lüsaati võib hoida õö otsa külmutuskapis.

Retsipientkultuuridele (5ml) lisatakse enne faagi lisamist $2,5 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2 . Samal ajal hoitakse faagi allikat veevannil. Seejärel nakatatakse kultuurid lüsaadiga (infektsiooni paljusus - bakterite ja faagi suhe - 0,1). Õhustatakse temperatuuril 37°C 3 - 8 tundi, kuni puljong veidi selgineb.

c. Faagi tiitrimine. 0,7%-line P-agar veeldatakse veevannil ja jäetakse 46°C -sesse veevanni. Sõõde valatakse sooja pipetiga 3 ml kaupa katseklaasidesse (veevannil), lisatakse 1-2 tilka indikaatoritüve bakterisuspensiooni. Edasi tehakse lahjendused (faagi tiitri puhul $5 \cdot 10^9$) $100 \times 100 \times 100$ ja külvatakse need 0,1 ja 0,05 ml kaupa tassidele (millel on 1,2%-line P-agar) ning valatakse peale nakatatud agar. 24 tunni inkubeerimise järel võib loendada steriilseid laike.

d. Lüsaadi steriilsuse kontroll. Samaaegselt lüsaadi tiitrimisega külvatakse see nii agarisõõtlele kui ka puljongile (peab olema steriilne, kui ei ole, tuleb lüsaadi töötlemist kloroformiga korrata).

2. Transduktsioon.

a. Faagi adsorbeerimine retsipientbaktereile. Retsipientbakterite kultuuri P-puljongis ($2 \cdot 10^8$ rakku milliliitris) tsentrifuugitakse ja viiakse $1/5$ mahuni CaCl_2 sisaldava puhvriga. Selle suspensiooni 1 ml-le lisatakse 1 ml doonori lüsaati (infektsiooni paljusus olgu 5) ja adsorbeeritakse toatemperatuuril (20°C) 90 min.¹

Kontrollkatsetes lisatakse suspensioonile retsiipiendi lüsaati.

Pärast adsorbeerimist segud tsentrifuugitakse ja sademed suspendeeritakse 0,5% Na-tsitraati sisaldavas puhvril.²

b. Transduktantide isoleerimiseks tehakse mõlemast variandist (nii doonori kui retsiipiendi lüsaadiga adsorbeeritud retsipientrakkude suspensioonid) külv tahkele laktoosi sisaldavale minimaalsõõtlele.

¹ Madal adsorbtsiooni t^o (20°C) blokeerib lüütilist tsükli.

² Tsitraadi lisamine pärsib reinfektsiooni tassil.

Spontaanselt moodustuvate lac⁺-revertantide (pöördmutatsioonide) kindlakstegemiseks retsiptiendi lähtesuspensioonis tehakse viimasest külv samuti laktoosi sisaldavale minimaalsöötmele.

c. Paralleelselt adsorbeerimisega määratakse bakterisuspensioonide tihedus. Pärast adsorptsiooni määrata lüsaadis adsorbeerimata jäänud faagi tiiter. Lahjendused külvata tundlikele bakteritele pehmes agaris. Samuti määrata ellujäänud bakterite arv pärast adsorptsiooni, tehes suspensioonilahjendustest külve söötmele.

d. Tulemuste analüüs. 24-tunnise inkubeerimise järel loendatakse lähtesuspensioonides kolooniate ja ellujäänud bakterite arv. Samuti määratakse faagi tiiter ja adsorbeerunud faagi protsent.

Arvutatakse infektsiooni paljusus.

48 tunni inkubeerimise järel määratakse minimaalsöötmel transduktantide arv ning transduktsiooni sagedus.

Transduktsiooni sagedus = $\frac{\text{faagi tiiter} - \text{mitteadsorb. faagi tiiter}}{\text{transduktantide arv} \cdot 10}$

Märkus: korrutatakse 10-ga sellepärast, et plaadile külvati 0,1 ml.

Sel teel saame teada, kui palju adsorbeerunud faagidest kutsub esile transduktsiooni.

Katse skeem.

1. Kultuuride ja faagi ettevalmistamine.

Dooner- ja retsiipientkultuurid (tihedusega ca 2.10⁹ ml; 0,1 ml lahjendusest 10⁻⁶ kasvab 200 kolooniat).

2. Lüsaadi saamine.

3. Faagi tiitrimine.

Kloroformiga töödeldud suspensioonist valmistatakse lahjendused (0,005/5; 0,05/5; 0,1/5; 0,5/4,5) ja külvatakse indikaatorkultuuri.

4. Faagi adsorbeerimine.

1 ml retsip.-kultuuri 20° - 90 min. 1 ml retsip.-kul-
+ 1 ml dooneri lüsaati tsentrif. + 1 ml retsip.
tüuri
lüsaati

Külvid:

- 1) laktoosiga minimaalsõõtmele transduktantide määramiseks,
- 2) täissõõtmele ellujäänud bakterite määramiseks,
- 3) supernatandi külv indikaatorkultuurile mitteadsorbeerunud faagi tiitri määramiseks.

Indikaatorbakterite valmistamine faagi tiitrimiseks.

Kasvatatakse retsipienttüve puljongis tiitritini 10^9 bakterit milliliitris, tsentrifuugitakse, resuspendeeritakse puhvis (sisaldab CaCl_2), õhustatakse 1 tund temperatuuril 37° . Säilib külmutuskapis kasutamiskõlblikuna mõni päev.

5. Tulemuste analüüs.

Katseks on vajalikud järgmised sõõtmed (koostised antud g-des).

Minimaalsõõde.

NH_4Cl - 5, NH_4NO_3 - 1, Na_2SO_4 - 2, K_2HPO_4 - 3, KH_2PO_4 - 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, agar-agar - 20; pH 7,0.

Glükoosi või laktoosi lisada 0,2 - 1%.

Hottingeri sõõde.

Hottingeri puljong (amiin-N - 100 mg/l, Na_2HPO_4 - 3 g, NaCl - 5 g, agar-agarit - 20 g).

Pärmiekstrakt-puljong (P-puljong) - peptooni 10 g, pärmiekstrakti - 5 g, NaCl - 10 g, glükoosi 1 g; 1N NaOH abil viiakse pH 7-le ning lisatakse CaCl_2 - $2,5 \cdot 10^3$ g.

P-sõõde: pärmiekstrakt-puljong, 1,2% agar-agarit.

Pehme P-sõõde: P-puljong + 0,7% agar-agarit.

Puhver: KH_2PO_4 - 3g, Na_2HPO_4 - 7g, NaCl - 4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2g.

Lisatakse 100 ml puhvri kohta 10 ml 5%-list Na-tsitraati.

7. Geneetiline transformatsioon bakteritel.

1. Kompetentsed rakud. Baktereid kasvatatakse 5-8 tundi, kuna kompetentsed rakud ilmuvad eksponentsiaalse kasvufaasi lõpul. Neid rakke võib ka külmutada, lisades glütseriini. Külmutatuna säilivad rakud transformatsioonivõimelistena üle nädala.

2. DNH. 18 tunni vanuse doonorkultuuri rakud pestakse ja suspendeeritakse puhverlahuses (tsitraadita fosfaatpuhver, vt. lk. 27). Lisatakse lüsotsüümi ja inkubeeritakse temperatuuril 37° seni, kuni suspensioon muutub viskoosseks. Lüsanti loksutatakse veega küllastatud fenooliga (pH 7-8). Tsentri- fuugitakse pool tundi 4000 t/min. Veekihis olev DNH sadestatakse 3 osa metoksüetanooliga. DNH lahustatakse 0,14 M NaCl-lahuses ja määratakse kontsentratsioon (vt. lk. 4).

3. Transformatsioon.

Katse nr.	Bakt. susp. ml	DNH kontsentratsioon			0,14 NaCl	Inkub. temp. 37° 20min.	Tule- mu- sus
		2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,02 µg/ml			
1	0,25	0,25					+
2	0,25		0,25				+
3	0,25			0,25			0
4	0,25				0,25		0
5	-	0,25			0,25		0

Katse 4 näitab, et ilma DNH lisamiseta transformante ei teki. Katsest 5 aga selgub, et DNH-lahus ei sisalda mikroobe, mis meenutaksid transformante.

Katse käik.

Teha DNH lahjendused 0,14M NaCl-is 1 : 10 ja 1 : 100. Samal ajal tuleb külmutatud rakud sulatada. Edasi täita statiivil olevad katseklaasid skeemi kohaselt. Pärast inkubeerimist külvata igast katseklaasist 0,2 ml vastavale selektiiv- söötmele, millel kasvavad ainult transformandid. 48 t.pärast loetakse kasvanud kolooniate arv.

III. HÜBRIDOLOOGILINE ANALÜÜS PUUVILJAKÄRBSEL.

1. Puuviljakärbes kui geneetiline mudelobjekt.

Puuviljakärbsel (Drosophila melanogaster) on järgmised olulised omadused:

- a) lühike arengutsükkel (1 kuuga võib saada 2-3 põlvkonda),
- b) suur sigivus (ühelt paarilt saab 100-175 järglast),
- c) väike kromosoomide arv ($2n - 8$),
- d) geneetiliseks analüüsiks sobivate mutantide suur hulk ja kultiveerimise lihtsus.

2. Puuviljakärbse elutsükkel.

Temperatuuril 25° toimub sügoidi moodustumine ja embrüonaalne areng munakesta all ca 24 - 25 tunni vältel. Munast koorub vastne, kes pärast 4 - 5-päevast kasvamist nukkub. Nukkumine vältab 3 - 4 päeva. Temperatuuril 25° kestab elutsükkel 10 päeva, 20° - 12-15 päeva ja 15° - 18 päeva. Analüüsi kestus lüheneb seega tunduvalt, kui kärbsed kasvatada $24-25^{\circ}$ juures. Liini säilitamiseks on aga soovitatav kasvatada kärbsed temperatuuril 20° .

Muna. Muna on 0,5 mm pikkune ja varustatud kahe jätku-ga, mis aitavad munal söötmel püsida. Munemine toimub kas kohe pärast viljastamist või peetub viljastatud muna emakas kuni embrüonaalse arengu lõpuni.

Vastne. Vastseperiood koosneb 3 staadiumist: esimene ja teine hõlmavad vastse arengut, kolmas lõpeb nukkumisega. 4,5 mm pikkusel vastsel paistavad gonaadid tagumises kehaosas. Seemnesarjad on palju suuremad kui munasarjad. Selle erinevuse järgi võib diferentseerida sugu.

Nukk. Nukkumiseks roomab vastne katseklaasi seinale. Nukus lõhustuvad vastse organid ja moodustuvad valmiku organid. Ainult gonaadid ja närvisüsteem säilivad.

Valmik. Noorel, nukust väljunud kärbsel on tiivad kortsus. Keha on pikk ja läbipaistev. Vanemad kärbsed aga on pig-

menteerunud kehaga. 8 t. pärast koorumist on valmik juba viljastamisvõimeline.

Soo määramine. Emased on veidi suuremad kui isased. Emaste tagakeha ots on terav, isastel ümar. Samuti on isase tagakeha viimased segmendid tugevasti pigmenteerunud. Peale selle on isastel eesjalgade esimesel lülil nn. kamm (kitiinist suguogad). Viimane on hõlpsasti täheldatav binokulaarluubi abil.

