

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

по дисциплине
(модулю)

Методы генетического анализа и их использование в животноводстве

Код и направление
подготовки

36.06.01 – Ветеринария и
зоотехния

Наименование профиля / программы
подготовки научно-педагогических
кадров в аспирантуре/магистерской
программы / специализация

06.02.07 – разведение,
селекция и генетика с.-х.
животных

Квалификация
(степень) выпускника

Исследователь.
Преподаватель-
исследователь

Факультет

Зоотехнологии и
менеджмента

Кафедра – разработчик

Разведения с/х животных и
зоотехнологий

Ведущий преподаватель

Щербатов В.И.

Краснодар 2015

ЛЕКЦИЯ №1

Введение

Генетические задачи решаются легко только тогда, когда они предварительно уже решены другими. Поэтому необходимо предостеречь тех, кто впервые приступает к генетическому анализу, от уныния и пессимизма, если их первые опыты окажутся неудачными.

А. С. Серебровский

Генетический анализ является методологической основой генетики. Его первым специфическим методом, который предложил И. Г. Мендель в 1865 г., был гибридологический метод анализа отдельных признаков. Впервые определение генетического анализа как "системы опытов, наблюдений и вычислений, имеющих целью разложение свойств (признаков) организма на отдельные наследственные элементы, "отдельные признаки", и изучение свойств соответствующих им генов" было дано одним из основоположников генетического анализа Александром Сергеевичем Серебровским в книге "Генетический анализ" (1970). Она до сих пор служит единственным пособием, в котором рассматриваются сложные вопросы анализа наследования признаков организмов и описываются некоторые его методы. Однако книга была написана в 20-40-е гг., задолго до установления генетической роли ДНК, расшифровки тонкой структуры и молекулярно-биохимических основ действия генов, до выяснения механизмов мутирования и т. д. Эти открытия, а также применение различных факторов, многократно повышающих частоты мутирования генов, в значительной мере увеличили разрешающую способность генетического анализа, способствовали дальнейшей разработке его теории и новых методов.

Теория генетического анализа связана с построением логических, математических, экспериментальных моделей, помогающих понять суть генетических процессов и явлений. Арсенал методов генетического анализа в настоящее время гораздо богаче и разнообразней, чем во времена написания книги А. С. Серебровским. Это - использование, наряду с классическим методом менделевского анализа, гибридизации соматических клеток, молекулярно-генетических методов; работа с селективными средами, создание специальных линий-анализаторов и пр. Принципы и методы генетического анализа сейчас широко используются как для решения собственно генетических задач, так и в таких науках, как молекулярная биология, эмбриология, биология развития; при составлении селекционных программ, а также в животноводстве.

1.1. Предмет генетического анализа. Понятие "признак" в генетике

Предметом изучения в генетическом анализе является фенотип организма, его отдельные признаки. *Признаком* в генетике считают любое свойство, любую особенность, по которым особи могут отличаться друг от друга. Это - морфологические, биохимические, физиологические, анатомические различия, чувствительность или устойчивость кразличного рода воздействиям, особенности поведения и т. д.

По генетической структуре признаки можно разделить на элементарные (простые) и сложные. Подобно тому, как генотип особи можно разложить на элементарные наследственные единицы - гены, фенотип особи также можно представить как совокупность элементарных единиц - "фенов", каждый из которых контролируется аллелями одного гена. *Фен есть простой, элементарный признак.* Сложные признаки контролируются несколькими генами, представляя собой определенное сочетание фенов. Очевидно, что для того чтобы понять, с каким признаком мы имеем дело, необходимо установить число генов, его контролирующих. Очевидно также, что об элементарности признака можно говорить после изучения природы изменения (мутации) на уровне конечного продукта действия гена, на уровне фермента, белка, ибо, даже получив расщепление 3:1, мы не можем утверждать окончательно, что имеем дело с одним геном,

а не с двумя, тесно сцепленными. Следовательно, *одна из основных задач анализа фенотипа - это разложение признака на элементарные признаки - фены.*

Хотя развитие и проявление каждого признака находится в конечном итоге под контролем всего генотипа, **изучение элементарных признаков** позволяет выявить связь между геном и феном, изучать функции и структуру каждого гена, его плейотропные эффекты и изменчивость. **Анализ сложных признаков** проливает свет на механизм неаллельных взаимодействий, позволяет исследовать на биохимическом уровне этапы метаболизма, изменение которых приводит к тому или иному фенотипическому проявлению изучаемого признака.

