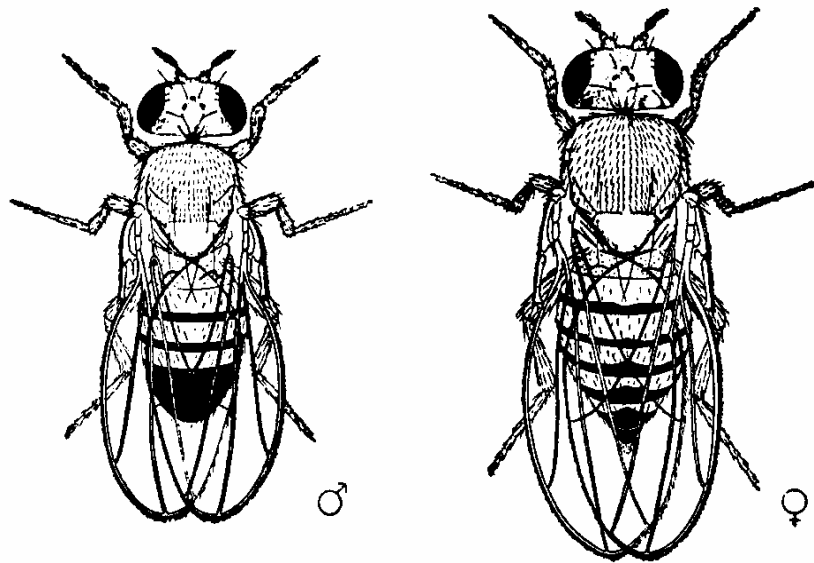


Pràctiques de laboratori de:

GENÈTICA (Grau en Biotecnologia)



Departament de Genètica
Facultat de Ciències Biològiques

CURS 2011-2012

PRÀCTIQUES DE LABORATORI DE GENÈTICA

Durada:

Cinc sessions d'aprenentatge i una sessió examen de 2 h cadascuna.

Contingut:

Es realitzaran dues pràctiques, una sobre la "**Segregació de caràcters**", en què es farà ús de la *Drosophila melanogaster* com a organisme experimental, i una altra sobre "**Cromosomes politènics**", en què es farà ús de la *Drosophila subobscura*. Ambdues pràctiques estaran imbricades en el temps per optimitzar les sessions de laboratori.

Pràctica 1: Segregació de caràcters (observació de la segregació independent enfront de la segregació de gens lligats).

Objectius didàctics:

- 1) Aprendre el maneig d'un organisme experimental, en concret, *D. melanogaster*.
- 2) Aprendre a realitzar encreuaments en *D. melanogaster*.
- 3) Aprendre a usar la lupa binocular.
- 4) Observar el resultat de la uniformitat de la generació filial quan s'encreuen línies pures.
- 5) Observar el resultat d'una segregació independent respecte d'una segregació de gens lligats.
- 6) Aplicar l'anàlisi estadística als resultats experimentals (distribució khi quadrat).

Material: Lupes i 4 soques mutants de *D. melanogaster* (pupes i adults).

Pràctica 2: Cromosomes politènics (preparació i observació de cromosomes politènics, així com d'inversions cromosòmiques).

Objectius didàctics:

- 1) Aprendre a usar el microscopi mitjançant l'observació de preparacions de cromosomes politènics de *D. subobscura*.
- 2) Observar inversions cromosòmiques.
- 3) Aprendre a preparar cromosomes politènics a partir de glàndules salivals de larves.

Material: Microscopis i lupes, tubs amb *D. subobscura* amb inversions en heterozigosi (larves d'últim estadi) i material de dissecció i tinció.

Desenvolupament de les sessions de pràctiques:

Es duran a terme en 5 sessions setmanals consecutives de 2 hores cadascuna.

1a setmana: Començar la primera pràctica. Presentar l'organisme experimental i explicar l'ús de la lupa binocular. Realitzar dos encreuaments per parella (es treballarà amb 4 soques portadores d'una mutació recessiva cadascuna. Es realitzarà l'encreuament d'una d'elles amb unes altres dues, de manera que un encreuament serà entre gens lligats i l'altre, no) (2 h).

2a setmana: Respecte a la primera pràctica, matar generació parental (30 min).

Començar la segona pràctica. Explicar la utilització del microscopi i observar preparacions de cromosomes politènics per detectar inversions (1 h i 30 min).

3a setmana: Respecte a la primera pràctica, observar les F_1 , interpretar-ne el resultat i realitzar un nou encreuament entre mascles i femelles de la F_1 (1 h). Desenvolupar teòricament els resultats esperats dels diversos encreuaments (1 h).

4a setmana: Respecte a la primera pràctica, matar la generació F_1 (15 min).

Respecte a la segona pràctica, disseccionar larves, preparar cromosomes politènics i observar-los (1 h i 45 min).

5a setmana: Respecte a la primera pràctica, recomptar la F_2 i interpretar-ne els resultats (l'anàlisi estadística es realitzarà a casa i s'entregarà juntament amb el resum) (1 h).

Respecte a la segona pràctica, es continuarà practicant la preparació de cromosomes politènics (1 h).