3. Söötme valmistamine.

Katseklaaside arv	Vesi ml	Agar g	Presspärm g	Suhkur g	Manna g
50	350	4,5	40	13	13
100	700	9	75	25	25
150	1050	15	115	40	40
200	1400	18	150	50	50

Kaalutakse koostisosad; agar-agarile valatakse vesi ja segamisel soojendatakse kuni agar-agari veeldumiseni (vee keemiseni). Seda on soovitatav teha alumiiniumnõus. Veeldunud agar-agarile lisatakse peenendatud presspärm ja soojendatakse pideval segamisel keemiseni ning keedetakse nõrgal tulel 40 minutit. Auranud vesi asendatakse, lisatakse suhkurning manna ja keedetakse ettevaatlikul kuumutamisel 15 minutit pidevalt segades. Kui sööde on juba veidi jahtunud, villitakse see lehtri abil katseklaasidesse kihina 1-2 cm. Katseklaas suletakse marlitampooniga.

Sööde peab olema sellise konsistentsiga, et ta ei purune ega valgu töötamisel välja.

Söötmele inokuleeritakse pärmi suspensiooni (piimja konsistentsiga), mida võib võtta pintsliga söötme pinnale.

Katses olnud söötmeid saab teistkordselt kasutada pärast 20-minutist autoklaavimist 2,5 Atm juures.

Katseklaaside mõõtmed: \varnothing 2,5 - 2,7 cm; kõrgus 7,5-8 cm.
Sööde säilib toatemperatuuril 2 - 3 päeva.

Märkus: presspärmil pundumisel võib kasutada ka kuivatatud pärmi, arvestades seejuures, et presspärm sisaldab 75% vett.

4. Nõude pesemine.

Kasutatud nõudest eemaldatakse kärbsed ning sõõde valatakse üle veega, lisatakse kaustilist soodat (5%) ja kuumutatakse keemiseni. Edasi pestakse harjaga, loputatakse 2 korda sooja veega ja asetatakse restile kuivama. Kuivatatakse kuivatuskapis temperatuuril 100-120^o 1-2 tundi. Puhtad katseklaasid asetatakse põhjaga ülespoole vastavasse kasti ja kaetakse paberiga.

Puhastamisel kasutatud vahendid tuleb desinfitseerida keeva soodaveega. Marlikorke võib pesta, keetes neid soodalahuses.

5. Kultiveerimiseks vajalik inventar.

1. Nõu eetriga.
2. Narkotiseerimisnõu (kasutada korke, milles on süvend vati jaoks).
3. Mattklaas.
4. Pintsel.
5. Binokulaarluup (10 x ja 20 x) ning tavaline luup 2 x, 4 x.
6. Uuriklaas.
7. Killer-anum (lehtriega nõu, mis on täidetud alkoholi jääkidega).

6. Liini säilitamine.

Liin võib välja langeda hallituse tekkimise tõttu. Hallituse tekkimist välditakse söötme antiseptilise valmistamisega. Kui hallitus siiski tekib, tuleb vastavaid kärbsed iga päeva tagant kanda üle värsketele söötmele, kuni hallitus kaob.

Liini säilitamisel ristatakse kärbsed ainult antud liini piires. Selleks asetatakse katseklaasi kuni 4 emast ja 4 isast. Kui liin on madala viljakusega, tuleb tõsta isaste arvu. Et vältida liini kaotsiminekut, tuleb liini paralleelselt 5 katseklaasis paljundada. Võib kasutada ka piimapudeleid, kuhu võib viia 15 kärbsespaari. Sõõde olgu 1 - 2 päeva vanune (säilitada külmutuskapis).

Esimesed 2 ööpäeva pärast koorumist on emased madala munemisjõudlusega. Viljastatud munade saamiseks on vanematepaari soovitatav vähemalt 4-5 päeva koos hoida. Seejärel eemaldatakse vanemad katseklassist.

7. Kärbeste narkotiseerimine.

Esmalt koputatakse kärbsed peopesal katseklaasi põhja, avatakse ruttu katseklaas, mis järgnevalt asetatakse narkotisaatorile põhjaga ülespoole. Kärbsed raputatakse narkotisaatorisse. Narkotisaator suletakse ja mõjutatakse kärbsed eetriga seni, kuni uinub viimanegi kärbes.

Järgnevalt raputatakse kärbsed mattklaasile ja sorteeritakse binokulaari ja pintseti abil (isased, emased, tumedasilmalised jne.). Kui kärbsed ärkavad enne sorteerimise lõppu, siis asetatakse neile peale Petri tassi kaas, mille põhjale on kinnitatud eetriga niisutatud vatitükk.

8. Kärbeste ülekanndmine.

Katseklassis olevad kärbsed raputatakse põhja ja avatakse nii kärbsed sisaldav kui ka üks tühi katseklaas. Kärbestega katseklaas asetatakse tühjale katseklaasile, raputatakse sellesse kärbsed ja suletakse.

9. Ristamine.

Ristamiskatsetes on oluline, et ristamiseks võetud emane ei ole viljastatud. Selleks tuleb eri sugu isendid eraldada juba vastseperioodil ning pärast koorumist neid kindlasti veel kord kontrollida. Pärast koorumist on juba raskem tagada virgiinsust, sest kärbsed võivad kooruda enne tšööpäeva algust. Sel juhul tuleb korraldada nii, et emased eemaldatakse isastest 6 - 8 tunni jooksul pärast koorumist (emased saavutavad suguküpsuse 6 - 8 tunni vanuselt).

Ristamiseks võetakse ühe liini virgiinsed emased ja pannakse neid teise liini isastega ühte katseklaasi. Vanemaid hoitakse koos 4 - 5 ööpäeva. Seejärel eemaldatakse nad katseklassist. Edasi viiakse läbi koorunud hübriidide analüüs.

10. Monohübridne ristamine.

Tavaliselt valitakse ristamiseks ühe komponendina mutant, keda ristatakse metsiku tüübiga. Selleks valitakse virgiinsed emased. F_1 -põlvkonna järglasi ristatakse omavahel (siin ei ole nõutav emaste virgiinsus). Võib läbi viia ka analüüsiva ristamise. Analüüsitakse F_2 ja F_3 .

Liinidena võib kasutada:

- No 39 cinnabar (cn) - II kromosoom: erepunased silmad;
No 38-a brown (bw) - II kromosoom: pruunid silmad;
No 34 vestigial (vg) - II kromosoom: redutseerunud tiivad;
No 46 ebony (e) - III kromosoom: mustad silmad;
No 43-b curved (c) - III kromosoom: kõverdunud tiivad;
No 70 ja 72 metsik tüüp (+).
No 55 scarlet (st) - III kromosoom: helepunased silmad.

11. Dihübridne ristamine.

Siin kasutatakse kahte liini, mis erinevad eri kromosoomides asuva kahe autosomaalse geeni (näiteks II ja III, III ja IV, II ja IV) poolest.

Näiteks:

No 39	cn	x	No 46	e
	II kr.			III kr.
No 34	vg	x	No 43-b	c
	II kr.			III kr.

F_1 -hübride ristatakse omavahel ja ristamise tulemusi määratakse F_2 -s.

Võib kasutada ka homosügootset liini No 69 cn e, mida võib ristata metsikut tüüpi liiniga.

12. Geenide interaktsioon.

No 38a	bw	x	No 55	(st)
	II kr.			III kr.

Interaktsiooni tulemusena tekib metsikule tüübile omane silmavärvus.

F_2 -s ilmub 4 fenotüüpi:

tumepunaste silmadega	-	$st^+ bw^+$,
erepunaste silmadega	-	$st bw^+$,
pruunide silmadega	-	$st^+ bw$,
valgete silmadega	-	$st bw$.

13. Suguliiteline pärilikkus.

Teostatakse retsiprockne ristamine:

No 12 white (w)	x	No 70 metsik tüüp
No 70 metsik tüüp	x	No 12 (w)

Uuritakse nii F_1 kui ka F_2 .

14. Geenivahetus (crossing over).

1. Emaseks võetakse virgininne trihübridne ($y ct v$) isend liinist No 28 - yellow (y) (sugukromosoomis asuv geen, mis määrab keha kollase värvuse); cut (ct), mis määrab tiiva lõhestatuse; geen vermilion (v), mis määrab erepunase silmavärvuse.

Emane ristatakse metsikut tüüpi isasega. Selle ristamise puhul saab uurida sugukromosoomis toimuvat geenivahetust.

2. Autosomaalset geenivahetust võib uurida, kui võetakse emaseks liin No 36 $b cn vg$ (b = black - must keha, cn - cinnabar - erepunased silmad, vg - vestigial - redutseerunud tiivad) ning ristatakse seda metsikut tüüpi isasega.

Mõlemal juhul tehakse analüüsiv ristamine, ristates F_1 - emast vastavalt $b cn vg$ või $y ct v$ -isasega.

15. Populatsiooni dünaamika uurimine.

Populatsiooni dünaamika uurimisel kasutatakse erilist nn. populatsioonipuuri. See on plastmassist karp, kuhu saab asetada 8 söötmega katseklaasi. Iga 2 päeva järel vahetatakse järgemööda vana katseklaas uuega. Katseklaasis olevad kärbsed ja vastsed uuritakse. Populatsiooni dünaamika uurimisel selgitatakse väga mitmesuguste faktorite mõju populatsiooni geneetilisele struktuurile ja selle dünaamikale (näiteks kahe liini paigutamisel puuri võib jälgida, kumb liinidest võib

hübriididest on vastupidavam, kummas tekib mutatsioonide sagedamini ja milline on populatsiooni lõplik struktuur).

IV. HERNE HÜBRIDOLOOGILINE ANALÜÜS.

Esimene aasta.

1. Kahe hernesordi (roheliste ja siledate seemnetega sort ning kollaste kortsuliste seemnetega sort) seemned külvatakse 15-cm-se vahemaaga. Pärast tõusmete tärkamist mullatakse ja toestatakse. Vegetatsiooniperioodi vältel rohitakse vastavalt vajadusele.

2. Õitsemise algul tuleb õiepungad kastreerida ja tolmeldada teise sordi õietolmuga. Selleks avatakse pintseti abil alles rohelised ja suletud õiepungad ja eemaldatakse tolmukad (sel ajal ei ulatu tolmukad veel emakasuudmeni). Teise sordi õitest võetakse nõela abil õietolm ja kantakse kastreeritud õiepunga emakasuudmete ümber asuvatele kroonlehtedele. Sealt satub tolm õie valmimisel emakasuudmele. Õis vajutatakse uuesti kinni. Õis sulgub nii tihedalt, et isoleerimine on vajalik ainult kuivamise vältimiseks ja putukate eest hoidmiseks. Kastreeritud õiepung varustatakse pergamentpaberist etiketiga, millele on märgitud number ja ristamiskombinatsioon.

3. Kõpsed kaunad eemaldada, asetada kotti ja uurida praktikumis.

Teine aasta.

1. Hübriidsed seemned külvatakse maha ja vegetatsiooniperioodi lõpul eemaldatakse F_1 -taimedelt kaunad. Seejuures asetatakse iga taime kaunad eraldi paberkotti.