Генетические коллекции, их роль и использование в генетическом анализе

Генетический анализ может проводиться только при наличии наследственно различающихся форм и тем успешней, чем больше различных наследственных вариантов имеется у исследователя. Поэтому на первом этапе генетического анализа необходимо создание **генетических коллекций**, представляющих собой совокупность форм какого-либо вида, которые характеризуются наследственными различиями по одному или нескольким признакам. Генетические коллекции - основа наших знаний о наследственной изменчивости, норме реакции отдельных генотипов и т. д. Образцы коллекций служат эталоном при идентификации новых мутаций и источником ценного исходного материала для селекции. Частная генетика любого вида строится на изучении (и создании в процессе изучения) генетической коллекции.

Значение генетических коллекций особенно возрастает в наше время в связи с тем, что современные селекционные программы основываются на использовании узкоспецифических сортов и пород, что уменьшает генетическую изменчивость культивируемых видов и ведет (а в ряде случаев уже привело!) к потере ценного генетического материала. Поэтому необходима консервация местных сортов и пород и сохранение диких видов животных и растений.

Методы создания и хранения коллекционного материала зависят от биологии размножения, жизненного цикла и других биологических особенностей вида.

Среди растений по-разному создаются и хранятся коллекции однолетних и многолетних культур. В коллекциях **однолетних перекрестноопыляющихся растений** чаще всего собраны спонтанные мутанты, а также формы, выделенные из популяций при инбридинге. Индуцированный мутагенез у этих растений практически не используется, так как выделению мутантов и анализу их по потомству препятствуют существующие у них **генетические системы самонесовместимости. У растений-самоопылителей** коллекции составляются из сортов, инбредных линий; для получения новых мутаций широко применяется индуцированный мутагенез.

Основным материалом для хранения в коллекциях являются **семена**, которые пересеваются с определенной периодичностью.

В генетических коллекциях **многолетних растений**, например плодовых культур, сохраняется живой материал - дикие формы и культурные сорта, подвой дикарей и т. п. Сложности создания и сохранения коллекционных образцов у многолетних культур связаны с большой продолжительностью их жизненного цикла, гетерозиготностью и полиплоидностью многих видов, склонностью их к апомиксису, низкой всхожестью семян и др.

Коллекции **животных** могут быть представлены породами, линиями, культурами тканей и клеток. Достаточно широко проводится также хранение спермы, ооцитов и эмбрионов.

В коллекциях **грибов и бактерий** сохраняют генетически маркированные штаммы (ауксотрофные мутанты, мутанты, дефектные по системам репарации, рекомбинации и пр.).

В коллекциях содержат формы, различающиеся или сходные фенотипически по самым разнообразным признакам, имеющие разное происхождение. Это могут быть

генные, хромосомные или геномные мутации. Для решения специальных задач на основе коллекционного материала создаются и сохраняются особые **тестерные формы, линии-анализаторы** с различными рецессивными или доминантными маркерами, с перестройками хромосом - делениями, инверсиями, транслокациями, перемещающимися генетическими элементами, препятствующими прохождению кроссин-говера, или меняющими локализацию и активность того или иного гена; серии моно-, три- и нуллисомиков по разным хромосомам и т. п.

Генетические коллекции создаются обычно на базе селекционно-генетических центров и институтов, а также в университетах.

Крупнейшим в мире центром по сохранению наследственного разнообразия многих культур растений является Всесоюзный институт растениеводства им. Н. И. Вавилова. Он имеет опорные пункты и опытные станции в разных регионах нашей страны, где проводят исследования по выявлению нормы реакции тысяч образцов по каждой культуре.

Старейшей коллекцией среди растений следует называть коллекцию **кукурузы** в США. Она содержит разнообразные образцы с мутациями, контролирующими мутабельность и экспрессивность генов, поведение хромосом в мейозе и митозе; ферментные системы; структуру эндосперма; образование и распределение хлорофилла; структуру различных элементов генеративной системы; ядерные и неядерные мутанты и т. п. В этой коллекции собрано более 3 тыс. образцов, выявленных учеными Америки и других стран.

В университетах США есть также коллекции **ячменя, анеуплоидных пшениц** и других растений. В ФРГ создан центральный семенной банк **арабидопсиса**, содержащий 149 природных рас и более 500 мутантов. Подобные банки организованы и в других странах - США, Англии, Испании, Нидерландах и др.

