

# ショウジョウバエの交配実験学習帳

Workbook for *Drosophila* cross experiments

---

著者／文責 新井健太

監修 澤村京一

2016年10月1日 初版発行

© 2016 Quenta Araye

---



所属

---

番号

---

名前

---

## 本書の使い方

本書は、ショウジョウバエの交配実験を通して、体験に基づく古典遺伝学への理解を養成することを目的としています。第1章には、実験をするにあたって最低限必要な知識を凝集しました。これを精読のうえで、第2章へ進んでください。第2章では、伴性遺伝の簡単な実験を解説しています。第2章の指示にしたがって実験計画を立て、データをとれば、基本訓練は完了です。第3章以降は、基本訓練を完了した人向けの実験が提案されています。これらの実験は、代表的な遺伝学的ツールと手法に触れられるよう設計されており、いずれも挑戦する価値のある課題です。まずは、指導者の指示があったものからはじめてみましょう。

目次	02
1. 基礎知識	03
2. 伴性遺伝	08
3. 遺伝的組換え	11
4. 連鎖（三点交雑）	13
5. 独立	14
6. スクリーニング	15
7. 生殖隔離と雑種	18
付録	20

表紙写真：キイロショウジョウバエの唾腺染色体（×400）。野生型系統の Oregon-R をもちいた。染色中心から、五本の腕が伸びているのが確認できる。このように、腕をきれいに展開させるのはむずかしい。2016年、著者撮影。

## 1. 基礎知識

### 1.1. ライフサイクルと性決定

ここでは、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の交配実験に必須の知識をとりあげます。25°C条件\*では、雌が産んだ受精卵は6-7日後に蛹、10日後に成虫となります。雌は四種類の染色体(第一染色体、第二染色体、第三染色体、第四染色体)を二本ずつ持っています( $2n=8$ )。第四染色体はとても短い染色体で、遺伝子も少ししか乗っておらず、交配実験では無視されることが多いです。第一染色体は性染色体であり、X染色体とも呼ばれます。つまり、雌はXXです。その一方で、雄はY染色体を持っており、XYです。キイロショウジョウバエの性決定は、X染色体を二本持つと雌、一本持つと雄になると覚えておきましょう。減数分裂のときに染色体不分離が起きると、性染色体を持たない配偶子(O)や、性染色体を二本持った配偶子(XX, XY)が生じます。これらから子供ができると、上記の法則にしたがって、XOが雄、XXYが雌として生まれてきます。また、Oは致死、XXXは生存力がきわめて小さいです。劣性の突然変異はホモ接合になると表現型を発現します。ヘテロ接合では、相同染色体上にある野生型の対立遺伝子(優性)の効果で、表現型を発現することはありません。しかし、Y染色体には遺伝子がほとんど乗っていないので、X染色体上に劣性の突然変異があれば、XYにおいてヘミ接合\*\*となり、劣性の突然変異の表現型が発現します。ショウジョウバエの仲間は、基本的に、雌で遺伝的組換えが起こり、雄では起こりません。交配実験を行うときは、この性質に注意する必要があります。

\*実験は基本的に25°Cで行います。18°C条件の場合、発生に二倍の時間がかかり、成虫まで約20日です。

\*\*対立遺伝子を一個だけしかもっていない状態をヘミ接合といいます。

### 1.2. 遺伝子記号と交配図

キイロショウジョウバエで最初に発見された突然変異は白眼で、その原因遺伝子は表現型にもとづいて *white* と命名されました。遺伝子記号は遺伝子名を略記したもので、*white* の場合は *w* となります\*。遺伝子名と遺伝子記号は斜体(イタリック体)で表記し、野生型対立遺伝子に対して劣性の場合には小文字で始まり、優性の場合には大文字で始まります。交配図の中では♀が雌、♂が雄、かけ算の記号( $\times$ )は交配すること、足し算の記号( $+$ )は野生型対立遺伝子か野生型染色体を意味します。交配に用いた頭数を示したいときは、♀♀が複数頭の雌、♂♂が複数頭の雄、5♀♀が5頭の雌、1♂♂が1頭の雄、などとします。染色体間の関係は、スラッシュ(/)または横棒線(—)が相同染色体間、セミコロン(;)が異なった染色体間をあらわします。世代を明記するときは、P (parental generation)、F1 (first filial generation)、F2 (second filial generation) のように書きます。Figure 1 には白眼の雌を示しています。左から順に第一、第二、第三、第四染色体です。ふつうは第四染色体を無視して、Figure 2 のようになります。同様にして、Figure 3 は白眼の雄で、YはY染色体をあらわします。白眼の系統内では、毎世代 ♀♀ *w/w* × *w/Y* ♂♂ の交配が起こっています (Figure 4)。