2. Praktikumis analüüsida lahknevust.

V. BIOMEETRILISI MEETODEID GENEETILISES ANALÜÜSIS.

Geneetilises analüüsis on põhilisteks biomeetristeks võteteks tunnuse muutlikkuse uurimine populatsioonis, representatiivsuse hindamine, erinevuste statistiline hindamine, faktiliste ja teoreetiliste lahknessuhete võrdlemine, indiviidide vajaliku arvu määramine ning tunnuse päritavuse määramine.

A. Tunnuse muutlikkuse uurimine.

Tunnuse muutlikkuse (mitmekesisuse, varieeruvuse) mõõduks on väljavõtu standardhälve ja dispersioon.

1. Väljavõtu standardhälve:

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}},$$

kui $n > 100$, siis $S \approx \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - \bar{x}^2}$.

x = tunnuse väärtused,

\bar{x} = tunnuse keskmine väärtus,

n = uuritud isendite arv.

2. Väljavõtu dispersioon:

$$S^2 = \pm \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}.$$

B. Representatiivsuse hindamine.

Vastava parameetri tõepärasust hinnatakse selle standardhälbe (vea, eksimuse) kaudu.

1. Aritmeetilise keskmise standardhälve.

$$m_{\bar{x}} = \pm \frac{S}{\sqrt{n}}$$

2. Diferentsi (vahe) standardhälve.

$$m_d = \pm \sqrt{m_1^2 + m_2^2}, \quad \text{kui } n > 30$$

3. Üldkogumi osa vea hindamine:

1) kui üldkogum on teada,

$$\text{osa viga } m_p = \pm \sqrt{\frac{p \cdot (100 - p)}{n}}, \quad \text{kus } p \text{ näitab osa } \%-des,$$

n = väljavõtu suurus;

2) kui üldkogum ei ole teada:

$$m_p = \pm \sqrt{\frac{p \cdot (1 - p)}{n - 1}}, \quad \text{kus } p \text{ on osa väljavõtusagedus} \\ \text{(antud kümnendikena).}$$

3) Usalduspiiride määramine:

a) indiviidi usalduspiirid:

$x \pm t_{0,05} \cdot S$ (95% indiviididest langeb nendesse piiridesse);

b) keskmiste usalduspiirid:

$\bar{x} \pm t_{0,05} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$ ehk $\bar{x} \pm t_{0,05} \cdot m$ (95% sellise suurusega väljavõttude keskmistest asub antud piirides).

C. Erinevuste statistiline hindamine.

Keskmiste vahe (diferentsi, $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) hindamine.

1. Suurte väljavõttude puhul.

$$m_d = S_d = \pm \sqrt{m_1^2 + m_2^2} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2}{n_1 (n_1 - 1)} + \frac{\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_2 (n_2 - 1)}}$$

2. Väikeste väljavõttude puhul.

$$m_d = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} \cdot \frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}$$

3. Vahe olulisuse hindamine t - testiga.

$$t_d = \frac{d}{m_d} > t_{0,05}$$

Näide 1.

Kasahhi tõugu lehmade ($n = 400$) lihakeha keskmine kaal on 150 kg. Kui suur on keskmine viga?

$$m = \frac{S}{n} \quad \text{Edasi määrame} \quad t_{dif} = \frac{\bar{x}}{m_d}$$

$$df = n - 1.$$

Näide 2.

Kahe kalkuniliini lihakeha kaalud on järgmised:

$$n_1 = 20 \quad \bar{x}_1 \pm m_{\bar{x}_1} = 2,0 \pm 0,3 \text{ kg};$$

$$n_2 = 25 \quad \bar{x}_2 \pm m_{\bar{x}_2} = 2,6 \pm 0,4 \text{ kg}.$$

Kas diferents 0,6 kg on oluline?

$$m_d = 0,3^2 + 0,4^2 = 0,5$$

$$\text{Vabadusaste } df = 20 + 25 - 2 = 43, \quad t_d = \frac{0,6}{0,5} = 1,2.$$

Tabelist leiame, et liinide erinevus ei ole oluline. Et kindlaks teha, kas liinid antud tunnuse (lihakeha kaalu) poolest tõepoolest erinevad, tuleb läbi uurida arvukam materjal.

Näide 3.

Kahe liini liha kalorsus on järgmine:

$$n = 3 \quad 1930, 2000 \quad \text{ja} \quad 1911 \text{ kal}$$

$$\bar{x}_1 = 1950;$$

$$n = 2 \quad 1690, 1610 \text{ kal.}$$

$$\bar{x}_2 = 1650.$$

Kas liinid on selle tunnuse poolest erinevad?

$$1) \sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 = (-20)^2 + (59)^2 + (-39)^2 = 5402$$

$$\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2 = (40)^2 + (-40)^2 = 3200$$

$$2) m_d = \pm \sqrt{\frac{5402 + 3200}{3 + 2 - 2} \cdot \frac{2 \cdot 3}{2 + 3}} = \pm \sqrt{\frac{8602 \cdot 2 \cdot 3}{3 \cdot 5}} = 3440 = 58,7$$

$$3) d = 300, \quad m_d = 58,7$$

$$t_d = \frac{300}{58,7} = 5,11 \quad df = 3 + 2 - 2 = 3$$

Tabelist leiame, et $t_{0,95} = 3,18$. Seega liinid on statistiliselt erinevad.

D. Faktiliste ja teoreetiliste lahknemissuhete võrdlemine.

Geneetilistes uurimustes on vaja võrrelda üldkogumit väljavõetuga. Näiteks tuleb kindlaks teha, kas saadud faktiline lahknemissuhe erineb oluliselt teoreetilisest lahknemissuhtest.

Protsentide puhul kasutame teoreetiliste (q) ja täheldatud (t) sageduste hindamiseks järgmist valemit:

$$m_d = \pm \sqrt{\frac{t \cdot (1 - t)}{n}}, \text{ kus } n = \text{väljavõtu suurus, kusjuures } t \text{ on antud kümnendikena.}$$

$$t_d = \frac{d}{m_d}$$

Näide 1. Musta ja valge küüliku ristamisel saadi 28 musta ja 72 valget järglast.

Esimene hüpotees: On tegemist taandristamise suhtega (Aa x aa \longrightarrow 1 Aa + 1aa) 1:1.

	teor.	fakt.
must	Aa 50	72
valge	aa 50	28

$$d = 0,50 - 0,28 = 0,22$$

$$m_d = \pm \sqrt{\frac{0,50 \cdot 0,50}{100}} = 0,05$$

$t_d = 0,22 : 0,05 = 4,4$; näeme tabelist ($df = 1$), et erinevus on oluline.

Teoreetiliste ja faktiliste andmete võrdlemiseks võib kasutada ka χ^2 -meetodit. Viimase puhul tuleb arvutada faktiliste ja teoreetiliste andmete diferents ning saadud diferentsi ruut jagada teoreetilise väärtusega ($d^2 : q$).

Antud näites:

	musti	valgeid
täheldatud (t)	72	28
teoreetiline (q)	50	50
d	22	22
d^2	484	484
$d^2 : q$	9,7	9,7

$$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{q} = 9,7 + 9,7 = 19,4.$$

$df = 2 - 1 = 1$. χ^2 - tabelist leiame, et erinevus on oluline.

Teine hüpotees: Aa x Aa \rightarrow 1 AA : 2 Aa : 1 aa, s.o.
3 A + 1 a

	teor.	fakt.
must	A 75	72
valge	a 25	28

$$d = 0,28 - 0,25 = 0,03;$$

$$m_d = \pm \sqrt{\frac{0,75 \cdot 0,25}{100}} = \sqrt{0,001875} = 0,04$$

$$t_d = \frac{0,03}{0,04} = 0,7.$$

Näeme, et erinevus ei ole oluline, ja seetõttu on hüpotees vastuvõetav.

Näide 2. Erineva karvavärvusega loomade ristamisel saadi 57 musta ja 43 valget järglast. Oletame, et karvavärvus on määratud 2 geeni (A ja B) interaktsiooni poolt:

9 AB : 3 Ab : 3 aB : 1 ab

0,5625 0,1875 0,1875 0,625

56,25% 18,75% 18,75% 6,25%

Mustad: AB = 56,25%; valged 18,75 + 18,75 + 6,25 = 43,75%.

	Musti	Valgeid
t	57	43
q	56	44
d	1	1
d ²	1	1
d ² : q	0,02	0,02
Σ	0,02 + 0,02 = 0,04	df = 2 - 1 = 1

χ^2 - tabelist leiame, et erinevus ei ole oluline.

E. Vajaliku indiviidide arvu määramine.

1. Tõenäosuse määramine, et väljavõttu satub dihübridsest ristamisest kindlasti üks kaksikretsessiiv (F_2 : aabb 1/16 = 0,0625):

$$n_{\text{piisav}} = \frac{\log p}{\log 1-q} = \frac{\log (1-0,999)}{\log (1-0,0625)} = \frac{\log 0,001}{\log 0,9375} =$$

$$= \frac{3,000}{-3} = \frac{-3}{-0,02805} = 107.$$

p = 0-hüpooteesi tõenäosus = 0,999,

q = genotüübi teoreetiline esinemissagedus,

n = vajalik seeria pikkus.

Seega, et leida tõenäosusega 0,999 kindlasti üks kaksikretsessiiv, tuleb võtta järjest 107 indiviidi.

2. Kui palju on võimalikke "tühje võttusid", et mitte saada soovitatavat fenotüüpi?

$$P_{\max} = \frac{t^2}{n + t^2} \quad df = n - 1$$

$$n = 10 \quad df = 9 \quad t_{0,95} = 3,3$$

$$P_{\max} = \frac{3,3^2}{10 + 3,3^2} = 0,52$$

Näiteks tõenäosus, et võtame 10 indiviidi järjest ja ei saa monohübriidse ristamise puhul retsessiivi.

F. Pärivuse määramine.

Mittemendeleeruvate kvantitatiivsete tunnuste edasikandmist järglastele hinnatakse tunnuse päritavuse kaudu. See põhineb tunnuse võrdlemisel sugulastel.

Näiteks: a) vanemate ja järglaste võrdlemine:

$$h^2 = \frac{\text{vanemate tunnus} : 2 - \text{populatsiooni keskmine}}{\text{järglaste keskmine}} ;$$

b) emade ja tütarde võrdlemine ;

$$h^2 = \frac{\text{tütarde keskmine} - \text{populatsiooni keskmine}}{(\text{emade keskmine} - \text{popul. keskmine}) : 2} .$$

VI. HARILIKU MÜÜRLOOGA KULTIVEERIMISE METOODIKA.

Oluliseks takistuseks geneetiliste uurimuste teostamisel kõrgematel taimedel on taime pikk kasvuperiood, samuti taimede kasvutingimuste ebahühtlus. Neist puudusist on vaba harilik müürlook (Arabidopsis thaliana), mis on leidnud viimasel ajal õige laialdast kasutamist katsematerjalina.

Hariliku müürlooga suvised rassid on efemeersed, vegetatiivse perioodiga 28 ja enam päeva. Kuna A. thaliana on isetolmleja, siis on suhteliselt kerge aretada puhtaid liine. Väikesed mõõtmed võimaldavad neid kasvatada ka katseklaasis. Tsütogeneetilisi uurimusi kergendab A. thaliana kromosoomide suhteliselt väike arv ($2n = 10$).