В СССР, в ЛГУ, создана уникальная по объему и возможностям использования при изучении генетики озимой и яровой **ржи** коллекция, которая содержит более 100 автостерильных форм, отличающихся от стандартного типа по одному или нескольким признакам, а также более 300 автофертильных линий, многие из которых также имеют генетические маркеры. Кроме того, ЛГУ имеет коллекции **земляники, редиса, ячменя**. В Молдавии находятся крупнейшие коллекции **томатов, кукурузы** и других культур. В Ленинграде Всесоюзный институт защиты растений собрал коллекцию **микологического гербария**, необходимую для изучения природы иммунитета у растений. Значимость этой коллекции трудно переоценить, так как ведущие

сельскохозяйственные культуры в настоящее время поражаются более чем 1500 заболеваниями, возбудителями которых являются 50 тысяч видов грибов. При этом некоторые возбудители способны поражать несколько видов растений. В коллекции хранятся гербарные образцы пораженных растений с их патогеном и чистые культуры паразитов. В ней собрано около 150 тыс. образцов грибов; более 600 тыс. образцов патогенов находятся в соответствующих национальных коллекциях США.

Коллекции разновидностей **мыши**, одного из наиболее изученных видов млекопитающих, собраны в Джексоновской лаборатории в США, в Институте цитологии и генетики СО АН СССР и в других странах. Эти коллекции, содержащие, помимо обычных морфологических и прочих мутантов набор линий, различающихся по генам тканевой совместимости (более 200), используются не только для решения задач генетики, но и в экспериментальной онкологии.

Крупнейшие коллекции одного из ведущих модельных объектов генетических исследований - **дрозофилы** - имеются в США, где создано два центра линий на базах университетов, есть Европейский центр линий в Швеции.

В ряде стран созданы **коллекции кур, пушных зверей** и др.

Существуют также **коллекции грибов и бактерий**, содержащих штаммы, различающиеся по морфологии колоний, биохимическим мутациям (ауксотрофы), устойчивые к антибиотикам и др. - в США, Японии, СССР.

Банки клеточных культур человека и животных приобретают в настоящее время большое значение в связи с возможностью сохранения в них гибридом, возникающих при слиянии нормальных клеток лимфоцитов с миеломными клетками, придающими гибридомам свойства миеломы - способности неограниченного роста. **Гибридомы** используются для получения моноклональных антител, т. е. антител, продуцируемых потомками одной клетки. Они обладают высокой специфичностью и направлены против одной антигенной детерминанты. Клеточные культуры применяют для получения биологически активных веществ высокой чистоты, для определения антигенов гистонесовместимости при трансплантации и пр. Среди банков клеточных культур, сохраняемых путем консервации в жидком азоте, можно назвать американскую коллекцию типовых культур; культуры клеток человека, полученные от нормальных и больных людей с наследственными патологиями, клеточные линии мышинных опухолей.

Наконец, благодаря развитию методов получения рекомбинантных молекул ДНК, создаются **банки генов**, которые представляют собой наборы клонов бактерий, содержащих рекомбинантные плазмиды или вирусы, несущие фрагменты генома определенного вида.

Сведения о коллекциях систематически публикуются в виде каталогов и служат в качестве справочников при подборе исходного материала для генетических исследований и в селекционной работе. В них дан перечень наименований и символов генов, описание типов их взаимодействия, характеристика плейотропного действия отдельных генов, жизнеспособности мутантов; приводятся генетические и цитологические карты, характеристика образцов и способов их размножения и поддержания в коллекции; список основных работ по генетике и цитогенетике объекта. Например, систематически издается каталог мировой коллекции ВИРа, опубликовано более 350 выпусков; публикуется ежегодник ассоциации генетиков по кукурузе "*MaizeGeneticCooperationNewletter*"; дважды в год издаются каталоги по мутантным и инбредным линиям мышей - "*Inbredstrains of Mice*" в США и "*MauseNewletter*" в Англии. Ежегодное издание бюллетеня *DrosophilaInformationService (DIS)* публикует списки генетических коллекций дрозофилы лабораторий всего мира и их адреса, списки генетиков, работающих с дрозофилой; сообщает сведения о новых мутациях, о текущих работах. Необходимые для работы образцы коллекции обычно выписываются исследователями из соответствующих центров и лабораторий.