ふつうは突然変異の乗っていない染色体も無視して、Figure 5 または Figure 6 のようにあらわします。なお、本書では必要に応じて [ ] で遺伝子記号を括ったかたちで表現型を併記しています。例えば、 $w/w[w]$ 、 $w/+ [+]$ 、 $+/+ [+]$ 、 $w/Y[w]$ 、などです。交配実験を行う前には必ず交配図（雌を左側、雄を右側に書きましょう）を描いて、計画をよくねりましょう。そして、どんな作業を何日目に行うのか、カレンダーに書き込んでおきましょう。具体的な計画の立て方は 2.1 を参照してください。

\*補足：本書では登場しませんが、対立遺伝子を厳密に区別したい場合は、肩付き文字であらわします。例えば、複眼が純白色になる最初に発見された対立遺伝子は  $w^l$ 、淡桃色になるものは  $w^a$ （読み：ホワイト アプリコット）、赤色になる野生型は  $w^+$  となります。

### 1.3. 雌雄判別

交配実験では、雌雄判別が完璧にできることが大前提です。キイロショウジョウバエの場合は、雄の前肢にある性櫛（せいしつ、sex comb）、腹部腹側にある外部生殖器、腹部尾端背側の黒い着色が見分けるポイントです。雌にはこれらが存在せず、腹部は白くてぷっくりしており、体サイズも雄より大きいです。さっそく、キイロショウジョウバエに麻酔をかけて、雌雄を判別し、ソーティングする練習をしましょう。あなたがソーティングした結果を指導者に確認してもらい、完璧に判別できるようになるまで繰り返しましょう。また、キイロショウジョウバエの全身像と、雌雄の特徴的な部分をスケッチすることも、判別する特徴をつかむための良い練習になります。

### 1.4. 系統維持

飼育はきわめて簡単で、エサビン（エサとなる培地を分注してある太い試験管）に入れておけば自然に交配して、次世代が生まれてきます。曜日を決めて、二週間に一回（14 日毎）エサビンを交換してあげましょう。ショウジョウバエを入れて次世代が生まれてくるエサビンのことを culture といいます。



### 1.5. 処女雌集め

エサビンの中のハエは自由に交尾してしまっているため、そのままでは交配実験に使うことができません。そこで、処女雌集め (virgin collection) を行います。まず、交配に使いたい系統から 3-5 頭の雌を取り出します。これを親世代として新しいエサビンに入れて (Table 1. “1”)、1-2 日間産卵させます (1st culture)。同様にして、親ハエを新しいエサビンに移動することを繰り返し (Table 1. “2”)、少しだけ産卵させた瓶を数本用意できたら (2nd, 3rd, 4th culture, ...)、産卵させた親ハエは捨てます (Table 1. “3”)。もし、大量に産卵してしまうと、幼虫の活動でエサがドロドロになり、後の作業が困難になりますから注意してください。25°C 条件では産卵後 10 日目から子世代のハエが羽化してきます (Table 1. “4”)。こうなったら、いったんエサビン中のハエを全てすてます。そして、8 時間以内に、新たに羽化した成虫の中から雌だけを集めます。羽化したての雄はすぐに交尾することができないので、この方法で集めた雌は処女のはずです。これらの雌を新しいエサビンに入れ、ラベルに日付と系統名を明記します。この雌を 3-5 日間隔離飼育しておき、幼虫が出現しなければ、処女とみなして交配実験に用います。なお、処女雌集めは culture を作ってから 15 日目以降には行わない\*ほうが良いでしょう (Table 1. “5”)。

\*culture が古くなるほど羽化個体数が減り、性比も雄に偏るので効率が悪いです。また、実験によっては、孫世代が混在する危険を避ける必要があります。

### 1.6. 交配とカウント

先ほどの処女雌と、交配したい系統の雄を、新しいエサビンへ一緒に入れます (Table 1. “6”)。すると、その日のうちに勝手に交尾して、受精卵を産みはじめます\*。1.5 と同様にしていくつかの culture を作っておきます (Table 1. “7”)。もちろん、全てのビンのラベルに、交配内容と作業日を明記しておきます。産卵させた瓶を数本用意できたら、産卵させた親ハエは捨てます\*\* (Table 1. “8”)。産卵後 10 日目から羽化してくる子世代のハエを、表現型と性別で分類してカウントします (Table 1. “9”)。短命な遺伝子型個体が死んでデータが歪むおそれがあるので、カウントはできるだけこまめに行ったほうが良いでしょう。孫世代が混在しないよう、カウントは産卵後 18 日目で終了します (Table 1. “10”)。具体的なデータの取り方は 2.1 を参照してください。