Avaluació pràctica: Es realitzarà en una de les setmanes següents a les anteriors sessions de laboratori, i consistirà a preparar individualment cromosomes politènics i a dur a terme un encreuament (pupes femelles i mascles adults).

Nota: Els fenotips de les soques que s'encreuen han de ser prou visibles perquè el professor no hagi d'utilitzar la lupa per observar-ne el resultat (simplement caldrà observar el fenotip de les femelles i dels mascles, així com el percentatge de supervivents entre els parentals).

Sistema d'avaluació:

S'avaluarà l'aprofitament de l'aprenentatge en el laboratori. Això es farà avaluant l'assistència i presentant un **resum** dels resultats de les pràctiques i les **anàlisis** dels resultats (5% de la nota total), i un **examen** al laboratori que consistirà a dur a terme un encreuament entre dues soques de *Drosophila* i una preparació de cromosomes politènics (5% de la nota total). El valor de la nota de laboratori serà el **10%** del total de l'assignatura.

PART I

Segregació de caràcters en la *Drosophila* *melanogaster*

Introducció a l'organisme model

Drosophila melanogaster

Raons per a l'ús de la *Drosophila*:

Hi ha moltes raons que fan de la *D. melanogaster* (Figura 1) un organisme idoni per a l'experimentació:

- És molt abundant i de fàcil captura.
- Es pot mantenir fàcilment en el laboratori.
- Produeix una gran quantitat de descendents (adequat per comprovar les proporcions mendelianses).
- A 25° C se'n completa el cicle biològic en 10-11 dies.
- Només té 4 parells de cromosomes.
- Té cromosomes gegants a les glàndules salivals i altres teixits de la larva, la qual cosa en facilita l'observació microscòpica.
- Es treballa amb ella des del 1905 i, per tant, se'n disposa d'una bibliografia abundant.
- N'hi ha una gran quantitat de mutants, tant naturals com induïts, i moltes soques especials que permeten anàlisis genètiques detallades.



Fig. 1: Mascle adult de *Drosophila melanogaster*.

Medis de cultiu:

Les mosques en estat salvatge s'alimenten de llevats que fermenten els sucres de les plantes. Per capturar individus en la naturalesa es poden preparar unes farinetes amb plàtan aixafat, farina i llevat de pa.

En el laboratori, la *Drosophila* pot mantenir-se en ampolles estèrils amb un menjar preparat a base de farina de dacsa, sucre, llevat i agar com a espessidor. Per evitar contaminacions, s'hi afegeix un fungicida, normalment nipagin (metil *p*-hidroxibenzoic), i un bactericida (àcid propiònic).

Un cop solidificada, se li afegeix llevat picat (per proporcionar una font de proteïnes a les larves) i un paper en zig-zag (perquè absorbisca la humitat i com a superfície per a la pupació). Aquests flascons es tapen amb un cotó esterilitzat i s'indica la data i el tipus de soca o encreuament que es manté en el tub o en l'ampolla.

La temperatura òptima de cultiu és de 25°C. A aquesta temperatura, el cicle biològic es completa en 10-11 dies. A temperatures superiors, es produeixen fenòmens d'esterilitat i mort, a temperatures inferiors, el desenvolupament és molt lent.

Observació dels individus:

Per facilitar-ne l'estudi, convé anestesiar les mosques, especialment per evitar que s'escapen. Encara que hi ha diversos mètodes per anestesiar-les (èter, CO₂, fred, etc.), farem servir l'èter que, tot i que és perillós, és el més efectiu (Fig. 2).

Metodologia que cal seguir:

Es pren el pot on es troben els adults i es colpeja suaument en un suro perquè caiguen cap al fons. Es retira el cotó i es bolca el pot sobre l'eterificador. L'eterificador (una ampolla o tub de vidre) es tapa amb un cotó impregnat d'èter. Quan les mosques estan adormides es bolquen sobre un paper i s'observen amb la lupa. El temps que tarden les mosques a adormir-se és molt variable i depèn bastant de l'edat (com més velles són, abans s'adormen).



Fig. 2: Equip per observar *D. melanogaster*.

Consells pràctics:

1.- Cal anar amb compte, ja que una exposició prolongada a l'èter els pot produir la **mort** (es reconeix perquè les ales es disposen perpendicularment al cos).

2.- Cal tenir cura de no mantenir oberta l'ampolla del cultiu, per evitar que les mosques **se n'escapen** o que n'hi entren unes altres i el cultiu es **contamine**.

3.- No deixar obert l'eterificador ni l'ampolla d'èter, ja que a més d'evaporar, pel seu baix punt d'ebullició, i carregar l'ambient, hi ha perill **d'explosió**, ja que és altament **inflamable**. Per tant, **no hi pot haver encenedors encesos** al laboratori durant les pràctiques amb èter.

4.- Abans d'eterificar de nou, ens hem d'assegurar que no queden mosques al fons de l'eterificador.

5.- Si durant una observació o recompte les mosques comencen a despertar-se, es poden reeterificar, amb cura de no matar-les.

6.- Per facilitar l'observació dels individus és recomanable alinear totes les mosques sobre la cartolina i passar-ne la filera sota el focus de la lupa. Així es poden anar separant segons el nostre interès.