ЛЕКЦИЯ №2

Задачи генетического анализа

Изучение наследования отдельных признаков

Изучение наследования отдельных признаков - важнейшая часть генетического анализа, позволяющая определить тип наследования (ядерное или внеядерное), установить гены, по которым различаются исходные формы, и общее число генов, контролирующих данный признак, выявить типы взаимодействия генов и характер их наследования. В случае обнаружения внеядерного наследования выясняют, с какими органеллами (пластидами, митохондриями, цитоплазмой) или другими компонентами клетки (плазмидами, вирусами и пр.) оно связано.

Локализация генов

В решение этой задачи входит определение группы сцепления для вновь обнаруживаемых мутаций, изучение совместного наследования нескольких признаков, локализация генов в группе сцепления с помощью уже картированных генов, построение генетических, цитологических, физических (рестриктных) карт хромосом. Арсенал методов, применяемых для локализации генов, достаточно велик. Это метод

гибридизация с использованием специально создаваемых линий, маркированных по разным хромосомам рецессивными или доминантными мутациями или перестройками хромосом; картирование на основе митотического кроссинговера; гибридизация соматических клеток; рестриктное или физическое картирование; гибридизация *in situ*.

Анализ структуры и функции гена

Включает этап установления аллельности вновь возникших и уже изученных мутаций, затрагивающих изучаемый признак, локализацию мутаций внутри гена (внутригенное картирование). Основные методы изучения - гибридологический, метод делеционного картирования; выделение, клонирование и секвенирование ДНК, а также рестрикционный анализ. Для изучения структуры генов эукариот применяют также электронно-микроскопические наблюдения гетеродуплексов между зрелыми мРНК и соответствующими генами.

Геномный анализ

Проводится только на растениях для изучения генетического потенциала родов на основе оценки степени их родства. Единицей анализа является **геном** - исходное гаплоидное число хромосом, качественно специфичное для данного вида. Родство геномов определяется на основе наличия **гомологии** или **гомеологии** хромосом при отдаленной гибридизации и полиплоидии. Гомологичные хромосомы конъюгируют между собой (синdez) в профазе мейоза и образуют биваленты. Гомеологичные хромосомы неспособны конъюгировать в мейозе, но могут функционально взаимозаменять друг друга в процессе онтогенеза растений. Это хромосомы менее близких видов и родов. Виды, обладающие гомеологичными геномами, скрещиваются между собой, но дают бесплодные гибриды.

Основными методами геномного анализа являются отдаленная гибридизация, а также цитогенетический анализ, с помощью которого изучают конъюгацию хромосом в мейозе у гибридов для определения их гомо- и гомеологии. Используют также метод полиплоидии, биохимические методы и др.

Анализ генетической структуры популяций

Выявление генетической структуры популяций начинается с изучения их **генетической гетерогенности** при разных способах размножения. Для этого используют метод гибридологического анализа на основе инбридинга и изучения потомков инбредных поколений, в которых выявляются рецессивные гены, часто скрытые в популяциях в гетерозиготах. Поскольку число и форма хромосом - это систематические видовые признаки, то для изучения хромосомного полиморфизма в популяциях исследуют кариотипы разных видов и их гибридов. Частоты генотипов, генов и аллелей в популяциях определяются на основе анализа результатов свободных скрещиваний и инбридинга. Для оценки полиморфизма широко используют биохимические методы, такие, как электрофорез в гелях и др.

Анализ мутаций

Заключается в изучении спектра и частоты мутаций, возникающих спонтанно и при индуцированном мутагенезе. В зависимости от объекта применяют разные методы этих оценок. У низших эукариот для выделения и количественного учета мутаций используют методы отпечатков и селективные среды, молекулярно-генетические методы. У диплоидов рецессивные мутации могут проявляться только в поколениях. Для их анализа создают специальные линии-тестеры, маркированные различными мутациями и перестройками хромосом, препятствующими прохождению кроссинговера; используют цитогенетические методы и др.

1.3. Логика, принцип и этапы генетического анализа. Методы анализа

В основе генетического анализа лежит следующая **логика**: разложение признаков на фены, установление гена; от гена - к генному продукту и выяснению молекулярных механизмов его действия, к расшифровке генетического контроля метаболических путей, обуславливающих развитие изучаемого признака.

Принцип анализа - получение наследственно различающихся по изучаемым признакам форм и изучение этих различий на разных уровнях: организменном, клеточном, молекулярном, популяционном.

Основная задача первого этапа анализа - изучение наследования отдельных признаков для установления гена.

Следующий этап анализа предполагает локализацию установленных генов в группе сцепления и картирование хромосом.