\*処女雌が少しだけ産卵することがありますが、これらは未受精卵のため、育つことはありません。

\*\*厳密な実験をする際は、全てのビンから親バエの死骸をひとつ残らず除去しておきます。

### 1.7. 衛生管理

使用後のエサビンはすみやかに処分しましょう。インキュベータ (恒温器) のなかに放置しておくと、カビやダニの温床となり、実験に悪影響がでます。また、実験前には手をよく洗い、作業台もよく拭いておきます。



## 2. 伴性遺伝

伴性遺伝とは、形質の発現が一方の性にかたよることです。キイロショウジョウバエの場合には、X 染色体上の劣性突然変異がへミ接合体である雄において発現することでもたらされることが多いです (1.1 参照)。実験でよく用いられる可視マーカー (目視でわかりやすい突然変異のこと) のうち伴性遺伝するものとして、白眼になる *white* (遺伝子記号 *w*) や、体色が明るくなり黄色味を帯びる *yellow* (遺伝子記号 *y*) などがあります。

### 2.1. 伴性遺伝の観察

伴性遺伝を観察するために、白眼系統の雌と、野生型系統 (赤眼) の雄を交配し、F1 の個体数を白眼・赤眼・雌・雄にわけてカウントしてみましょう。

(1) 実験計画を立てる： まずは、この交配の交配図を描いてみましょう (Figure 7)。つぎに、実験の予定をカレンダーに書き込んでいきます。記入用のカレンダーは本冊子の巻末にありますから (Supplement 1)、Table 1 を参考にして記入してください。はじめに、P 世代の ♀♀ を準備します。そのために白眼系統が少量産卵した **culture** を用意します (Table 1. “T”)。Table 1 では 4th **culture** まで作っていますが、必要に応じて増減してください。つぎに、これらの **culture** から処女雌集め (1.5 参照) をおこないます (Table 1. “V”)。集めた処女雌を数日間隔離飼育しても幼虫が現れず、確実に処女であることが判明した後に、交配 (1.6 参照) をおこないます (Table 1. “X”)。なお、羽化してから二週間以上経過した古い処女雌は、産卵数が少ないなどの問題がありますので、実験に使うのはできるだけ避けましょう。産卵後 10 日目からカウントを開始し、18 日目に完了します (Table 1. “C”)。

Figure 7.

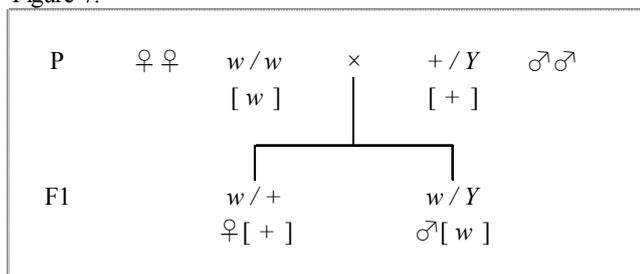
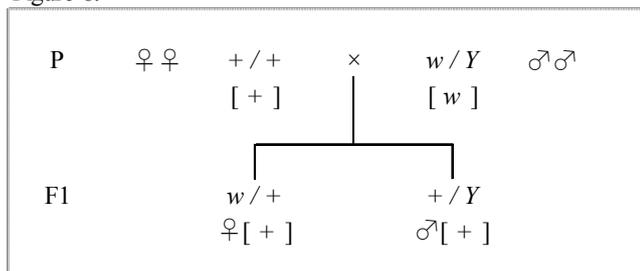


Figure 8.



(2) 実験データをとる： 続いて、カウントデータの記録方法について説明します。実験の証拠となるものですから、改竄できないように、鉛筆ではなく、必ず顔料インクのペンで記入しましょう。集計用紙は本冊子の巻末付録 (Supplement 2) を複写して用いるか、指導者が別紙で用意したものを利用してください。集計用紙の冒頭には交配内容、交配日、実験の目的、実験者氏名を明記してください (Table 2)。集計は、カウントした日付と culture 番号を明記して、個体の表現型と性別に分けておこないます (Table 2)。日付と culture 番号の情報は、実験行程の一部に不備があったとき、影響を受けたデータの洗い出しに利用できます。