7.- Quan es retornen les mosques adormides a un pot amb menjar, cal procurar que aquest estiga horitzontal, perquè no s'enganxen i moren. L'ampolla no es col·locarà en posició vertical fins que estiguen despertes. Un altre mètode consisteix a posar les mosques en un petit cucurull de paper, que després es posarà en el pot.

8.- Un cop finalitzada l'observació, els individus que no ens interessin s'introduiran en un flascó (**MORGUE**) que contindrà oli o una barreja de H₂O:EtOH:èter, per evitar la descomposició de les mosques.

Diferenciació entre sexes:

Aquesta espècie presenta un clar dimorfisme sexual (Fig. 3):

Característiques de les femelles:

- 1.- Abdomen acabat en punta i més gros que el del mascle.
- 2.- Dors de l'abdomen amb bandes transversals fosques i separades les unes de les altres fins al final.

Característiques dels mascles:

- 1.- Menor mida que les femelles.
- 2.- Extrem de l'abdomen arrodonit.
- 3.- Les últimes bandes transversals de l'abdomen estan fusionades, cosa que dona una aparença fosca al final d'aquest, visible a simple vista.
- 4.- Tenen una estructura anomenada *pinta sexual* (quetes modificades) en el primer segment tarsià del primer parell de potes (Fig. 3).

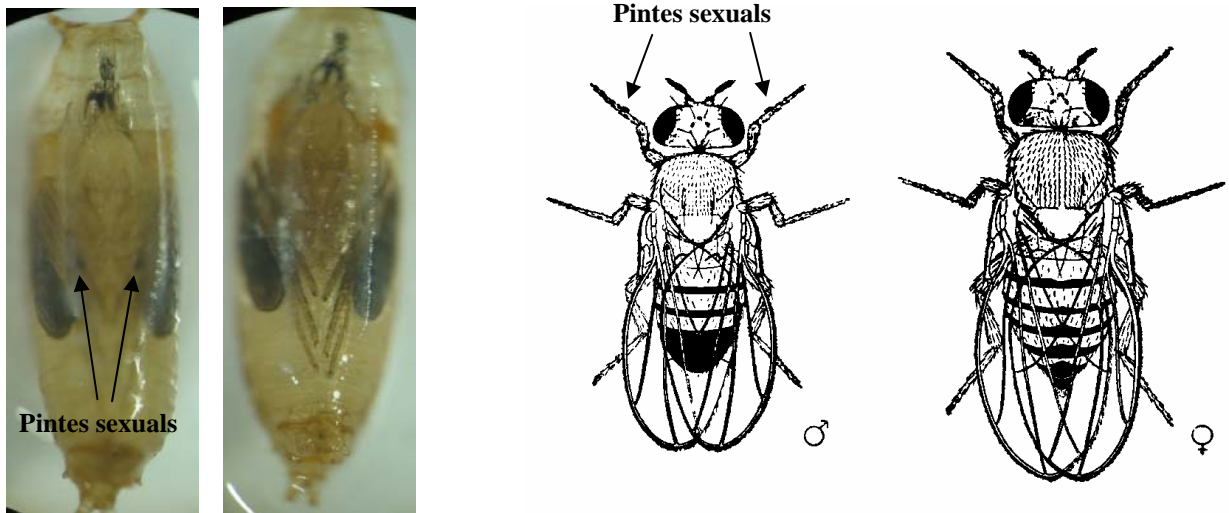
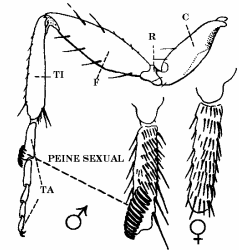


Fig. 3.- Mascle (esquerra) i femella (dreta) de *D. melanogaster* en estadi de pupa i imag, i detall de la pota davantera d'un mascle en la qual es pot apreciar la pinta sexual.



Obtenció de femelles verges:

Les femelles de *D. melanogaster* emmagatzemen l'esperma d'una sola inseminació durant gran part de la seua vida reproductiva. Això suposa un inconvenient quan es tracta de realitzar estudis genètics en els quals cal realitzar encreuaments entre genotips determinats i, per tant, és necessària la utilització de femelles verges:

Les femelles es poden separar dels mascles en l'estat de pupa madura, ja que en aquest estat es poden distingir les pintes sexuals dels mascles com dos punts entre les taques de les ales. Les pupes es poden extraure de l'ampolla amb un pinzell humit, i llavors posar-les sobre la cartolina. Les pupes sense els punts foscos seran femelles, i es posaran en un tub a part. A les 24 hores, ja hauran emergit, i si no hem confós cap mascle entre elles, seran verges i estaran a punt per ser utilitzades en encreuaments.