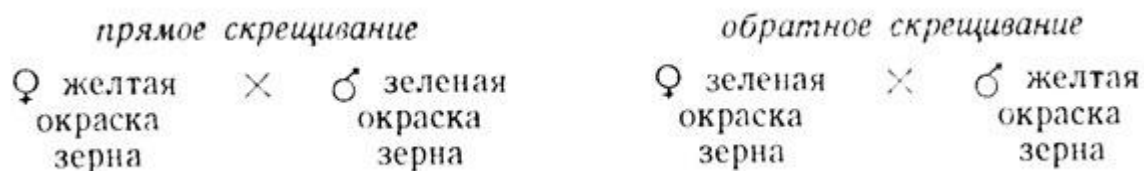
Расшифровка биохимических нарушений метаболизма в результате действия установленных генов, выяснение механизмов их действия и функций и анализ структуры генов - **завершающий этап** изучения генетического контроля отдельных признаков.

Основываясь на данных о наследовании отдельных признаков, решают другие задачи генетического анализа: изучают генетическую структуру организмов, проводят геномный и популяционный анализ и др. На каждом этапе могут использоваться разные методы анализа.

1.3.1. Гибридологический метод. Типы скрещивания. Системы скрещивания между несколькими формами

Основной специфический метод генетического анализа - гибридологический метод - создан и разработан И. Г. Менделем в 1865 г. Его основные особенности заключаются в следующем. Для скрещивания подбираются (или создаются) гомозиготные исходные формы, различающиеся по одному или нескольким альтернативно, контрастно проявляющимся признакам. Проводится **индивидуальный анализ потомства** от каждого скрещивания **в ряду поколений**. В каждом поколении ведется строгий **количественный** учет всех потомков по всем изучаемым признакам, причем **отдельно по каждому признаку**, независимо от других. Это - один из важнейших **принципов** анализа расщеплений. Обычно анализируют два или три (иногда больше) поколения реципрокных скрещиваний.

Реципрокные скрещивания - система из двух скрещиваний (прямое и обратное). В прямом скрещивании признак в одном из своих проявлений вносится со стороны матери, в обратном - со стороны отца. Например:



(Прямым можно называть любое из этих скрещиваний.)

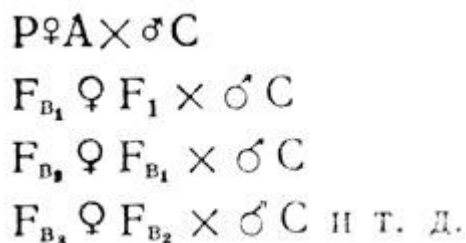
Уже по результатам F_1 таких скрещиваний в большинстве случаев можно определить характер генетической природы признака (ядерная или внеядерная), выявить сцепление признака с полом. Анализ расщеплений в F_2 служит основой для предложения гипотез о числе генов, типе их взаимодействия и характере наследования.

Анализирующее скрещивание - скрещивание с гомозиготной рецессивной формой, которая служит анализатором, так как образует только один тип гамет с рецессивными аллелями, на фоне которых выявляются аллели анализируемой особи. На основе расщепления в F_a можно определять все, что и в F_2 , кроме типа взаимодействия генов, но на меньшей по сравнению с F_2 выборке. Его используют для анализа наследования при сцеплении, для картирования хромосом и оценки частоты гамет, образуемых гетерозиготным родителем.

Возвратные скрещивания F_6 - скрещивания потомков с одним из родителей. В ряде случаев оно может оказаться анализирующим. Для решения ряда задач ставятся системы скрещиваний с участием нескольких форм.

Насыщающие или поглотительные скрещивания - последовательные скрещивания женских потомков нескольких поколений возвратных скрещиваний, имеющих

цитоплазму, пришедшую от матери в исходном скрещивании, с исходной отцовской формой.



Эти скрещивания применяются, в частности, при изучении материнского эффекта цитоплазмы и других типов неядерного наследования.

Циклические скрещивания - система скрещиваний многих форм, различающихся или сходных по одному признаку, друг с другом во всех сочетаниях. Применяются для выявления генетического контроля признаков.