課題 1 : F1 の個体数をカウントせよ。

課題 2 : F1 の赤眼雌と白眼雄の分離比を、カイ二乗検定を用いて検定せよ。

課題 3 : 例外的な表現型を持つ個体が出現した場合は、その原因を考察せよ。

課題 4 : F1 の雌雄を交配した場合の、F2 の理論的な分離比を推定せよ。

発 展 : F1 雌を白眼雄へ戻し交配した場合の、次世代の理論的な分離比を推定せよ。

## 2.2. 正逆交配

ある交配実験に対して、「雌に用いる系統」と「雄に用いる系統」を入れ替えた交配を、正逆交配 (reciprocal cross) といいます。2.1 に対する正逆交配を Figure 8 に示しました。この交配を行い、2.1 の結果と比較してみましょう。

課題 1 : F1 の個体数をカウントせよ。

課題 2 : F1 の分離比を 2.1 の結果と比較し、異なる場合はその理由を考察せよ。

課題 3 : 例外的な表現型を持つ個体が出現した場合は、その原因を考察せよ。

課題 4 : F1 の雌雄を交配した場合の、F2 の理論的な分離比を推定せよ。



### 3. 遺伝的組換え

遺伝的組換え (recombination, 組換え) は交叉 (crossing-over) の結果であり、変異の組み合わせを変化させます。有性生殖と組換えの存在意義は、進化生物学の重要なテーマとして、議論が続いています。組換えは、注目している 2 つの遺伝子座の染色体上での距離が近いほど、起こりにくくなります。逆に、同じ染色体上にあっても距離がとても離れている場合や、別々の染色体上に乗っている場合には、自由に組換わるので組換え価は理屈上、染色体一本あたり 0.5 (50%) になります。本実験では、第二染色体上にある *cinnabar* (遺伝子記号 *cn*) と *brown* (遺伝子記号 *bw*) という 2 つの遺伝子が、組み換えによって実際にはなればなれになる様子を観察します。*cn* は、複眼の色が朱色 (明るいオレンジ色) になる劣性突然変異です。*bw* は、複眼の色が暗色になる劣性突然変異です。ちなみに、野生型の複眼は赤色です。

#### 3.1. 組換え価の測定

Figure 9 にしたがって交配し、F<sub>2</sub> の個体数をカウントしましょう。まずは P において野生型系統の雌と *cn bw* 系統の雄を交配します。ちなみに、この二重変異体 (double mutant) は白眼になります。F<sub>1</sub> で処女雌集めを行い、この雌に再び *cn bw* 系統の雄を交配します (戻し交配)。こうして得られた F<sub>2</sub> には、組換え体が出現するはずですが。

課題 1 : F<sub>2</sub> の個体数をカウントし、組換え率 (組換え価) を求めよ。組換え率 = 組換え型配偶子 / 全配偶子

#### 3.2. 雄における組換え

Figure 10 にしたがって交配し、F<sub>2</sub> の個体数をカウントしましょう。3.1 では F<sub>1</sub> の雌を利用しましたが、3.2 では F<sub>1</sub> の雄を利用します。

課題 1 : F<sub>2</sub> の分離比を 3.1 の結果と比較し、異なる場合はその理由を考察せよ。

発展 : 3.1 と 3.2 の結果をふまえて、Figure 9 における F<sub>1</sub> の雌雄を交配 (♀♀ *cn bw* / + × ♂♂ *cn bw* / +) した場合の、F<sub>2</sub> の分離比について考えよ。

Figure 9.