Harilikku müürlooka kasutatakse kõige erinevamate suundadega geneetilistes uurimistöödes. A. thaliana kasvatamine aseptilise kultuurina võimaldab uurida ka mitmesuguste orgaaniliste ainete (näit. glükoos) mõju tema arengule, sest mikroobide toime on välistatud. Geneetilisest aspektist on oluline, et sel taimel on kasvukuhikus ainult 1-3 rakku. Kui tekib mutatsioon sellises üherakulises kasvukuhikus, siis võivad areneda punga kõik rakud olla mutantid. Kunstlikult on saadud mutante röntgenikiirguse toimele. Samuti on indutseeritud biokeemilisi mutante. Kõikides liinides esineb ka spontaanseid mutatsioone.

Harilikku müürlooka on sobiv kasvatada termostaadis või ruumis, mille temperatuur on 25° ja relatiivne niiskus vähemalt 60%. Valgustuse intensiivsus vahetult katseklaasi läheduses peab olema 5000 - 8000 luksit. Valgustamiseks on sobiv kasutada päevavalguslampe AC-30, AC-40. Taimi kasvatatakse katseklaasides (150 x 16 mm), mis on asetatud puustatiividesse nii, et valgus ei pääseks taime juurtele külgelt.

Toitesegu koostis:

- A) KNO_3 - 20 g,
- B) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 3 g,
- C) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 10 g,
- D) K_2HPO_4 - 3 g,
- E) $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 1,4 g,
- F) EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) - 10 g,
- G) Arnoni mikroelementide lahus.

Ained A-st G-ni lahustatakse igaüks eraldi 1 liitris dest. vees. Lahus E ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) valmistatakse vahetult enne kasutamist. Ülejäänud 6 lahust (A-D ja F-G) võib säilitada madalal temperatuuril mitu kuud.

Toitesegu valmistamiseks võetakse 0,6 - 1,5%-line agar-agari lahus, millele lisatakse 1 liitri kohta järgmisi aineid:

50 ml A + 50 ml B + 50 ml C + 50 ml D + 50 ml E +
+ 50 ml F + 1 ml G.

Arnoni mikroelementide lahus:

- HBO_3 - 1,5 g,
- $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,9 g,
- ZnSO_4 - 0,13 g,
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - 0,05 g,
- $(\text{NH}_4)_3\text{MO}_4$ - 0,5 g.

Lahustada 1 liitris vees.

Agar-agari kontsentratsioon peab olema selline, et ta katseklaasi järsul raputamisel laguneks tükkideks. Sellise konsistentsiga agar-agarisse tungivad taime juured kergesti. Samal ajal ei vaju taim ise agar-agari sisse.

Katseklaasi valatakse umbes 5 ml agariseeritud toitesegu. Katseklaas kaetakse tavalise vatiga, kuid mitte nii tihedalt kui mikrobioloogilistes katsetes.

Steriliseerimine. Katseklaasid koos toiteseguga asetatakse autoklaavi 1 Atm rõhu korral 20 min. (0,5 Atm rõhu korral 40 min.).

Seemnete steriliseerimisel kasutatakse 33%-lise H_2O_2 ja 96%-lise etanooli segu (vahekorras 1:1). Steriliseeritakse klaasfiltril nr.3 või nr.4, asetades filtril olevad seemned (esialgu mitte palju!) Petri tassi. Seemnetele valatakse etanoolleetrit ja vajutatakse need külvinõelaga 4 minutiks üleni vedeliku sisse. Seejärel asetatakse filter Petri tassi paksule filterpaberile. Pärast vedeliku lendumist võib alustada külvi.

Kylv. Steriilse külvinõelaga võetakse üks seeme ja asetatakse katseklaasi agar-agar'i pinnale (tuleb hooliga jälgida, et seeme ei satuks täielikult agar-agar'isse. Katseklaasile kirjutatakse tuššiga järgmised andmed: mutandi tähis-tus, taime, millelt seemned saadud ja kuupäev.

Katseklaasid asetatakse idanemise soodustamiseks pärast külvi üheks ööpäevaks külmutuskappi (+5°). Seejärel paigutatakse katseklaasid vastavatesse statiividesse. Hoitakse pimedas kuni roheliste lehtede ilmumiseni (3-4 päeva).

Edasist hoolitsust taime ei vaja, välja arvatud valgus ning temperatuuri- ja niiskusereežiimi säilitamine. Optimaalseks valgustusajaks peetakse 16 t. ööpäevas (8 t. päevas peab olema kaetud). Niiskuse (60 %) säilitamiseks asetatakse statiivide alla veevann. +20° toatemperatuuri puhul on t° katseklaasides ca +25°. Kui toatemperatuur on +25°, siis on võimalik katseklaasides säilitada sama t° ventilatsiooni abil.

Seemnete hoidmine. A. thaliana seemneid hoitakse kalkapaberist pakendis plekk-kastis. Toatingimustes võib seemneid säilitada kuni 3 aastat. Seemneid on soovitatav külvata 2-3 nädalat pärast valmimist.

Fenoloogilised vaatlused. Kogu taime kasvuperioodi vältel märgitakse vastavasse vaatlusvihikusse järgmised andmed.

1. Jrk. nr.
2. Algmaterjali nr.

3. Jaroviseerimine (päevi).
4. T⁰.
5. Valgustus.
6. Toitesegu.
7. Külvi kuupäev.
8. Tõusmete ilmumine.
9. Roseti moodustumine.
10. Pungade teke.
11. Õitsemise algus.
12. Vegetatsiooniperiood (alajaotused).
13. Rosett (kuju: vähelehtine, keskmiselehtine või paljulehtine)
14. Varte arv.
15. Harude arv.
16. Taime kõrgus (cm).
17. Kuparde arv.
18. Tollemistingimused.
19. Viljastumine.
20. Esimene villi.
21. Viimane villi.
22. Karvasus (+++ süsteemis): a) rosetil, b) varrel,
c) õisikul.
23. Vegetatsiooniperioodi pikkus: a) üldine päevade arv,
b) päevade arv kuni õitsemiseni, c) päevade arv kuni
esimese vilja tekkimiseni.

VII. KINGLOOMA PAARUMISTÜÜPIDE MÄÄRAMINE JA KONJUGATSIOONILINE RISTAMINE.

Tuuma ehituse ja sugulise protsessi iseloomu poolest erinevad ripsloomad tunduvalt teistest organismidest. Igas ripsloomas on kaks erinevat tüüpi tuuma - polüploidne vegetatiivne tuum makronukleus (Ma) ja tavaliselt diploidne mikronukleus (Mi), mis etendab juhtivat osa sugulises protsessis.

Ma kuju ja Mi arv on süstemaatilisteks tunnusteks. Tavalisematel laboratoorsesetel liikidel, nagu Paramecium aurelia, on 1 Ma ja 2 Mi-d, P. caudatum'il ja Tetrahymena pyriformis'el 1 Ma ja 1 Mi. Ripsloomadele on iseloomulik suguline protsess - konjugatsioon, mille puhul kahe isendi ajutise ühinemise tulemusena toimub vastastikune tuumaaine vahetus. Peale haploidsete pronukleuste vahetuse võib aset leida ka tsütoplasma vahetus, milline asjaolu võimaldab infusoore edukalt kasutada tuuma ja tsütoplasma vahekorra uurimisel.

Konjugatsioon toimub vaid siis, kui anumasse viidavad rakud on komplementaarse paarumistüübiga.¹ Paarumistüüp on ripsloomadel klonaalseks tunnuseks (on kloonid piirides pärilik). Kogu liik jaguneb geneetiliselt isoleeritud rühmadeks - varieteetideks (süngeenideks). P. aurelia'l ja P. caudatum'il on igas varieteedis 2 paarumistüüpi, T. pyriformis'el on täheldatud süngeenis kuni 7 paarumistüüpi, millest igaks on komplementaarne ülejäänud kuuega, kuid mitte iseendaga. Konjugatsioon esineb varieteedi ulatuses, mistõttu erinevate süngeenide paarumistüüpide vahel tavaliselt konjugatsiooni ei esine. Seega konjugeeruvad omavahel ainult ühe varieteedi komplementaarse paarumistüübiga kloonid (liik jaguneb varieteetideks, viimased omakorda paarumistüüpideks). Seetõttu tuleb esimese ülesandena mää-

¹ Vastandliku "sugupoolega" rakud.

rata paarumistüüp. Kingloomade järglasi uuritakse peamiselt serotüüpide, paarumistüüpide ja mitmesuguste füsioloogiliste tunnuste alusel.

1. Kloonide isoleerimine. Uuritavast proovist võetakse peene pipetiga polüstüroolplaadi õnarusse mõni tilk. Kahele tilgale lisatakse 1 tilk salatileotist. Iga tunni tagant viiakse loomi üle uude õnarusse, kus salatileotise kontsentratsioon kasvab (söötmega harjutamine). Edasi tehakse juba külve salatileotisesse. Sellise harjutamise teel vabanetakse ka teistest algloomadest ja vetikatest.

Edasi pannakse saadud segakultuurist 1 ml söötmesse ainult üks algloom, et saada kloonid.

2. Kultiveerimine salatileotises. 12-16 tundi enne söötme kasutuselevõtmist külvatakse leotisse Aerobacter aerogenes ning inkubeeritakse temperatuuril 30°. Bakteriaalset sööta tuleb anda iga 2-3 päeva tagant. Kultuuri säilitamiseks võib kasutada ka harvemalt söötmist, lisades katseklaasi põhja riisiterakese. Kingloomade kasvule viitab spetsiifilise rõnga moodustumine allpool vedeliku pinda.

3. Kinglooma kloonide paarumistüübi määramine. Et paarumistüüp allub modifikatoorsele muutlikkusele, on tema määramiseks vaja luua standardised tingimused (toit, temperatuur, valgus). Paarumistüübi määramiseks võetakse pipetiga vastavad kloonid (A, B, C ...) ja valatakse toodud skeemi järgi polüstüroolplaadi õnarustesse. Binokulaarmikroskoobi abil jälgitakse aglutinatsiooni tekkimist (kenjugeerivate paaride Kloonid moodustumist).

	A	B	C
A			
B			
C			

Tulemused märgitakse tabelisse ja määratakse kloonide komplementaarsus.

4. Kultuuride ristamine. Üks päev enne ristamist lisatakse ristatavatesse kultuuridesse 2-3 ml salatiletist ja hoitakse pimedas kohas. Ristamiseks valitakse komplementaarse paarumistüübiga kloonid. Ristamist teostatakse väikestes katseklaasides. Ristamiseks võtta 8-10 tilka vastavat kultuuri.

24, 10, 8 ja 5 tundi enne praktikumi algust ühendatakse kaks vastavat (komplementaarse paarumistüübiga) klooni ning jälgitakse konjugatsiooni algust. Konjugeerunud paarid eraldatakse ja alusklaasile asetatud üks tilk konjugante sisaldavat kultuuri värvitakse Dippelli järgi (kultuurile lisada 1 tilk järgmist lahust: 10,5 osa atsetokarmiini, 4,5 osa 45%-list äädikhapet, 2 osa 1N HCl ja 1 osa 1%-list fastgreeni 95%-lises alkoholis). Tsütoplasma värvub rohekassiniseks, vanad Ma-fragmendid pruunikaspunaseks, uued Ma-alged kahvaturheliseks, toitevakueelid erksinakasroheliseks.

Jälgida järgmisi konjugatsioonietappe.