В *диаллельных скрещиваниях* также используется много форм, но анализ не всегда проводится по полной схеме циклического скрещивания. Часто он включает лишь часть этих скрещиваний. Например, исследует только результаты прямых скрещиваний либо только обратные скрещивания и т. д. При этом родительские линии могут быть специально отобраны для проведения их оценки, либо они случайно выбираются из некоторой популяции, параметры которой нужно оценить на основании этих скрещиваний. По результатам этих скрещиваний выявляют комбинационную ценность инбредных линий, которая проявляется в варьировании величины гетерозиса по отдельным гибридным комбинациям. Комбинационная ценность одной и той же линии может быть выражена средней величиной гетерозиса, наблюдаемого у всех гибридных комбинаций с этой линией - общая комбинационная способность, либо степенью гетерозиса в конкретной комбинации - специфическая комбинационная способность. Поэтому в диаллельных скрещиваниях часто анализируются результаты только первого гибридного поколения.

1.3.2. Анализ родословных, близнецовый, цитогенетический, молекулярно-генетические, биохимические, генно-инженерные и другие методы анализа, их применение

В тех случаях, когда невозможно проводить скрещивания, применяют другие методы анализа.

При изучении наследования признаков у человека или при **работе** с мало плодовитыми животными используют **генеалогический метод или метод анализа родословных**.

При анализе родословных проводят описание фенотипов в семьях у нескольких поколений, учитывая проявление изучаемого признака у членов семьи разного пола, число потомков с этим признаком и лишенных его проявления, а также родственные отношения между всеми членами родословной. На основе этого анализа устанавливают, наследуется ли признак, одним или многими генами контролируется различие, сцеплен ли признак с полом, доминантность и рецессивность его проявления (в том случае, если наследование моногенное).

В основе **близнецового метода** лежит сопоставление сходства (конкордантности) и различий (дискордантности) по изучаемому признаку между близнецами в группах моно- и дизиготных близнецов и в популяции. Повышенная конкордантность монозиготных (однойцевых) близнецов по сравнению с дизиготными (двуяйцевыми) служит указанием на наследственный характер признака. Таким образом, метод позволяет выявить, наследуется ли признак, и оценить относительную роль факторов среды в его проявлении.

При обнаружении отклонений в расщеплениях, причина которых может быть связана с нарушением процесса образования гамет или других условий менделевских расщеплений, используют **цитогенетический метод**. Для выяснения причин отклонений

изучают протекание мейоза и митоза, особенности конъюгации и расхождения хромосом, хиазмообразование, разные стадии споро- и гаметогенеза; оплодотворение и т. д. (см. гл. III). Цитогенетические методы используют и для решения других задач генанализа. С помощью светового и электронного микроскопирования, цитофотометрии, гибридизации *insitu* изучают структурную организацию хромосом и их функционирование, роль в процессах дифференцировки; строят цитологические карты хромосом. Цитогенетические методы применяются для анализа структурных изменений хромосом, их классификации, изучения поведения в мейозе; для идентификации хромосом и кариотипирования; наконец, цитогенетические методы применяют как экспресс-методы оценки действия различных факторов среды (цитогенетический мониторинг).

Молекулярно-генетические и биохимические методы применяют для изучения механизмов генетических процессов - репликации, рекомбинации, репарации, транскрипции и мутагенеза; выявления генетического полиморфизма белков; для изучения механизмов действия отдельных генов и межгенных взаимодействий, в частности генетической супрессии; выделения и клонирования генов; физического картирования хромосом и т. п.

Среди этих методов можно назвать электрофорез белков и ферментов, хроматографические методы фракционирования нуклеиновых кислот, высокоскоростное центрифугирование и др. Благодаря совершенствованию методов создания рекомбинантных ДНК на основе химических и энзимологических методов и использованию рестриктаз (рестрикциионныхэндонуклеаз), расщепляющих специфические последовательности в ДНК, проводится определение точной нуклеотидной последовательности в ДНК (секвенирование), создаются библиотеки генов и т. п.

Метод гибридизации соматических клеток, позволяющий получать внутри- и межвидовые гибриды соматических клеток, используют для определения группы сцепления и картирования хромосом, для исследования процессов активации генома покоящейся клетки, анализа природы злокачественной трансформации клеток под действием опухолеродных вирусов, для изучения регуляции генов в клетках эукариот и т. д. Для определения локализации гена в хромосоме применяют также метод гибридизации нуклеиновых кислот *insitu*.

Таким образом, многообразные задачи генетического анализа решаются с помощью различных методов.