Estudi del fenotip silvestre de *D. melanogaster*:

S'anomena així el fenotip normal que no manifesta cap gen mutant. Hi ha soques de laboratori que es prenen com a estàndard del fenotip silvestre, en les quals se sap amb certesa el genotip, com per exemple, *Oregon R*, *Canton-S*, etc. El cicle biològic es mostra en la Fig. 4:

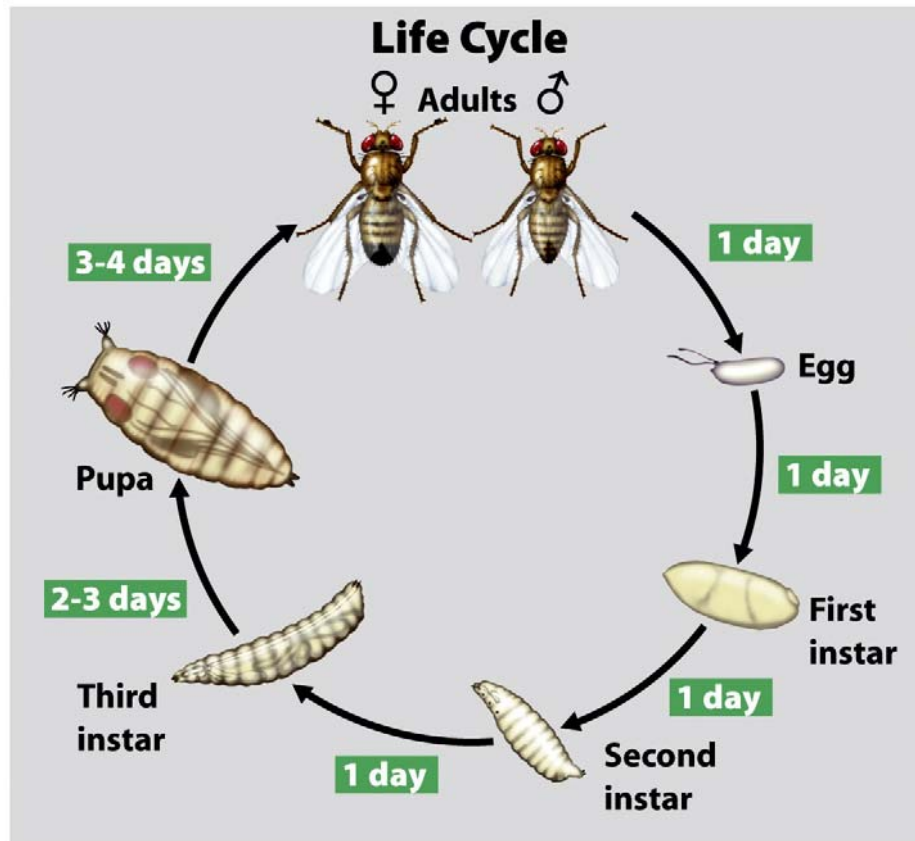


Fig. 4.- Cicle de vida de *D. melanogaster*. Els diferents temps es refereixen a un cultiu mantingut a 25°C (il·lustració agafada del llibre *Genética: Un enfoque conceptual*, de Pierce, 3ª ed.).

OU.- Les dimensions d'aquest són 0,19 x 0,50 mm i el seu pes és de 10-5 g. És de color blanc i recobert d'un gruixut embolcall anomenat cori, amb uns petits apèndixs en l'extrem superior que li serveixen per surar en un medi líquid. A les 22 hores, a una temperatura de 25°C, emergeix la larva.

LARVA.- És la fase de creixement. De color blanc, viu a les farinetes en les quals perfora canals. Les glàndules salivals de la larva produeixen suc gàstric i també unes secrecions que utilitza l'insecte per adherir-se a la paret de l'ampolla quan va a pupar. Té tres estadis larvaris, amb dues mudes.

PUPA.- Quan la larva es prepara per pupar, s'allunya de la humitat del medi de cultiu i puja per les parets de l'ampolla fins a una zona relativament seca on s'enganxa. La larva pupa dins de la seua última pell, que al principi és blanca i flexible (estat de prepupa, en el qual ja s'observen els espiracles), s'endureix (estat de pupa blanca) i es fa més fosca amb el temps (pupa madura). Immediatament després de pupar, els teixits de la larva s'histolitzen, i unes estructures embrionàries, denominades discos imaginals, creixen i produeixen seccions de l'organisme adult.

IMAG.- Comença aquesta fase quan la mosca emergeix de l'embolcall de la pupa. Sol fer de 2 a 3 mm de longitud i pesar de 0,8 a 1,5 mg, segons siga mascle o femella, respectivament. Acabat de sortir de la pupa, l'adult està despigmentat, i no es pigmenta fins a unes tres o quatre hores després. Així mateix, té les ales plegades i les desplega una hora després. Cap a les 6 hores ja ha arribat a la maduresa sexual.

Pràctica 1: Segregació de caràcters

OBJECTIU GENERAL:

Estudi de l'herència de caràcters en la *Drosophila melanogaster*, mitjançant la comparació de les diferències entre la segregació independent i la segregació de gens lligats.

Objectius didàctics:

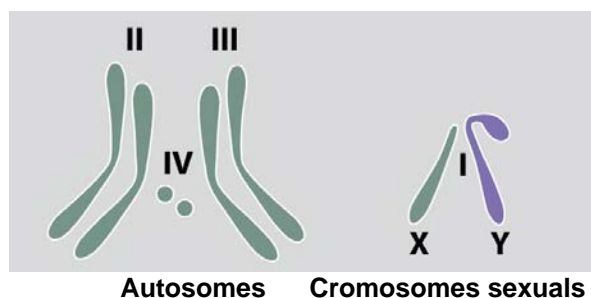
- 1) Aprendre el maneig d'un organisme experimental, en concret, *D. melanogaster*.
- 2) Aprendre a realitzar encreuaments en *D. melanogaster*.
- 3) Aprendre l'ús de la lupa binocular.
- 4) Observar el resultat de la uniformitat de la generació filial quan s'encreuen línies pures.
- 5) Observar el resultat d'una segregació independent respecte d'una segregació de gens lligats.
- 6) Aplicar l'anàlisi estadística als resultats experimentals (distribució khi quadrat).