- 1) Mi esimene jagunemine (sirbikujuline profaas, anafaasis on nähtavad kromosoomid).
- 2) Mi teise jagunemise tulemusena tekkinud 4 "kildu".
- 3) "Kildudest" 3 degenereeruvad, kuha neljas teeb läbi kolmanda jagunemise ("lisajagunemine"). Moodustuvad haploidised pronukleused.
- 4) Isaspronukleuste vahetuse tulemusena moodustuvad diploidised sünkaarionid.
- 5) Konjugantide lahkumise.
- 6) Edasi moodustub sünkaarioni jagunedes (3 korda) neli Ma-alget ja Mi.
- 7) Neli Ma-alget ja mitootiliselt jagunenud Mi jaotuvad eks-konjugantide kahe jagunemisprodukti vahel.

Soovitav on valmistada kõigist konjugatsioonietappidest püsipreparaadid Feulgeni järgi.

Töövahendid ja materjalid.

Õnarustega polüstüroolplaadid; 15 cm pikkune kummi-ballooniga pipett läbimõõduga 6 mm (pipetist hävitatakse rakud, hoides seda keeva vee kohal); värvilahused; P. caudatum'i kleonid; binokulaarluup ja mikroskoop; alus- ja katteklasiid; katseklaasid ja mikropipetid.

Salatileetis. Salatilehed kuivatatakse (temperatuuril 100° 6 t.) ning hõõrutakse uhmris peeneks. Leotise valmistamiseks võetakse 0,5 g pulbrit 1,5 l destilleeritud vee kohta ja keedetakse 10 min. Filtreeritakse läbi filterpaberi ning valatakse kolbidesse ja autoklaavitakse.

Heinaleetis (autoklaavitud) on samuti sobiv.

VIII. TAIMEGENEETIKA--ALASED JUHISED.

1. Redis.

Risttolmleva taimena on redis heterosügootne. Redise-sort kujutab endast polümorfset populatsiooni. Populatsiooni polümorfism avaldub selles, et isegi I₈-ndas, (s.o. 8-ndas sisearetuse põlvkonnas) esineb veel lahknemine. Mõnede tunnuste osas lakkab lahkumine juba I₃-ndas, mõningate tunnuste osas, nagu näiteks juurika värvus, see alles I₃-ndas algab.

Sisearetuse teel on võimalik jagada populatsiooni paljudeks liinideks, kusjuures üksikust taimest võib saada mitu liini (näiteks I₃-ndas 18 liini).

Risttolmlevatel, fakultatiivselt risttolmlevatel ja isegi mõnedel isetolmlevatel taimedel (näit. oder) tuleb arvestada geneetilistes uurimistes geneetilist polümorfismi. Isegi sellisel isetolmleval taimel nagu oder, mille sort praktiliselt võrdub puhta liiniga, esineb mõne tunnuse osas spontaanset lahknemist. Seega on geneetilistes katsetes eriti risttolmlevatel taimedel vajalik puhaste liinide olemasolu.

Sisearetusele reageerib redis tugeva depressiooniga, mis avaldub kõigepealt arengu aeglustumises ja häiretes. Eriti ilmuvad muutused kvantitatiivsete tunnuste osas (produktiivsus, fertiilsus). Eri sordid reageerivad intsuhtile erinevalt. Autosteriilsed sordid reageerivad tunduva depressiooniga, kuna autofertiilsetel avaldub depressioon vähemal määral. Mõnest autofertiilsest sordist võib saada koguni liine, mis säilitavad populatsiooni esialgse produktiivsuse isegi I_3 -ndas. Intsuhtliinide ristamisel esineb F_1 -s võrreldes vanemliinidega sageli heteroos. Selektiooni aspektist on perspektiivsed sellised liinid, mis ristamisel annavad populatsiooni taset ületava heteroosi.

Näiteks ristates redise liini "lühikesed ja laiad kroonlehed" liiniga "pikad ja kitsad kroonlehed", saadakse hübriid, mis on tunduvalt suuremate õitega kui kumbki vanematest. Ühelt vanemalt päritakse kroonlehe laius (domineerib kitsalehisuse üle), teiselt aga kroonlehe pikkus (domineerib lühiduse üle). Antud juhul põhineb heteroos komplemентаarsusel.

Heterosügootsuse osa saab näidata, kui ristata erineva homosügootsuse astmega taimi omavahel ($I_1 \times I_2$, $I_1 \times I_3$, $I_3 \times I_5$ jne.). Sel eesmärgil võib kasutada ka erinevatest sortidest (populatsioonidest) pärinevaid liine. Kui liinid on tunduvalt erinevate morfoloogiliste tunnustega (s.o. saadud eri sortidest), siis tavaliselt $I_1^1 \times I_1^2$ annab tugevama heteroosi kui $I_5^1 \times I_5^2$. Sama sordi erineva sisearetusastmega liinide ristamisel (näiteks $I_1 \times I_1$ ja $I_5 \times I_5$) saadud hübriidide heteroosis erinevusi ei pruugi olla.

Polüploidid on saagikamad kui diploidid. Nende indutseerimiseks kasutatakse kolhitsineerimist, immutades (või süstides) kasvukuhikut 0,1 - 0,2 %-lise kolhitsiinilahusega. Töödeldud kasvukuhikust arenenud õied isoleeritakse sisearetuseks. Järgmisel aastal praagitakse (F_2 -s) normaalsete tolmuateradega taimed.

Sisearetus. Intsuhti puhul luuakse tingimused, mis võimaldavad taimel tolmelda ainult oma õietolmuga. Selliste

tingimuste loomiseks isoleeritakse enne õitsemist vastav kogus pungasid. Isoleerimiseks kasutatakse pergamentkotte (mõõtmetega 40 x 10 cm). Ühte kotti asetatakse tavaliselt 20 pungat, mille tipud ei ole veel avanenud. Pungad valitakse mitmelt lähestikku asetsevalt harult ning painutatakse kõik ühe isolaatori alla. Ülejäänud õitsevad ja õitsenud õied eemaldatakse pintsettidega. Samuti eemaldatakse väikesed ja vigastatud pungad ning kõik isolaatorist allpool paiknevad kasvukuhikud.

Isolaator seotakse alt nõõriga kinni, kusjuures sidumiskohal olevate varte ümber mähitakse vatt, et takistada putukate sissetungimist. Isolaatori ülemine ots seotakse taime tugikepi külge. Pungad peavad jääma võimalikult isolaatori alla, et jääks küllaldaselt ruumi kasvuks. Isolaatorile kirjutatakse pliiatsiga järgmised andmed: isolaatori nr., isoleerimise eesmärk, isoleeritud pungade arv, kuupäev.

Paralleelselt eraldatakse samal taimel veel 20 tugevat tervet pungat kontrolliks, mida isolaatoriga ei kaeta. See võimaldab võrdluse teel otsustada taime autofer-tiilsuse üle.

Sügisel koristatakse seemned isolaatorite ja vastavate kontrollide kaupa eraldi. Märgitakse ära koristamise kuupäev ja seemnete arv kõtrades. Järgmisel aastal külvatakse igast isolaatorist saadud seemned eraldi katselappidele.

Ristamise meetodika. Et vältida isetolmlemist, tuleb pungad varakult kastreerida ja eespool kirjeldatud viisil isoleerida. Kastreerimiseks valitakse samuti 20 pungat ühe isolaatori kohta. Pungad peavad olema sellises staadiumis, kus õietolm ei ole veel valminud, s.o. ca 3 päeva enne õie avanemist. Tupplehed painutatakse pintsetiga kõrvale ja tolmuks eemaldatakse, võttes kinni tolmuksitidest, kusjuures ei tohi puudutada emakasuudmeid. Asudes järgmise taime kastreerimisele, tuleb pintsetid piirituse või destilleeritud veega puhastada. Isolaatorile märgitakse kastreeritud pungade arv, kuu-

päev ja taime number. Kastreeritud pungad avanevad kolmandal päeval, mil võib hakata tolmeldama.

Tolm kogutakse "isastaimelt", eemaldades pintseti abil tolmu (vältida tolmuaniidi kaasatulemist!), asetatakse klaaspurgikesse ja lastakse ca 2 tundi päikese käes kuivada. Tolmeldamiseks võetakse prepareerimisnõelaga (mille otsa on kinnitatud kummitükike) tolmu ja kantakse see kastreeritud õie emakasuumetele. Tuleb jälgida, et putukad ei satuks katmata õitele.

Isolaatorile märgitakse ristamise kombinatsioon, õite arv ja kuupäev. Õied kaetakse uuesti isolaatoriga. Seemnete kogumine ja kuivatamine toimub nii sisearetuse kui ka ristamise puhul isolaatoreid eemaldamata.

Kromosoomide loendamine. Kromosoomide loendamiseks valmistatavate ajutiste preparaate eeliseks on nende valmistamise lihtsus ja suur kiirus (umbes 15 min.). Puuduseks on preparaadi vähene säilivus (tavaliselt 1 päevast kuni 1-2 nädalani).

Kogutud materjal (pungad, noored lehed, juuretipmed) fikseeritakse Carnoy fiksaatoris (6 osa 96^o-ist etanooli + 3 osa kloroformi + 1 osa konts. äädikhapet) 40 minutist kuni 2 tunnini sõltuvalt materjalist. Pärast fikseerimist materjal kas värvitakse või säilitamise vajaduse korral asetatakse 70%-lisse etanooli.

Kromosoomide värvimiseks võib kasutada atsetokarmiini või atsetolakmoidi. Värvilahuse valmistamiseks lahustatakse 1 g värvi 100 ml keevas 45%-lises äädikhappes ja lahus filtreeritakse.

Uuriklaasile kantakse 6 tilka värvi ja tilk 1N HCl-i. Uuritav materjal asetatakse segusse ja kuumutatakse piirituslambil umbes 2 minutit. HCl mõjul rakkudevaheline aine lõhustub. Seejärel asetatakse koetükike alusklaasile vee või glütseriini ja äädikhappe segu (1 : 1) tilgasse (viimasel juhul preparaat säilib kauem). Lõpuks kaetakse preparaat katteklasisiga ja muljutakse seda seni, kuni rakud jaotuvad preparaadis ühe kihina.

Redise pungad fikseeritakse 40 min. jooksul ja hoitakse 70%-lises piirituses. Pungadest eraldatakse binokulaarluubi all tolmukad ja kantakse alusklaasil olevasse värvilahuse tilka. Kaetakse katteklaasiga ja kuumutatakse mõni minut. Seejärel surutakse kude laiali ja mikroskoobitakse.

Tomati noori lehti võib kohe, ilma fikseerimata, asetada 30 minutiks värvainesse ja suruda siis alusklaasil laiali. Enne seda tuleb materjali veidi kuumutada.

Kromosoomide vaatlemiseks on vaja leida pungi, kus toimub meioosi esimene jagunemine (s.t. on vaja, et esineks metafasi ekvatoriaalplaadiga rakke, kus kromosoomid asetsevad bivalentidena). Selliste pungade leidmise tõenäosus on redisel 1 : 20. Mikroskoobitakse 900-kordse suurendusega.

2. Aedmaasikas.

Kastreerimine. Kastreerimiseks valitakse ühelt taimelt tavaliselt üks pung (võib olla ka kaks teineteise lähedal asetsevat punga, sest tolmutamise ajaks need kasvavad ja eemalduvad teineteisest küllaldaselt). Väikeste pintsettide abil painutatakse tupplehed väljapoole ja eemaldatakse kroonlehed ning tolmukad. Seejärel lastakse õiele silmapipetiga 2-3 tilka destilleeritud vett. Kastreeritud õie ümber mähitakse vatti.