Литература

1. Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика. М., 1984. С. 154-159, 161-466.
2. Генетические коллекции растений // Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. 1983. Т. 2. С. 3-20, 28-52, 53-78.
3. Генетические коллекции микроорганизмов // Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. 1982. Т. 1. С. 37-51, 94-95, 133-138, 178-181, 212-217.
4. Генетические коллекции животных // Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. 1984. Т. 3. С. 26-47, 50-64, 136-164.
5. Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев, 1983. С. 401, 535-539.
6. Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М., 1965. С. 9-14.
7. Раддл Ф., Кучерланти Р. Гены человека и гибридные клетка / Молекулы и клетки. М., 1977. Вып. 6. С. 97-112.
8. Серебровский А. С. Генетический анализ. М., 1970. С. 5-13.
9. Смирнов В. Г., Суриков И. М. К вопросу о методах установления отдаленных генетических гомологий // Генетика. 1972. Т. VIII, № 1. С. 148-156.
10. Турбин Н. В., Хотылева Л. В., Тарутина Л. А. Диаллельный анализ в селекции растений. Минск, 1974. С. 6-10, 12-35.

11. *Фадеева Т. С., Соснихина С. П., Иркаева Н. М.* Сравнительная **генетика** растений. Л., 1980. С. 30-39, 58-60, 89-124.
12. *Фадеева Т. С.* **Генетика** земляники. Л., 1975. С. 7-38.
13. *Хатт Ф.* **Генетика** животных. М., 1969. С. 277-280.
14. *Чадов Б. Ф.* Генетическая символика // Проблемы **генетики** в исследованиях на дрозофиле. Новосибирск, 1977. С. 90-111.

ЛЕКЦИЯ №3

Значение биологических особенностей объекта для генетического анализа

Биологические особенности объекта исследований лежат в основе планирования генетических экспериментов и выбора методов анализа.

Среди биологических характеристик, необходимых для грамотного проведения генетического анализа, важнейшими являются жизненный цикл, способ размножения, продолжительность жизни и репродуктивного периода, плодовитость. Кроме того, нужно знать условия нормального культивирования, реакцию на влияние средовых воздействий и т. д.

У эукариот (высших растений, животных, грибов, водорослей, простейших) различают две группы: одноклеточные и многоклеточные организмы. Чередование их поколений происходит при размножении, которое может осуществляться как половым, так и бесполом путем.

Жизненные циклы, т. е. чередование гапло- и диплофаз, у особей разных групп и разных таксонов отличаются в основном по продолжительности этих фаз. У ряда видов происходит чередование полового и бесполого типов размножения, у других, например у пчел и наездников, особи одного пола развиваются из неоплодотворенных яиц, их генеративные клетки гаплоидны и не претерпевают мейоза; особи другого пола развиваются из оплодотворенных яиц.

При половом размножении происходит смена поколений благодаря образованию гаплоидных гамет и развитию организмов из диплоидных зигот, возникающих при слиянии гамет. *Общая особенность полового размножения - наличие механизмов правильного распределения ядерного материала (хромосом) при смене фаз - митоза и мейоза.* Половое размножение обеспечивает возможность обмена наследственной информацией и адаптацию к изменяющимся условиям среды. Жизненный цикл и способ размножения определяют закономерности наследования признаков, тип зиготы, особенности рекомбинационных процессов, обеспечивают реализацию генетического определения пола, они обуславливают способ поддержания мутантов в генетических коллекциях.

II.1. Жизненные циклы и способы размножения у животных

У высших животных основная часть жизненного цикла проходит в диплофазе. Гаплофаза представлена гаметами. Первая является многоклеточной, вторая - одноклеточной (рис. II. 1).