MATERIAL NECESSARI:

Lupes i 4 soques mutants de *D. melanogaster* (pupes i adults).

INTRODUCCIÓ:

La *Drosophila melanogaster* té tres parells d'autosomes (cromosomes 2, 3 i 4) i un parell de cromosomes sexuals (cromosomes X i Y). La determinació del sexe en aquest organisme és XX per a les femelles i XY per als mascles. Els cromosomes 2 i 3 són metacèntrics i el 4 és puntiforme. El cromosoma X és telocèntric i el Y, acrocèntric.



Aquesta pràctica s'ha de resoldre como si es tractara d'un problema de genètica.

A partir dels resultats de les generacions F_1 i F_2 , cal proposar una hipòtesi sobre el tipus d'herència dels dos caràcters utilitzats en cada encreuament i confirmar-la o rebutjar-la fent servir la distribució khi quadrat. És important tenir en compte que en els mascles de *D. melanogaster* no es dona el fenomen d'entrecruament entre cromosomes homòlegs.

Hi ha cinc tipus possibles d'encreuaments (descartant aquells que incloquen gens del cromosoma Y i suposant que tots els al·lels mutants siguin recessius), els quals són:

- 1) Encreuament entre soques portadores de gens mutants del cromosoma X.
- 2) Encreuament entre soques portadores de gens mutants autosòmics lligats.
- 3) Encreuament entre soques portadores de gens mutants autosòmics no lligats.
- 4) Encreuament entre una femella portadora d'un gen mutant en el cromosoma X i un mascle amb un gen mutant autosòmic.
- 5) Encreuament entre una femella portadora d'una mutació autosòmica i un mascle portador d'un gen mutant del cromosoma X.

DESENVOLUPAMENT DE LA PRÀCTICA:

1a setmana: Familiaritzar-se amb l'organisme experimental i del material d'observació (lupa binocular). Dur a terme dos encreuaments per parella utilitzant 4 soques portadores d'una mutació recessiva cadascuna. Es realitzarà l'encreuament d'una d'elles amb unes altres dues (transferir al flascó de cultiu pupes femelles d'una de les soques i mascles adults de l'altra, de 3 a 4 parelles). Temps previst: 2 h.

2a setmana: Eliminar els adults de la generació parental perquè no es barregen amb la descendència. Temps previst: 30 min.

3a setmana: Observar les F_1 , anotar-ne i interpretar-ne el resultat i dur a terme un nou encreuament entre mascles i femelles de cada F_1 (de 3 a 4 parelles). Desenvolupar teòricament els resultats esperats dels diversos encreuaments. Temps previst: 2 h.

4a setmana: Eliminar els adults de la generació F_1 perquè no es barregen amb els de l' F_2 . Temps previst: 15 min.

5a setmana: Recomptar els diversos fenotips de les F_2 (tenint en compte el sexe per si aquesta dada fóra necessària), anotar-ne i interpretar-ne els resultats. Temps previst: 1 h.

PRESENTACIÓ DELS RESULTATS:

El dia de l'avaluació de les pràctiques de laboratori, l'alumne presentarà un resum de la pràctica en el qual figure:

- a. El desenvolupament teòric dels cinc tipus d'encreuaments possibles, amb el càlcul de les segregacions fenotípiques obtingudes en la F_1 i la F_2 de cada encreuament. En els encreuaments entre soques portadores de gens mutants situats en el mateix cromosoma s'han de calcular les proporcions fenotípiques obtingudes en la F_2 per al cas que estiguen separats per una distància de 20 cM.
- b. Les dades observades en les F_2 es compararan estadísticament amb els esperats per aquelles hipòtesis que l'alumne considere possibles.

PART II

Cromosomes politènics de *Drosophila* *subobscura*

Introducció a la politènia i els cromosomes politènics de *Drosophila*

Quan en el cicle de divisió cel·lular es modifica l'alternança normal de les fases S i M de manera que després d'una mitosi es produeixen dos períodes de síntesis successives, té lloc el fenomen de l'endoreduplicació. Un cas extrem d'aquesta és la politènia, en que es produeix un nombre elevat de rondes successives de replicació (5, 10 o més) i es formen els anomenats cromosomes gegants o cromosomes politènics que estan constituïts per 2^n cromàtides (en què n és el nombre de rondes de replicació). Així, per exemple, en les glàndules salivals d'unes quantes espècies de *Drosophila* la replicació es produeix durant deu rondes successives, es a dir, que cada cromosoma té $2^{10} = 1.024$ cromàtides.