Tolmu kogumine. Tolmu kogumiseks valitakse välja kõige suuremad õiepungad, mis on juba pooleldi avanenud, ja eemaldatakse need taime küljest. Pungi hoitakse kuni järgmise päevani paberist pakendis (sellele on märgitud andmed taime kohta ja tolmu kogumise kuupäev). Õietolmu eemaldamiseks piisab koputusest pintsetiga vastu punga. Õietolmu sisaldav klaaspurgike kaetakse pealt pergamentpaberiga, millesse tehakse avaus, kust torgatakse läbi prepareerimisnõel, mille otsa on kinnitatud väike tükike kustutuskummi.

Tolmutamine. Tolmutatakse 2-3 päeval pärast kastreerimist. Kastreeritud õielt võetakse vatt ja kontrollitakse, kas õis on normaalselt säilinud. Seejärel võetakse prepa-

reerimisnõelaga tolmu ja puudutatakse sellega paar korda väga ettevaatlikult emakasuudmeid. Pärast tolmutamist kaetakse õis otsekohe uue puhta vatiga. Taime külge kinnitatakse pergamentpaberist etiketike, millele märgitakse lühidalt andmed nii σ - kui ka \varnothing - taime kohta. Tehakse vastav sissekanne ka päevikusse. Vajaduse korral jälgida viljastusprotsessi (24 või 48 tunni pärast eemaldada ristatud õied ja asetada Navašini segusse kuni tsütoloogilise analüüsi tegemiseni).

Tolmuterade analüüs. Uuritava taime õitest raputada tolmalusklaasile ja vaadelda mikroskoobis 400-kordse suurendusega. Joonistusaparaadi abil joonestada tolmuterade piirjooned valgele paberile, seejärel mõõta nende maksimaalne läbimõõt (0,5 mm täpsusega) ja sellega risti olev läbimõõt. Igalt taimelt mõõta ca 25 tolmutera. Tulemuste alusel joonistada graafik, mis iseloomustab taime ploidsust.

Tetraploidide tolmuterad on tunduvalt heterogeensemad kui diploidide omad. Ka on tetraploidide tolmuterade mõõtmed märksa suuremad. Et triploidid moodustavad nii 1n kui ka 2n gameete, siis on nende tolmuterade populatsiooni punktide parv graafikul erinev nii di- kui ka tetraploidide omast.

3. Rukis.

Rukis allub sisearetusele halvasti. Tugev depressioon ilmneb juba I_3 -s. Seepärast kasutatakse nn. mõõdukat intsuhiti (valitakse ühe taime mitu pead). Üksikutel juhtudel on aga õnnestunud luua ka püsivaid fertiilseid intsuhitvorme.

4. Mais.

Et mais on tuultolmleja, siis on liinide saamiseks eriti oluline taimede hoolikas isoleerimine.

Sisearetuse puhul kaetakse nii emas- kui isasõied pergamentpaberist isolaatoriga. Emasõied isoleeritakse siis, kui emakasuudmed on juba lehtede vahelt väljunud. Segavad lehed eemaldatakse. Isasõied isoleeritakse siis, kui pööris on üleni lehetupest vabanenud. Kui tolmuakad on avanenud (seda saab jälgida läbi pergamenti), avatakse isolaator

ülalt ja puistatakse tolm paberkotti. Tolmutamiseks lõigatakse emakasuudmed koos tõlvikut ümbritsevate lehtede tippudega ära. Lõikekohale puistatakse paksult tolmu, seejärel kaetakse kiiresti isolaatoriga, et õhust võõrast tolmu juurde ei satuks.

Ristamist tehakse analoogiliselt eespool kirjeldatuga (vt. lk. 52), ainult selle erinevusega, et tolm kogutakse teiselt liinilt. Liinide ristamisel võetakse tolmu vähemalt kolmelt taimelt.

IX. SELEKTSIOONI ALUSED.

1. Oder.

Põhiliseks eesmärgiks on aretada sorte, mis 1) saagikuselt ületaksid tootmises olevaid sorte, 2) omaksid hea seisukindluse ka kõrgel agrofoonil ja sademeterikkal kasvu-perioodil, 3) oleksid haiguskindlamad ja 4) varavalmivad.

Uute sortide saamiseks kasutatakse nii sortidevahelist kui ka sordi ja hübriidi vahelist ristamist. Sellele järgneb korduv individuaalvalik F_2 -s ja järgmistes põlvkondades.

Aretustöö üldine skeem:

- 1) lähtematerjali kogumine (kollektsiooniaed),
- 2) ristamine (hübriidide kasvatamise aiad),
- 3) kontrollaed,
- 4) eelvõrdlus,
- 5) põhivõrdlus,
- 6) tootmisvõrdlus.

Lähtematerjali kogumine. Kollektiiooniaeda kogutakse perspektiivsemad sordid. Tähtsamateks omadusteks loetakse seisukindlust, saagikust ja varavalmivust. Lähtematerjali hindamine toimub kollektsioonias. Paremateks osu-

tunud sortide edasine hindamine toimub kontrolliaias.

Külvatakse tippimislausa abil teriste kaupa. Kui materjali on vähe, siis külvatakse lappidena peenardele (nii, et taime-de toitepind oleks 5 x 15 cm). Võib kasutada ka ridakatset ja külve 5 m² suuruste lappidena, eriti seisukindluse hinda-misel.

Standardiks valitakse parim rajoonitud sort ja külvatakse 10-20 lapi järel.

Kollektsioonias tehakse fenoloogilisi vaatlusi, hinna-takse kasvukiirust, seisukindlust, vastupidavust haigustele.

Koristatakse sirbi abil või koos juurtega. Pärast peks-mist kuivatatakse terad, tuulatakse, kaalutakse ning määra-takse saak. Saagi struktuuri ja bioloogilise saagi määrami-seks võetakse 10 taime. Määratakse üld- ja produktiivsete võrsete arv, taime peatelje pikkus, pähikute ja terade arv peas ning 1000 tera kaal. Arvutatakse bioloogiline saak ha-lt. Struktuuri analüüs tehakse uue sordi või numbri saa-misel.

Ristamiskomponentide valik ja ristamine. "Emassordina" kasutatakse kõige sagedamini saagikaid, seisukindlaid ja kii-rekasvulisi standardsorte. "Isassortidena" kasutatakse väga erinevate omaduste ja päritoluga sorte.

Ristamine. Otra kastreeritakse sel momendil, kui ohte-tipud ilmuvad lehetupest välja. Enne kastreerimist vabasta-takse pea lehetupest. Seejärel lõigatakse kääridega ära pea ülemine tipp nõrgemini arenenud pähikutega, samuti eemalda-takse 2-3 alumist pähikut. Allesjäänutel lõigatakse ära ohted koos õiesõkalde ülemiste otstega (1/3 ulatuses) ning jäetakse alles ainult keskmise rea pähikud (eriti kuuserealistel). Kastreeritakse kõigepealt ühe külje pähikud suunaga alt üles, seejärel teiselt küljelt. Odrapea hoitakse vasaku käe pöidla ja keskmise sõrme vahel, esimese sõrmeaga surutakse õrnalt õiesõkla tipule, nii et need veidi avaneksid. Pintsett viiakse sõkalde vahele, lükatakse need laiali ning kõrvaldatakse kõik 3 tolmukat. Järgmise kastreerimise eel tuleb pintsetid de-sinfitseerida (varase kastreerimise puhul pole see vajalik).

Järgnevalt kaetakse pea isolaatoriga, millele on märgitud kastreerimise kuupäev ja isolaatori number.

Tolmu ülekanndmine toimub 2-3 päeva pärast kastreerimist, kui emakad on valminud (halva ilma korral 5-6-ndal päeval). Tolmutamiseks kasutatakse terveid tolmukotte, mis on eelnevalt kogutud karbikesse. Igasse emastaimesse õiesse kantakse 1-2 valminud tolmukotti. Kui isastaimi on palju, võib koguda valminud tolmuga päid ja neist tolmukotte otse üle kanda.

Hübriidide alas külvatakse ristatud sortide järglasi (F_1 ja F_2) koos ristamisel kasutatud vanematega (peamiselt emassort) ja standardsordiga. Standard külvatakse 7-15 numbril järel, olenevalt lappide suuruselt.

Aretusaias külvatakse väljavalitud hübriidide seemneid kõrvuti parima rajoonitud sordiga. Külvatakse tippimislauda abil lappidena peenardele (toitepinnaga 5 x 15 cm ühe taime kohta). Fenoloogilisi vaatlusi tehakse nagu kollektsiooni-aiaski. Hinnatakse kasvuaega, seis- ja haiguskindlust ja jälgitakse lahnemist. Koristamisel toimub nende tunnuste alusel halvemate numbrite väljaprakeerimine silma järgi. Aretuse eesmärgile vastavad taimed koristatakse eraldi, hinnatakse saak ja valitakse parimad terised edasikülviks.

Lahnemise korral eraldatakse eliit- ehk valiktaimed. Tavaliselt võetakse eliittaimi F_2 -st sel juhul, kui märgatavat lahnemist ei esine. Kui morfoloogilisi erinevusi F_2 -s ja F_3 -s ei ole, siis ühendatakse teatud arv taimede seemneid ja külvatakse kontrolllaeda, kus neid hinnatakse saagikuse järgi. Parematelt numbritelt võetakse veel kord eliittaimed, et saada stabiilsemaid vorme.

Eliittaimedel eraldatakse terad üksikute taimede kaupa.

Kontrolllaed. Aretusaias parimateks osutunud taimede seemned (numbrid) külvatakse edasi kontrolllaeda. Sõltuvalt seemne hulgast tehakse külv 1-4 korduses. Aretusnumbrid rühmitatakse, kusjuures standardsordi seemned külvatakse iga üheksa numbril kohta. Külvilapi suurus on 5 m², külvi tiheus ca 500 idanevat seemet 1 m² kohta.

Mitmekorduselise külvi puhul rühmitatakse aretusnumbrita lapid ratsukäigu taoliselt.

Kontrollaias tehakse fenoloogilisi vaatlusi, hinnatakse seis- ja haiguskindlust.

Koristatakse hobuviljaniitjaga, vihud seotakse etiketitud vöödega ja asetatakse teivastele kuivama.

Eelvõrdlus. Kontrollaia parimate numbrite seemned külvatatakse eelvõrdluseks 12,5 m² suurustele lappidele (paremad külvatatakse ka aretus- ja kollektsioonisaeda) neljas korduses iga üheksa numbrit kohta üks standard. Külvatatakse markeeritud põllule, käsiplaneediga, reavahedega 12,5 cm. Koristamine, vaatlused ja hindamine toimuvad analoogiliselt vastavatele töödele.

Põhivõrdlus. Parimateks osutunud sortide (numbrita) lõplik hindamine toimub põhivõrdluskatsetes. Kui sordid (numbrita) ka põhivõrdluses on 3 aasta vältel ületanud standardi saagikuse 5% võrra, esitatakse parimad nendest riiklikku sordivõrdluskatsesse.