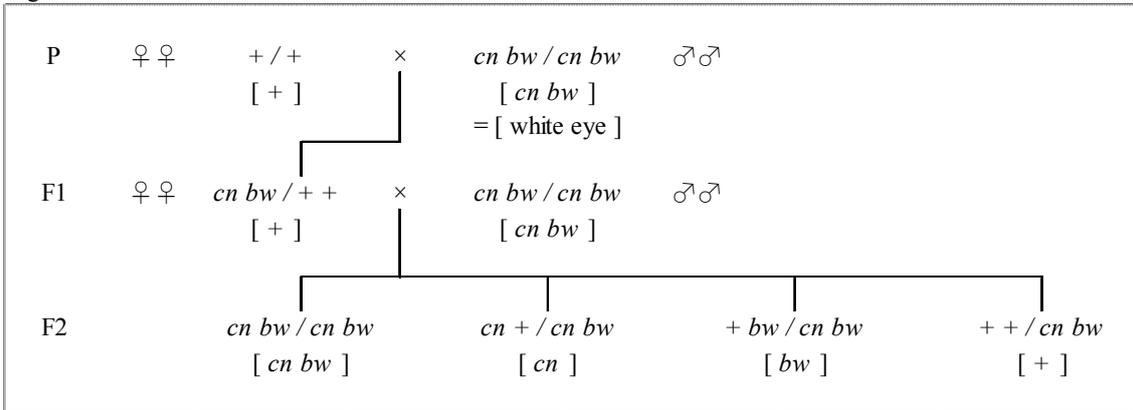
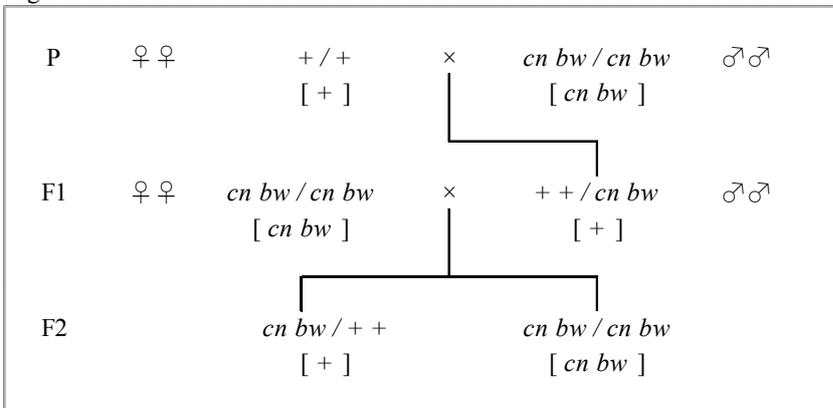


Figure 10.

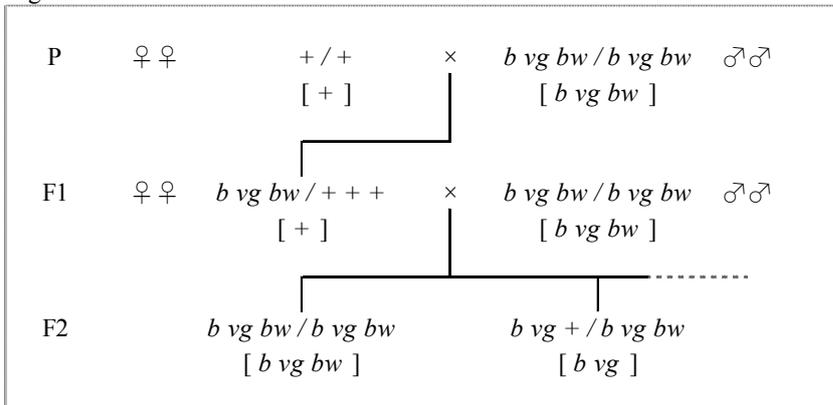


#### 4. 連鎖 (三点交雑)

三点交雑は三種類の可視マーカーの間で組換えを起こし、その遺伝子座の連鎖群、相対距離、染色体上に並んでいる順番、を明らかにする方法です。これにより、遺伝学的地図 (連鎖地図) が作成できれば、その生物種の遺伝学発展に大きく貢献します。Figure 11 のとおりに交配し、F2 の個体数をカウントしましょう。 *black* (遺伝子記号 *b*) は、体色が暗くなる突然変異で、羽化直後は判別がやや難しいです。 *vestigial* (遺伝子記号 *vg*) は、翅が小さく痕跡的になる突然変異で、その強度は遺伝的背景の影響を受けやすいです。 *brown* (遺伝子記号 *bw*) は、複眼の色が不透明な暗色になる劣性突然変異です。三種類とも、第二染色体上にあります。

課題 1 : F2 の分離比から、3つのマーカーの組換え率を求め、*b vg bw* が染色体上にならんでいる順番を考察せよ。

Figure 11.

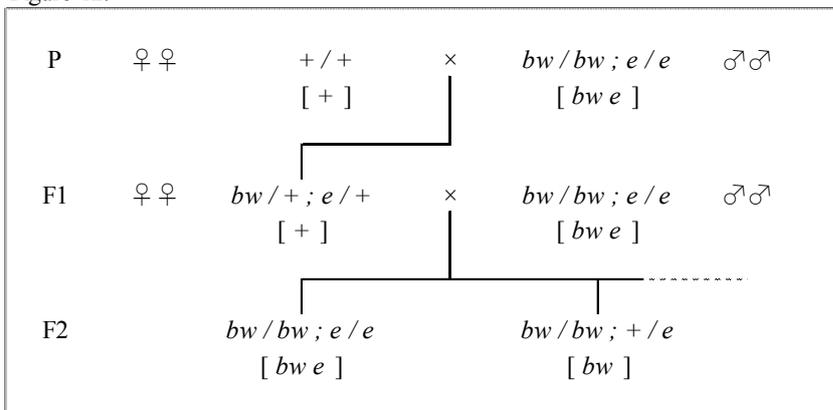


5. 独立

Figure 12 のとおりに交配し、F2 の個体数をカウントしましょう。*ebony* (遺伝子記号 *e*) は、体色が黒くなる突然変異で、ヘテロ接合でもうっすら暗い体色となり、第三染色体上にあります。

課題 1 : *bw* と *e* の間 (Figure 12) では独立の組み合わせが生じているか確かめよ。

Figure 12.