Els cromosomes politènics es mantenen en interfase; per tant, són cromosomes somàtics interfàsics en què les cromàtides romanen descondensades (com correspon a la interfase) per la qual cosa la longitud del cromosoma és entre 100 i 200 vegades la del cromosoma mitòtic corresponent. Com les nombroses còpies de cada cromosoma romanen unides i a més els cromosomes homòlegs tendeixen a estar aparellats, la politènia produeix un gruix total que és unes deu vegades el dels cromosomes metafàsics. Tot això els fa perfectament analitzables amb microscòpia òptica a pesar de tractar-se de cromosomes interfàsics.

La politènia no es una anomalia del cicle cel·lular, sinó que es considera un mecanisme d'amplificació gènica dins d'un procés citogenètic de citodiferenciació. Aquest sistema permet els organismes disposar d'una línia germinal amb un contingut d'ADN relativament baix, amb els avantatges que això comporta quant a replicacions ràpides i cicles cel·lulars curts, però amb la capacitat de multiplicar el genoma (o parts d'aquest) en línies cel·lulars específiques.

Els cromosomes politènics van ser descoberts per Balbiani (1881), però el significat d'aquests no va ser entès fins a mitjan dècada del 1930, en què van ser analitzats en les glàndules salivals de les larves dels dípters. Posteriorment, es van observar en altres teixits o òrgans de les larves (epiteli intestinal, tubs de Malpigi, etc.) i en altres organismes, per exemple en el macronucli de protozoous ciliats, glàndules de la seda de *Bombyx mori*, glàndules salivals d'insectes col·lèmbols i també en diversos teixits vegetals. De totes maneres, els organismes més favorables per observar els cromosomes politènics són els dípters, raó per la qual els cromosomes politènics millor coneguts són els de les glàndules salivals de les larves de *Drosophila* i *Chironomus*.

Quan s'estudia el desenvolupament de les larves de *Drosophila*, s'observa la formació de les glàndules salivals per divisions cel·lulars i invaginacions del blastoderm, fins a aconseguir un nombre aproximat de 125 cèl·lules cada glàndula. A partir d'aquest moment, que coincideix amb el període d'eclosió de la larva, les cèl·lules ja no es divideixen més i comencen a augmentar de mida com a conseqüència del procés d'endoreduplicació que origina els cromosomes politènics.

Els cromosomes politènics mostren un patró de bandes típic, produït per l'alternança de regions condensades (bandes) i regions descondensades (interbandes). Aquesta organització és conseqüència de l'alineament exacte de les cromàtides en els cromosomes de manera que les regions de fort empaquetatge de les cromàtides individuals (corresponents a cromòmers) tenen l'aparença de bandes, i s'alternen amb les interbandes, (Fig. 1).

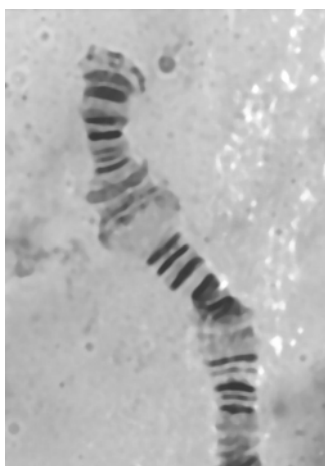
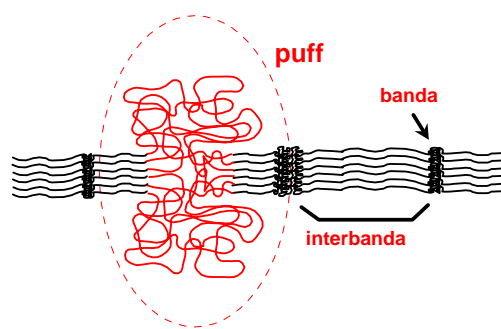


Fig. 1. Fotografia d'un cromosoma politènic de *Drosophila* i detall de la seua morfologia.



En la *Drosophila*, els cromosomes politènics apareixen units en una zona central, denominada cromocentre, que s'interpreta com la fusió de les regions pericentromèriques heterocromàtiques de tots els cromosomes. En altres gèneres de dípters, com el *Chironomus*, no apareix cromocentre, de manera que els cromosomes politènics es presenten solts (Fig. 2).

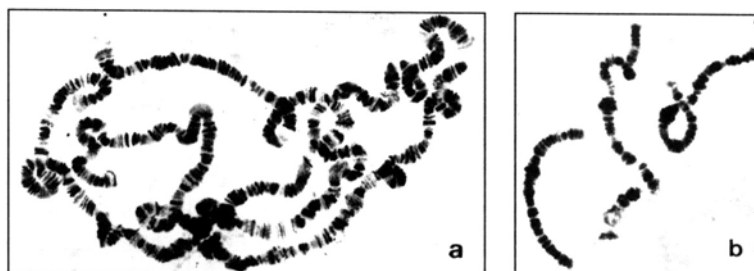


Figura 2. Cromosomes politènics (a) de *Drosophila melanogaster* que mostren la presència del cromocentre i (b) de *Chironomus thummi*, sense cromocentre.

L'aparellament dels braços homòlegs és tan íntim que sol ser difícil distingir un braç de l'altre; no obstant això, en ocasions es produeix la falta d'aparellament en regions homòlogues dels cromosomes politènics (Fig. 3).