Kylv, koristamine ja hindamine toimuvad nagu eelvõrdluses, ainult lapi suuruseks on 50 m². Peale saagi hinnatakse põhivõrdluses ka proteiini- ja tärlisesisaldust. Perspektiivsed sordid varustatakse morfoloogilise kirjeldusega ja struktuuri analüüsiga.

Tootmisvõrdlus. Tootmisvõrdlust tehakse kolhoosides või sovhoosides, võttes 1-2 sorti 1-2 korduses (0,5 - 1,0 ha-stel lappidel).

Fenoloogilised vaatlused.

Tärgamine. Tärgamiseks loetakse momenti, millal esimene leht maa peal avaneb, faasi alguseks aega, mil 10%, täielikuks tärgamiseks - 50% taimedest on tärganud. Täielikul tärgamisel on külvi read selgesti näha.

Võrsumine. Võrsumiseks loetakse momenti, millal lehekäenlast ilmub esimene külgvõrse, täielikuks võrsumiseks - mil 50% taimedest on võrsunud (võrsumise algus - 10%).

Kõrsumine. Kõrsumiseks loetakse momenti, kui käega kombates on kõrrel 1,5 - 2 cm kõrgusel maast tunda esimene kõrresõlm. Faasi alguseks loetakse ajamomenti, millal 10% taimedest on kõrsunud; täielikuks kõrsumiseks - kui 50% taimedest on kõrsunud.

Loomine. Loomisjärk algab ohteotste ilmumisega lehetupest, kusjuures lehetupe küljelt on näha osa pead. Märgitakse täielik loomine, s.o. aeg, millal 50% taimedest on alustanud loomist.

Vahaküpsus. Vahaküpsuses on kõrred kollased, läikivad. Ülemised kõrresõlmed on jämedad ja mahlakad, alumised kuivanud ja kiprunud. Lehed ja lehetupp on kollased. Teris muutub kollaseks (kollaseteralistel), sarnanedes konsistentsilt vahaga. Terist on kergesti võimalik küünega lõigata.

Täisküpsus. Täisküpsust märgitakse, kui tera muutub nii kõvaks, et teda pole enam võimalik küünega lõigata ning kõik taime vegetatiivsed osad on kolletanud.

Seisukindluse hindamine. Seisukindluse hindamist tehakse aretustõõ kõikides etappides 1-3 korda. Esimene kord hinnatakse esimesel lamandumisel, teine kord 10 päeva hiljem ja kolmas kord vahetult enne koristamist.

Hindamine toimub silma järgi 5-pallilise süsteemi alusel:

- 5 - täiesti püsti (90°),
- 4 - kõrs vähe kaldu ($60 - 90^{\circ}$) - vähene lamandumine,
- 3 - kõrs poollängus (60°) - keskmine lamandumine,
- 2 - kõrs kolmveerand lüngus ($20 - 40^{\circ}$) - tugev lamandumine (mehhaniseeritud koristamine raskendatud),
- 1 - täiesti lamandunud ($< 20^{\circ}$), ei saa mehhaniseeritult koristada.

Ebaühtlase lamandumise korral hinnatakse üksikute osade seisukindlus ja nende protsentuaalne osa katselapi üldpindalast ning korrutatakse vastav % vastava seisukindlusega. Saadud korrutatud liidetakse ja jagatakse 100-ga, saades keskmise seisukindluse.

Taimehaiguste hindamine. Peamised taimehaigused odral on triiptõbi, nõgipea, kollane ja kõrrerooste ning jahukaste.

Sõltuvalt haiguse iseloomust hinnatakse neid ühel järgnevaist viisidest: 1) hinnatakse haiguse levikut, kusjuures määratakse haigestunud taimede arv või nende alla kuuluv pindala %des (näit. nõgipea puhul), 2) hinnatakse haiguse intensiivsust vastavate skaalade järgi taimede haigestunud organite või lehepinna suuruse arvestamisega.

2. Rukis.

Rukki selektsioonis on järgmised põhilised etapid:

- 1) aretusaad - materjali kasvatamine valikuks (taime valikul jälgitakse, et umbes 45 väljavalitud kõrt oleksid ühepikkused ja hea produktiivsusega);
- 2) valikaed - materjal külvatakse peredena (s.o. ühe taime terad). Antakse hinnang peredele, pidades silmas eriti talvekindlust ja produktiivsust;
- 3) seemneaed - külvatakse valikalist väljavalitud paremad pered.

3. Lina.

Põhiliselt aretatakse meil kiulina. Eesmärgiks on vara-valmivus, kiu hulk ja kvaliteet (pikkus), seisukindlus ja saagikus. Kasutatakse ristamist sellele järgneva valikuga, samuti korduvat ristamist.

Näiteks ristatakse õlilina ja kiulina. F_2 -st valitakse pika kiuga (kõrge) ja suure seemnesaagiga vormid.

Sageli esineb lahknemine juba F_1 -s, sest vanemad võivad olla hübriidid. Heteroosi linal peaaegu ei esine. F_1 on tavaliselt vahepealsete omadustega (sinise õiega x valge õiega \rightarrow helesinise õiega).

4. Kõõgiviljad.

Aretuse eesmärgiks pole üksnes produktiivsuse tõstmine, vaid ka sortide kvaliteedi parandamine. Suurt tähelepanu pööratakse aretatavate sortide haiguskindlusele.

Rist- ja isetolmlevatel taimedel on aretustöö mõnevõrra erinev. Varavalmivuse saavutamiseks ristatakse varaseid sorte, silmas pidades ka saagikust ja kvaliteeti. F_1 saadakse tavaliselt vahepealsete omadustega, F_2 -s aga esineb lahkemine nii emas- kui isasvormi suunas. Paremate taimede osas tehakse valikut seni, kuni nad saavutavad konstantsuse (puhas "liin" e. number). Numbreid võrreldakse kõikide näitajate alusel. Kui mõni number ületab märgatavalt olemasolevaid sorte mõne või mitme tunnuse poolest, siis eraldatakse see riiklikku sordivõrdluse katsepunkti, kus teda kontrollitakse 3-4 aasta jooksul. Kui sordi head omadused jäävad püsima, siis sort rajoonitakse.

Üldine skeem.

1. Pärast ristamist külvatakse valikaeda, kus valitakse välja üksikud taimed (supereliit).
2. Supereliitseeme külvatakse ja sellest saadakse eliitseeme. Eliitseemnega külvatud põllult valitakse igal aastal 10% kõige paremaid taimi.
3. Eliitseeme jaotatakse rajoonitud sortide puhul seemnekasvatussovhooside ja -kolhooside vahel, kus toimub paljundamine.

Risttolmlejate puhul (redis, kaalikas, kapsas, porgand jt.) tehakse selektsiooni järgmiselt.

1. Populatsioonist tehakse koguvalik (igal aastal valitakse eliidipõllult juurviljade puhul juurika kuju ja kvaliteedi järgi parimad, tüüpilisemad taimed).
2. Viiakse läbi kahe sordi vabaristamine, selleks kasvatatakse neid kõrvuti lappidel. F_1 -st valitakse parimad taimed. Nende järglastest teostatakse jällegi valikut.

X. ÜLESANDED.

1. Lammastel domineerib valge villavärvus musta üle. Kui kogu kari (mitusada looma) on valge ja ainult 2% on heterosügoodid (b+), kas siis karjas võib ilmuda ka mõni must lammas?

2. Lammastel on nudipäisust põhjustav mutantne alleel dominantne (S), kuna jäärjal on see retsessiivne (s). Esita lahknemissuhted!

3. Andaluusia kanadel esineb mittetäieliku domineerimisega geen, mis määrab sulestiku värvuse: BB - must, bb - valge, Bb - sinakas. Millised on järglased, kui Bb-kanu ristata erineva genotüübiga kukkedega (BB, Bb ja bb)?

4. Pruun isarott ristati kahe musta emarotiga. Esimene emarott tõi 9 musta ja 7 pruuni poega, teine aga 17 musta poega. Millised on vanemate genotüübid?

5. Punaseõielise kõrgekasvulise taimesordi (liini) ristamisel kääbuskasvulise punaseõielise sordiga moodustub 58 kõrgekasvulist ja 49 kääbuskasvulist taime. Millised on vanemate genotüübid?

6. Kanadel domineerib rooshari (R) lihtharja üle. Farmis on roosharjaga kanad. Kuidas kindlaks teha, kas nende seas on ka heterosügoote?

7. Hobustel domineerib must karvavärvus (B) raudja (kastanpruuni (b) üle, traav (T - jalad liiguvad diagonaalsete paaridena) - küliskäigu (t - jalad liiguvad lateraalsete paaridena) üle. Kui musta traavlit ristata raudja küliskäiguga, millised on järglased?

8. Šorthorni tõugu veistel domineerib punane karvavärvus (R) valge (r) üle. Heterosügoot (Rr) aga on luitunud punase karvavärvusega. Milline on tõenäosus, et luitunud värvusega loomade ristamisel ilmuvad luitunud värvusega järglased?

9. Kui ristati käharakarvalisi merisigu siledakarvalistega, saadi 8 käharakarvalist ja 7 siledakarvalist järglast. Millised on vanemate ja järglaste genotüübid?

10. Veistel domineerib nudipäisus (N) sarvilise vormi (n) üle. Nudipäise pulliga paaritati kolme lehma. Üks sünnitas nudipäise vasika, kaks - sarvilised kaksikud. Millised on vanemate genotüübid?

11. Kui ristati valgete viljadega kõrvitsat roheliste viljadega kõrvitsaga, saadi pooled valged ja pooled rohelised viljad. Millised on vanemate genotüübid?

12. Valgete kettakujuliste viljadega kõrvitsa ristamisel roheliste kerakujuliste viljadega kõrvitsaga moodustub valgeid kettakujulisi ja rohelisi kerakujulisi vilju enam-vähem ühepalju. Millised on vanemate genotüübid, kui valgete kettakujuliste viljadega kõrvits annab omasugusega ristamisel $3/4$ valgeid kettakujulisi ja $1/4$ rohelisi kerakujulisi vilju?

13. Määrata vanemate genotüübid, kui valgete kettakujuliste viljadega kõrvits annab valgete kerakujuliste viljadega kõrvitsaga ristamisel 28 valgeid kettakujulisi, 9 valgeid kerakujulisi, 10 rohelisi kettakujulisi ja 3 rohelisi kerakujulisi vilju moodustavat järglast.

14. Käharakarvalise musta (KM) merisea ristamisel käharakarvalise valge (Km) meriseaga saadi 28 käharakarvalist musta, 31 käharakarvalist valget, 11 siledakarvalist musta ja 9 siledakarvalist valget järglast. Millised on vanemate genotüübid?

15. Okasõunal domineerib õiekrooni purpurne värvus (P) valge (p) üle, okkalised seemnekarbid (O) domineerivad siledade (o) üle. Kui purpurset siledat taime ristati valge okkalise taimega saadi 320 purpurset okkalist ja 312 purpurset siledat taime. Milline on F_2 struktuur?

16. Koertel domineerib must värvus pruuni üle, lühike karv pika üle. Kui ristati pruuni lühikarvalist emakoera musta lühikarvalise isakoeraga, saadi üks musta- ja pikakarvaline ning üks pruuni- ja lühikarvaline kutsikas. Sama emakoera ja musta lühikarvalise isakoera ristamisel saadi 7 musta

lühikarvalist kutsikat. Millised on vanemate genotüübid?