## 6. スクリーニング

スクリーニングとは、新たな突然変異を探すことです。集団中に含まれる突然変異は、進化の材料や、遺伝的荷重となるので、その調査は集団の進化を議論する上で重要です。また、突然変異は可視マーカーとして遺伝学の実験に利用することも、突然変異を起こした原因遺伝子の機能解析に利用することもできます。このように、突然変異を探し、調べることは生物学上意義深いことなのです。

### 6.1 劣性致死変異

劣性致死変異や劣性不妊変異は、実はありふれた突然変異です。しかし、目視で判別できないこと、子孫を残せない性質であることから、発見と系統維持が困難でした。それを可能としたのが、balancer染色体です。balancer染色体は組換えを抑制し、優性可視マーカーを持ち、ホモ接合で致死となります。この性質により、劣性致死変異や劣性不妊変異を系統維持することができます\*。第二染色体の代表的なbalancer染色体として *In(2LR)SM1* や *In(2LR)Pm* があります。この2つは *In(2LR)SM1/In(2LR)Pm* の形で系統維持され、実験に利用されます。*In(2LR)SM1* の優性可視マーカーは *Curly* (遺伝子記号 *Cy*) で、翅がカールします。*In(2LR)Pm* の優性可視マーカーは *Plum* (遺伝子記号 *Pm*) で、眼色が暗紫色になります。*In(2LR)SM1/In(2LR)Pm* は通称 *Cy/Pm* と呼ばれます。Figure 13 のように交配し、F1 における一匹の雄がもつ、一本の第二染色体を抽出してみましょう。

\*毎世代、ヘテロ接合体が子孫を残します。このような状態を、平衡致死や平衡不妊といいます。

課題1：抽出した染色体が劣性致死変異を持っていた場合の、F3 の分離比を考えよ。

課題2：抽出した染色体が劣性不妊変異を持っていた場合の、F3 の分離比を考えよ。また、この F3 中でランダム交配が起こった場合の F4 における分離比を考えよ。

課題3：任意の系統または任意の地域集団について、劣性致死変異をもつ第二染色体の頻度を測定せよ。この場合、Figure 13 の交配を 10 組以上、できるだけ多く行うこと。

## 6.2 修飾因子

世の中には、ある可視マーカー（仮に  $m$  とします）の表現型を強める変異（エンハンサー、 $E(m), e(m)$ ）や、弱める変異（サプレッサー、 $Su(m), su(m)$ ）があります。これらを修飾因子（モディファイアー）といいます。可視マーカーを持った系統に、任意の系統を交配し、この任意系統中から、可視マーカーの修飾因子を探してみましょう。任意の系統中に修飾因子があるかどうか、あったとしてもゲノムのどこに何個あるか、それが優性か劣性かは、あらかじめ知るよしもありません。Figure 14 は可視マーカーとして  $vg$ 、修飾因子は第三染色体に劣性のものが一種類あった例を示しています。 $vg$  以外にも、様々な可視マーカーで挑戦してみましょう。

課題 1 : Figure 14 を参考にして、任意の可視マーカーをもった系統に、任意の系統を交配せよ。その結果、子孫の中に可視マーカーの様子が元の系統とは異なる個体が出現した場合は、修飾因子が見つかったものとみなし、その差異をスケッチして記録せよ。

課題 2 : 修飾因子を発見した場合、数世代にわたって選抜を続け、固定するかどうか確かめよ。

## 6.3 可視突然変異の多様性

野外集団中には大量の遺伝的変異が保有されています。それを目視確認するために、Figure 15 にしたがって近親交配し、突然変異（仮に  $m$  とします）をさがしてみましょう。まず、野外から採集した雌を、一匹ずつ隔離飼育します。野外採集した雌はふつう交尾済みなので、ここから子孫が生まれ、系統化することができます。これをたった一頭の雌に由来する系統なので、単一雌系統といいます。採集してきた雌（あるいはその交尾相手の雄）が劣性の突然変異をヘテロ接合で保有していた場合には、得られた F1 の雌雄を姉弟交配することで、F2 中に突然変異体を見出すことができます。突然変異体を発見した場合は、これらを数世代選抜して固定し、系統化します。

課題 1 : 任意の地域集団中に見出された遺伝的変異を記録せよ。

課題 2 : 得られた変異体を、類似した既知変異の系統と交配し、相補性検定を行って遺伝子座を同定せよ。相補性検定では同定できない場合は、まず伴性遺伝するかどうか調べ、第一染色体上にあるのか判別せよ。第一染色体上にない場合は、バランス染色体を利用して、第二染色体と第三染色体のどちらに位置しているか判別せよ。

Figure 13.