Fig. 3. Secció del cromosoma O de *D. subobscura* (soca K228) que presenta una zona desaparellada entre els homòlegs.

Una vegada establert que el patró de bandes que presenten els cromosomes politènics és característic per a cada espècie, es van poder construir mapes citològics molt precisos, en els quals cada banda cromosòmica quedava identificada per una lletra i un número (Fig. 4). Aquests mapes permeten la localització de reordenacions cromosòmiques que produeixen alteracions del patró de bandes. En la *D. melanogaster*, moltes d'aquestes reordenacions cromosòmiques s'han pogut associar a mutants fenotípics determinats, de manera que es fa possible la correlació entre mapes citològics i mapes genètics. Actualment, la posició exacta de gens concrets en el mapa citològic pot determinar-se mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*.

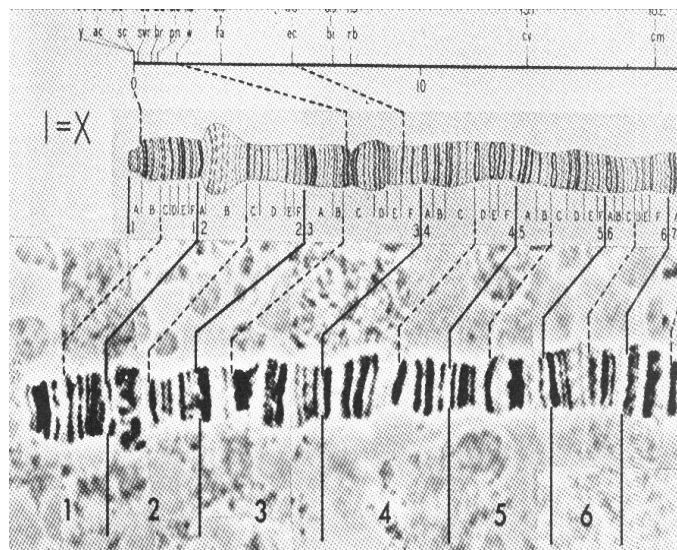


Fig. 4. Mapa genètic, mapa citològic i fotomapa de les sis primeres regions del cromosoma X de *D. melanogaster*.

Pràctica 2: Cromosomes politènics

OBJECTIU GENERAL:

Aprendre a preparar cromosomes politènics de *Drosophila subobscura* per observar-los al microscopi i identificar-hi inversions cromosòmiques.

Objectius didàctics:

- 1) Aprendre l'ús del microscopi mitjançant l'observació de preparacions de cromosomes politènics de *D. subobscura*.
- 2) Observar inversions cromosòmiques.
- 3) Aprendre a preparar cromosomes politènics a partir de glàndules salivals de larves.

MATERIAL NECESSARI:

Microscopis i lupes, preparacions de cromosomes politènics, tubs amb *D. subobscura* amb inversions en heterozigosi (larves d'últim estadi) i material de dissecció i tinció.

INTRODUCCIÓ:

Una inversió cromosòmica no és més que un fragment de cromosoma en posició invertida. Perquè això es produïska, és necessari que el cromosoma es trenque per dos punts i es torne a soldar, després que el fragment haja girat 180°. Els gens situats en la zona del cromosoma que ha sofert la inversió presentaran una seqüència inversa a la del seu cromosoma homòleg no invertit.

ABCDEFGHIJ → ABCHGFEDIJ
 ↑ ↑

Les inversions poden ser simples i afectar un únic fragment, o compostes, quan s'imbriquen dues reordenacions diferents.

ABCHGFEDIJ → ABCHGFIDEJ
 ↑ ↑

Quan un individu és homozigot per a una determinada inversió, només s'observa la reordenació dels seus gens. Però si és heterozigot, l'aparellament dels cromosomes homòlegs necessita la formació dels anomenats llaços d'inversió (Fig. 5).

Els cromosomes politènics constitueixen un material idoni per observar les estructures que apareixen en els heterozigots per a inversions. En contrast amb altres espècies pròximes, que només presenten inversions en un o dos dels seus cromosomes, en *Drosophila subobscura* s'han descrit inversions (aproximadament 60 en total) en tots els seus cromosomes (A, J, U, E, O), excepte en el cromosoma puntual "dot".

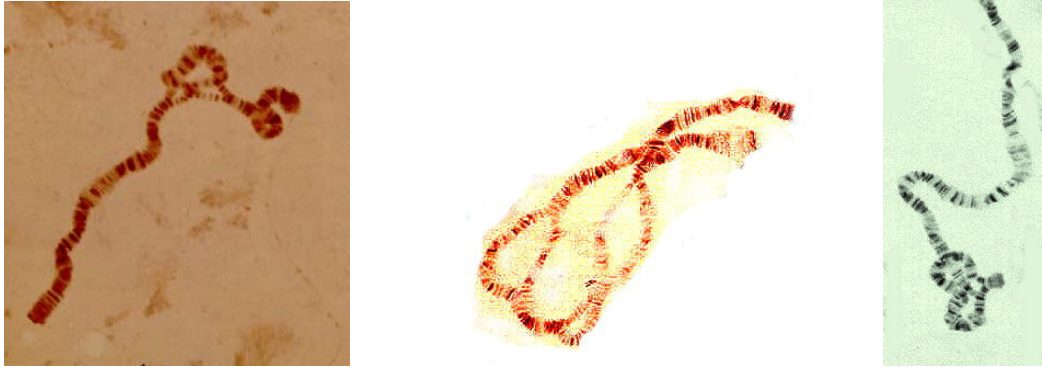


Figura 5: Cromosomes politènics de *Drosophila subobscura* d'individus heterozigòtics per a inversions compostes.