17. Uttedel domineerib villa valge värvus musta üle ning jääradel sarvilisus nudisuse üle. Millised on järglased homosügootsete loomade ristamisel?

18. Nudipäised valged uted paaritati sarvilise musta jääraga. Sündinud talledest olid pooled jäärad, pooled uted. Jääradest $1/4$ olid valged sarvilised, $1/4$ mustad sarvilised, $1/4$ valged nudipäised ja $1/4$ mustad nudipäised. Uttedest olid pooled valged nudipäised ja pooled mustad nudipäised. Määra vanemate genotüübid.

19. Kõrgekasvuline kollaste ja ümarate teradega saahernes annab ristamisel kääbusja rohelise ümarate teradega taimega $3/8$ kõrgeid rohelisi ümaraid, $3/8$ kääbusjaid rohelisi ümaraid, $1/8$ kõrgekasvulisi rohelisi kortsulisi ja $1/8$ kääbusjaid rohelisi kortsulisi taimi. Millised on vanemate genotüübid, kui kõrgekasvulisus (K) domineerib kääbusja kasvu (k), roheline (R) kollase (r) ja ümmargune (Ü) kortsulise (ü) üle?

20. Kanadel on harja kuju määratud kahe lookuse poolt. Roosikujulise harja määrab R, hernessharja rr, pähklikujulise harja P ning lihtharja rp. Roosharjaline kana annab hernessharjalise kukega ristamisel pooled pätkelharjalised ja pooled roosharjalised tibud. Milline on vanemate genotüüp?

21. Maisil põhjustavad geenid C ja R tera punase värvuse. Kui esineb ainult üks dominantne geen, siis on terad valged. Kui esineb veel geen P, kujuneb tera värvus purpurseks. Millised on ristluste $CcRrpp \times CcRrPp$, $ccRRPp \times CcRrpp$ ja $CcRrPp \times CcRrpp$ tulemused?

22. Kanadel põhjustab retsessiivne geen X-kromosoomis hõbedase sulevärvuse, normaalne alleel aga pruuni värvuse. Millised on järglaste genotüübid, kui ristata pruun kana hõbedavärvuselise kukega?

23. Viljapuude paljundamisel pookimise teel nende pärikkus ei muutu. Miks?

24. Oletame, et geenid A ja B on tihedalt aheldunud. Kui heterosügoodil aB/ab teostada intsuhti, siis milliseid järglasi ta moodustab?

25. Emane puuviljakärbes (AB/ab) taandristati ab/ab isasega. Moodustusid järglased järgmise sagedusega: AB 453, ab 442, Ab 55 ja ab 50. Arvuta A ja B vaheline kaugus!

26. Lookuste a ja b vahel toimub geenivahetus sagedusega 10%, b ja c vahel 15%. Kui suur on kaksikvahetuste sagedus, kui üks vahetus ei sega teist?

27. Kas me saame moodustuvate järglaste

$\begin{matrix} y & ct & v \\ \hline + & + & + \end{matrix} \times \begin{matrix} y & ct & v \\ \hline + & + & + \end{matrix}$ tüüpide esinemise sageduse alusel öelda,

et geenid y ct v asetsevad ühes ja $y^+ ct^+ v^+$ teises homologilises kromosoomis?

28. Mis on geneetiline polümorfism ja kuidas on see tekkinud? Loetle mõned mitmeste alleelide seeriad!

29. Valmista diagramm kromosoomide paarumisest maisi translokatsiooni heterosügoodist $\frac{1 \cdot 2}{1 \cdot 4} \frac{3 \cdot 4}{3 \cdot 2}$. Kui ristata selle normaalse genotüübiga $(\frac{1 \cdot 2}{1 \cdot 2} \frac{3 \cdot 4}{3 \cdot 4})$ taime õietolmuga, millised järglased siis moodustuvad?

30. Kujuta kromosoomide paarumist inversiooni heterosügoodis $\frac{ab \cdot fedc \cdot gh}{AB \cdot CDEF \cdot GH}$.

31. Kas ploidsuse suurenemine soodustab või raskendab mutantse geeni avaldumist?

32. Mis on põhjuseks, et Oenothera lamarckiana'l püsib pidevalt hübriidne seisund?

33. Kuidas teha kindlaks blokeeringut biosünteesi ahelas, mida põhjustab mutantne geen?

34. Milline on E. coli konjugatsioonilisel ristamisel (Hfr $B^- M^- Lac^- T^+ L^+ \times F^- B^+ M^+ Lac^+ T^- L^-$) tekkivate rekombinantide ligikaudne sagedus?

35. Kuidas toimub tsütoplasmaatiliste organellide jaotumine raku jagunemisel?

36. Mõned inimesed on immuunsed teatud haigusetekitajate (näiteks Salm. typhosa) suhtes (on bakterite kandjad). Kas selline seisund on pärilik?

37. Milline on populatsiooni (4 AA : 7 Aa : 1 aa) struktuur pärast tasakaalu tekkimist?

38. Populatsioonis on geeni a sagedus 40%, A sagedus 60%. Milline on populatsiooni fenotüübiline struktuur?

39. Paramaecium caudatum'i kahe tüve pooldumisajad tundides on vastavalt:

16 - 18 - 20 - 22 - 24 - 26 - 28 - 30

Tüvi A 1 8 56 137 135 130 53 6 4

Tüvi B - 1 7 17 17 8 3 1 -

Kas tüvede vahel esineb oluline erinevus?

40. Aedmaasika lehe pikkus (cm) eri sortidel on järgmine:

Sort A - 7,1; 7,7; 9,0; 6,6; 8,0; 6,4; 9,5; 7,5; 8,5; 7,5.

Sort B - 8,2; 6,3; 8,8; 7,8; 7,7; 8,7; 8,7; 5,3; 10,0; 7,2.

Sort C - 7,4; 8,4; 10,1; 6,8; 8,8; 6,2; 8,1; 8,4; 7,9; 7,4.

Kas sortide vahel esineb oluline erinevus?

· K a s u t a t u d k i r j a n d u s .

- Altenburg, E. Genetics. London, 1957.
- Burdette, W.J. (edit.). Methodology in Basic Genetics. Holden-Day, Inc. San Francisco, 1963.
- Burdette, W.J. (edit.). Methodology in Mammalian Genetics, Holden-Day, Inc. San Francisco, 1963.
- Hagberg, A., a. Åkerberg, E., Mutations and Polyploidy in plant breeding. Scandinavian University Books, Svenska Bokförlaget (Bonniers). Stockholm, 1962.
- Williams, W. Genetical Principles and Plant Breeding Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1964.
- Адамс, М. Бактериофаги. ИЛ, М., 1961.
- Бейли, Н. Статистические методы в биологии. ИЛ, М., 1962.
- Генетика и селекция микроорганизмов (под ред. С.И.Алиханяна). "Наука", М., 1964.
- Жакоб, Ф. и Вольман, Э. Пол и генетика бактерии. ИЛ, М., 1962.
- Кушнер, Х.Ф. Наследственность сельскохозяйственных животных. "Колос", М., 1964.
- Лабораторные методы исследования патогенных простейших (под ред. Д.Н.Засухина). Медгиз, М., 1957.
- Медведев, Н.Н. Линейные мыши. "Медицина", М., 1964.
- Медведев, Н.Н. Практическая генетика. "Наука", М., 1966.
- Плохинский, Н.А. Наследуемость. Ред.-изд. отдел СО АН СССР, Новосибирск, 1964.
- Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика. "Высшая школа", Минск, 1964.
- Руководство по разведению животных, том II (под ред. И.Иоганссона), Изд. с-х лит., М., 1963.
- Штерн, К. Основы генетики человека. "Медицина", М., 1965.

Sisukord.

I. PÄRILIKKUSE MATERIAALSED KANDJAD	3
1. DNH isoleerimine	3
2. DNH hüdroolüüs ja kromatograafia	4
3. Elueerimine ja spektrofotomeetrimine	4
II. MIKROORGANISMIDE JA VETIKATE GENEETILINE ANALÜÜS	5
A. Mutatsioonimeetod	6
1. Mutatsioonide indutseerimine klorellal	7
2. Aukstroofsete mutantide isoleerimine	10
Pärmi aukstroofsete mutantide isoleerimine	11
Mutatsioonide indutseerimine bakteritel	12
B. Hübridoloogiline meetod	15
1. Hübriidsete pärmseente isoleerimine	16
2. Pärmseente lahknemise uurimine	17
3. Tetraadanalüüs	19
4. Alleelide komplementatsioon	19
5. <u>E. coli</u> konjugatsiooniline ristamine	21
6. Geneetiline transduktsioon	24
7. Geneetiline transformatsioon bakteritel	28
III. HÜBRIDOLOOGILINE ANALÜÜS PUUVILJAKÄRBSEL	29
1. Puuviljakärbes kui geneetiline mudelobjekt	29
2. Puuviljakärbe elutsükkel	29
3. Söötme valmistamine	30
4. Nõude pesemine	31
5. Kultiveerimiseks vajalik inventar	31
6. Liini säilitamine	31
7. Kärbeste narkotiseerimine	32
8. Kärbeste ülekanamine	32
9. Ristamine	32
10. Monohübriidne ristamine	33
11. Dihübriidne ristamine	33
12. Geenide interaktsioon	33

13. Suguliiteline pärilikkus	34
14. Geenivahetus (crossing over)	34
15. Populatsiooni dünaamika uurimine	34
IV. HERNE HÜBRIDOLOOGILINE ANALÜÜS	35
V. BIOMEETRILISI MEETODEID GENEETILISES ANALÜÜSIS ..	36
A. Tunnuse muutlikkuse uurimine	36
B. Representatiivsuse hindamine	36
C. Erinevuste statistiline hindamine	37
D. Faktiliste ja teoreetiliste lahknemissuhete võrdlemine	39
E. Vajaliku indiviidide arvu määramine	41
F. Pärivuse määramine	42
VI. HARILIKU MÜRLOOGA KULTIVEERIMISE METOODIKA.....	43
VII. KINGLOOMA PAARUMISTÜÜPIDE MÄÄRAMINE JA KONJU- GATSIOONILINE RISTAMINE	47
1. Kloonide isoleerimine	48
2. Kultiveerimine salatileotises	48
3. Kinglooma kloonide paarumistüübi määramine	48
4. Kultuuride ristamine	49
VIII. TAIMEGENEETIKA-ALASED JUHISED	50
1. Redis	50
2. Aedmaasikas	54
3. Rukis	55
4. Mais	55
IX. SELEKTSIOONI ALUSED	56
1. Oder	56
2. Rukis	61
3. Lina	61
4. Kõõgiviljad	61
X. ÜLESANDED	63
Kasutatud kirjandus	68

Тартуский государственный университет
СССР, г. Тарту, ул. Ённкооли, 18

В.Г.Павел

ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО ГЕНЕТИКЕ

На эстонском языке

Vastutav toimetaja V. Tohver

Korrektor M. Raissa

=====

TRÜ rotaprint 1966. Trükipoognaid 4,38.
Tingtrükipoognaid 4,08. Arvestuspoognaid
3,6. Trükiary 500. Paber 30x42. 1/4. Pal-
jundamisele antud 31. XII 1966.

MB 11893. Tell. nr. 569.

Hind 10 kop.

Hind 10 kop.

A
28339

5126323

TÜ RAAMATUKOGU



1 0300 00512632 3