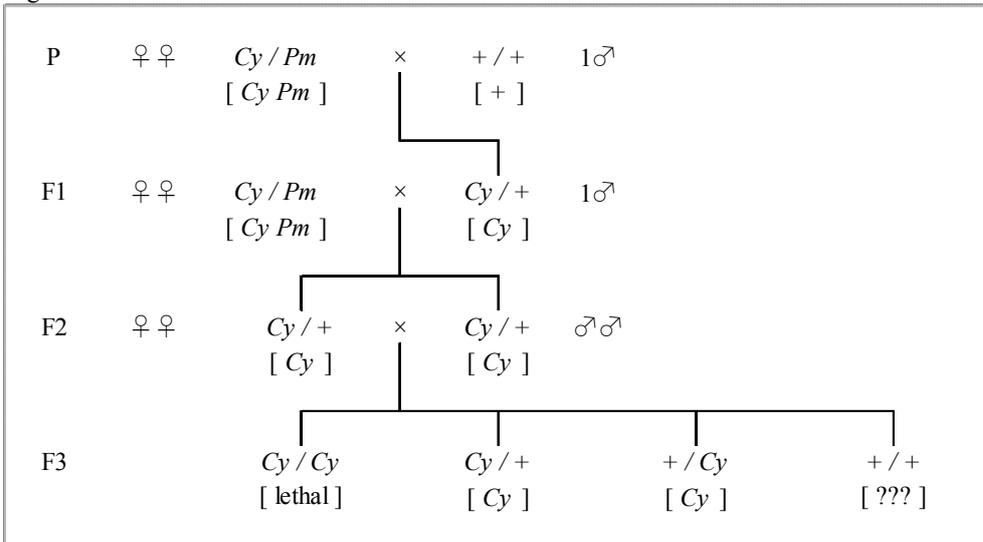


Figure 14.

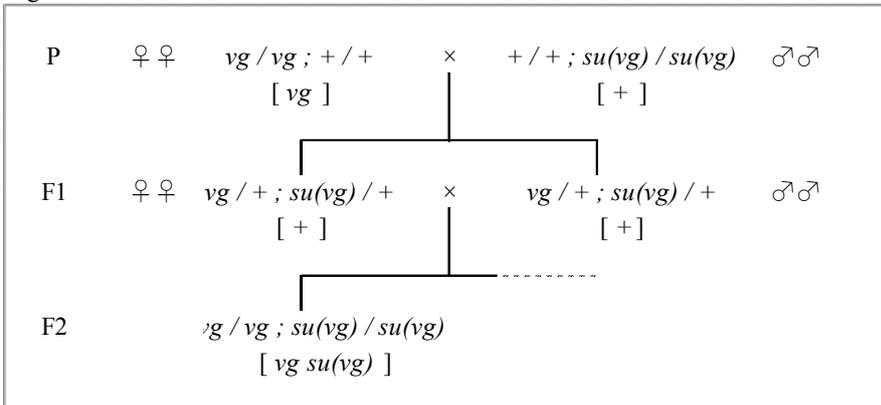
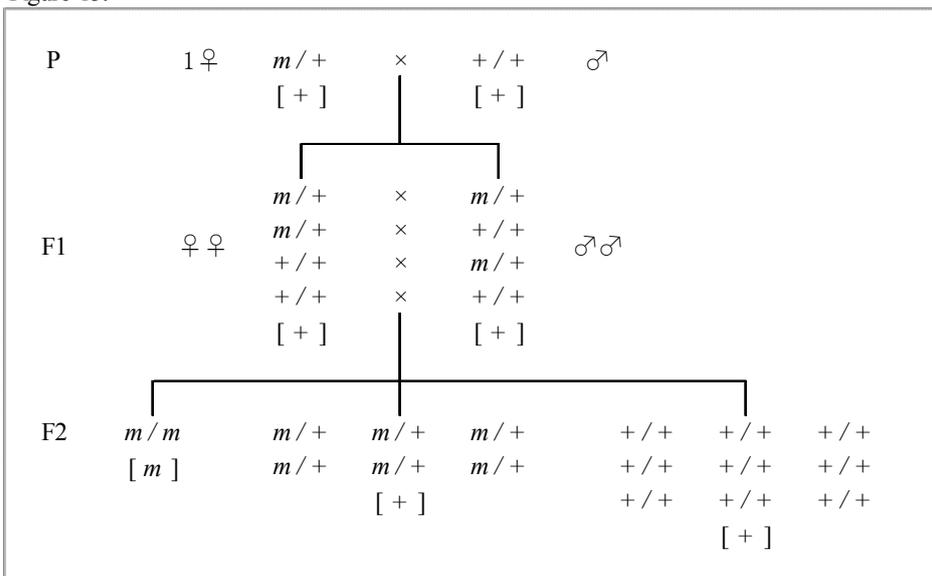