DESENVOLUPAMENT DE LA PRÀCTICA:

1a sessió (2a setmana): Explicar la utilització del microscopi i observar preparacions de cromosomes politènics per detectar inversions. Temps previst: 1 h i 30 min.

2a sessió (4a setmana): Disseccionar larves, preparar cromosomes politènics i observar-los. Temps previst: 1 h i 45 min.

3a sessió (5a setmana): Continuar practicant la preparació de cromosomes politènics. Temps previst: 1 h.

METODOLOGIA:

1. Col·locar una larva neta en un portaobjectes amb una gota de NaCl al 0,6%. Situar el porta sobre la plataforma de la lupa. Com pot observar-se en la figura 6, les glàndules salivals es troben unides entre si per la part anterior en un conducte únic que es comunica amb la faringe.

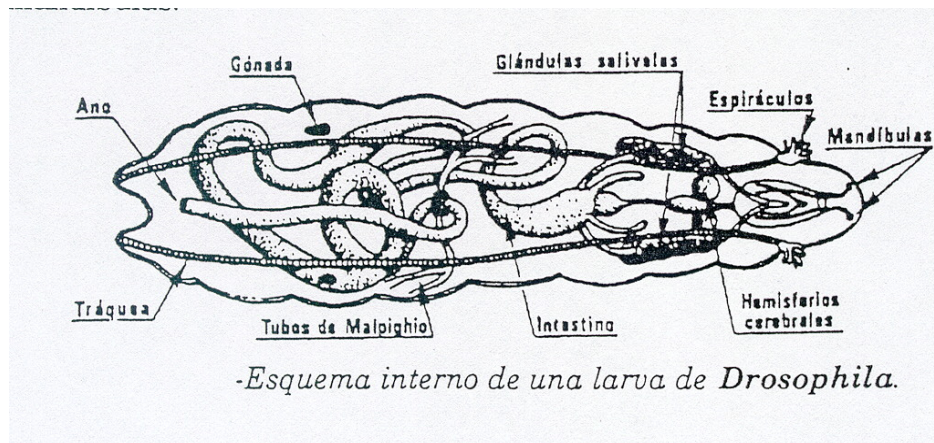


Figura 6: Esquema intern d'una larva de *Drosophila*.

Per extraure les glàndules (figura 7), se subjecta la part posterior de la larva amb unes pinces i es decapita amb una agulla emmanegada. Les glàndules apareixeran com dos saquets transparents, situats a un costat i l'altre de l'esòfag, i units a teixit gras.

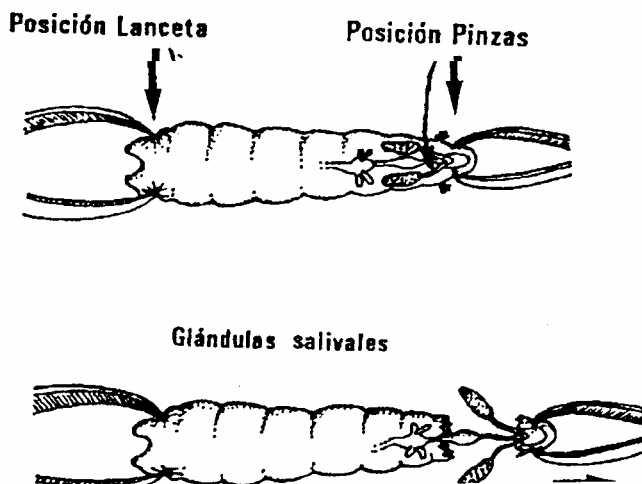


Figura 7: Esquema de l'extracció de les glàndules salivals d'una larva de *Drosophila*.

2. Aïllar les glàndules el millor possible però amb atenció de no danyar-les. No és excessivament problemàtic el fet que quede un poc de teixit gras adherit.
3. Transferir les glàndules a una gota de colorant (orceïna acético-làctica) i mantenir-les durant 25 minuts. Aquest temps es determina empíricament i depèn de la marca de colorant i de la soca utilitzada. És necessari que les glàndules es mantinguen cobertes en tot moment pel colorant ja que en cas de no ser així, s'assecaran i es farà malbé el material.
4. Després de la tinció, cal cobrir la preparació amb un cobreobjectes i fer uns cops suaus amb la punta de l'agulla emmanegada perquè les cèl·lules se separen. A continuació, cal cobrir la preparació amb paper absorbent i fer pressió sobre el cobreobjectes, i evitar que aquest es moga, perquè els cromosomes s'estenguen i queden perfectament aplanats.

PRESENTACIÓ DELS RESULTATS:

El dia de l'avaluació de les pràctiques de laboratori, l'alumnat presentarà un resum de la pràctica en el qual figure un esquema del que ha obtingut en el seues preparacions.