Figure 15.



## 7. 生殖隔離と雑種

種分化は進化生物学の重要なテーマです。一つの種が、二つの種に分化するためには、生殖隔離が必要です。また、二つの種が出会ったとき、混ざり合っただけで一つの種になってしまうのも生殖隔離があるからです。住んでいる場所が異なったり、フェロモンや求愛歌・求愛ダンスが異なるために、二種間での交配が回避されることを、交配前隔離といいます。うっかり交配してしまった場合に、雑種が致死や不妊となって子孫がのこらないことを、交配後隔離といいます。

このような生殖隔離の調べるのに、キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) とオナジショウジョウバエ (*D. simulans*) はとても便利な実験系を提供してくれます。この二種は見た目がよく似た近縁種ですが、求愛行動が異なり、交配前隔離の研究をすることができます。また、大量の交配を試みれば、まれに雑種を得ることができるので、交配後隔離の研究をすることもできます。さらに心強いのは、みなさんがここまで勉強してきたように、高度に発展したキイロショウジョウバエの遺伝学を種分化研究に持ち込める点です。

### 7.1. 交配前隔離

課題1：キイロショウジョウバエの処女雌（複数頭）と、キイロショウジョウバエの雄（複数頭）を一本のビンに入れて、求愛行動を観察・記録せよ。また、交尾が成立するまでの時間を測定せよ。余裕があれば、雌を1頭にした実験も行い、結果を比較せよ。

課題2：オナジショウジョウバエの処女雌（複数頭）と、オナジショウジョウバエの雄（複数頭）を一本のビンに入れて、求愛行動を観察・記録せよ。また、課題1と比較して、異なる点があれば挙げよ。

課題3：キイロショウジョウバエの処女雌（複数頭）と、オナジショウジョウバエの雄（複数頭）を一本のビンに入れて、求愛行動を観察・記録せよ。

課題4：課題3の正逆交配を行え。つまり、オナジショウジョウバエの処女雌（複数頭）と、キイロショウジョウバエの雄（複数頭）を一本のビンに入れて、求愛行動を観察・記録せよ。

## 7.2. 交配後隔離

ここでは雑種の作出方法を説明します。まず、キイロショウジョウバエの処女雌（大量）と、オナジショウジョウバエの雄（大量）を一本のビンに入れて飼育します。culture をこまめに観察し、幼虫（雑種）が出現したら、種間交配が成功したとみなし、2nd culture 以降も作っておきます。雑種は涼しい方がうまく育つので、雑種幼虫が蛹化する前に 18°C のインキュベータに移します。春や秋なら、室内の涼しいところに置いてよいでしょう。

課題 1：上記にしたがって雑種を作出し、この形態を観察せよ。また、雌雄比を求めよ。

発展：正逆交配を行い、課題 1 の結果と比較せよ。



												Date	Days
1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th		
													1
													2
													3
													4
													5
													6
													7
													8
													9
													10
													11
													12
													13
													14
													15
													16
													17
													18
													19
													20
													21
													22
													23
													24
													25
													26
													27
													28
													29
													30
													31
													32
													33
													34
													35
													36
													37
													38
													39
													40
													41
													42
													43
													44
													45
													46
													47
													48
													49
													50
													51
													52
													53
													54
													55
													56



												Date	Days
1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th		
													57
													58
													59
													60
													61
													62
													63
													64
													65
													66
													67
													68
													69
													70
													71
													72
													73
													74
													75
													76
													77
													78
													79
													80
													81
													82
													83
													84
													85
													86
													87
													88
													89
													90
													91
													92
													93
													94
													95
													96
													97
													98
													99
													100
													101
													102
													103
													104
													105
													106
													107
													108
													109
													110
													111
													112