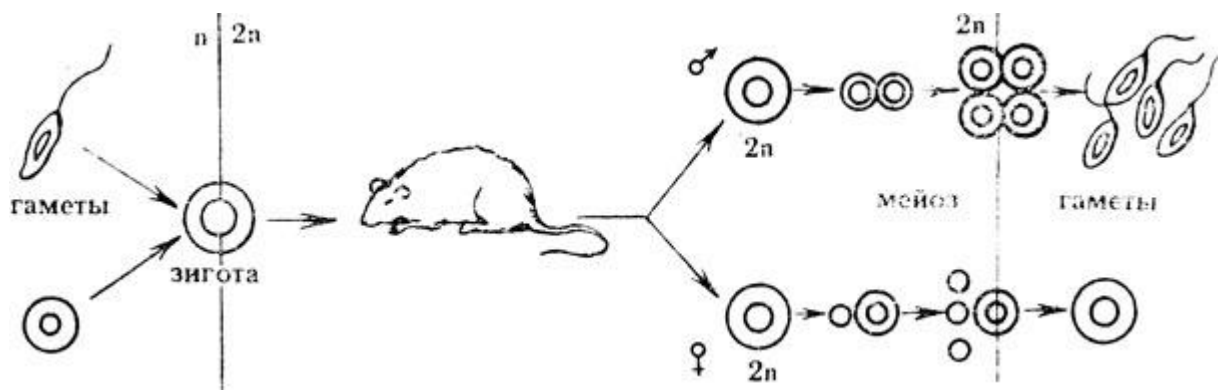


Рис. II. 1. Жизненный цикл млекопитающих

Половые клетки возникают из недифференцированных соматических клеток. Процесс обособления зачатковых клеток и формирования из них половых желез и гамет называется зачатковым путем. Зачатковый путь закладывается у разных организмов на разных стадиях онтогенеза. Например, у аскариды уже при первом делении дробления из одного бластомера формируются клетки зачаткового пути, а из другого - соматические клетки. У насекомых, червей, ракообразных также наблюдается ранняя дифференцировка зачатковых клеток. У млекопитающих она осуществляется в процессе формирования эмбриона. Образование **мужских** гамет происходит в семенниках при **сперматогенезе**, затем на время прекращается после рождения и дальше идет в течение всего репродуктивного периода, продолжительность и время наступления которого у разных видов различны.

В процессе сперматогенеза из эмбриональных зародышевых диплоидных клеток путем многократного митотического деления образуются примордиальные половые клетки, превращающиеся после периода покоя в первичные сперматогонии, а из них - во вторичные сперматогонии (стадия размножения). После ряда митотических делений они начинают увеличиваться в размерах и превращаются в сперматоциты первого порядка - I (стадия роста), которые вступают в мейоз. В результате первого деления мейоза из каждого сперматоцита I образуются две клетки с уменьшенным (редуцированным вдвое) набором хромосом - сперматоциты второго порядка - II (стадия созревания). После второго деления мейоза из каждого сперматоцита II образуются две гаплоидные клетки - сперматиды, которые превращаются в зрелые сперматозоиды в процессе спермиогенеза. Таким образом, *в процессе сперматогенеза из одной клетки сперматогония с диплоидным набором хромосом получается четыре гаплоидных сперматозоида* (рис. II, 2, а).

Рис. II.2. Схема сперматогенеза (а) и овогенеза (б) у млекопитающих

Образование женских гамет происходит при овогенезе, который также идет в течение эмбриогенеза, а затем только в репродуктивный период, и протекает периодически. Он в основном сходен со сперматогенезом, однако имеет ряд отличий. Сначала так же, как в сперматогенезе, путем митотических делений возникают первичные (I) и вторичные (II) диплоидные овогонии (стадия размножения), затем формируется ооцит первого порядка, при* чем эта стадия более продолжительна, чем стадия сперматоцита I; в этот период происходит накопление питательных веществ (стадия роста). После первого деления мейоза из каждого ооцита I получают две гаплоидные клетки - ооцит II и первое полярное тельце. После второго деления мейоза из ооцита II возникают две гаплоидные оотиды, одна из них превращается в гаплоидную яйцеклетку, другая - во вторичное полярное тельце (стадия созревания). Первичное полярное тельце после второго деления мейоза образует два вторичных полярных тельца, все они абортивны. Таким образом, *в процессе овогенеза из одной исходной диплоидной клетки (овогония) образуется лишь одна функционирующая женская гамета - яйцеклетка* (рис. II.2,б).

При **половом размножении** происходит процесс оплодотворения, который у животных начинается с активации яйца за счет соприкосновения головки сперматозоида с яйцом. Вторая фаза оплодотворения идет после проникновения в яйцо сперматозоида и его слияния с яйцеклеткой (сингамия). Проникновение сперматозоида может происходить на разных стадиях развития женской гаметы: на стадии ооцита I (губки, аскариды и др.), метафазы I (асцидии, двустворчатые моллюски и др.), ооцита II в стадиях мета- или анафазы II (бесчерепные и все позвоночные), зрелой яйцеклетки (иглокожие, кишечнополостные). После проникновения в яйцеклетку ядро сперматозоида постепенно набухает, становится похожим на интерфазное и превращается в семенное ядро или пронуклеус. В оплодотворении участвуют два пронуклеуса - яйцеклетки и сперматозоида, при слиянии которых (кариогамии) образуется диплоидная зигота.

Кроме нормального полового процесса у животных существуют так называемые **нерегулярные типы полового размножения** - партеногенез, гиногенез и андрогенез. При диплоидном соматическом **партеногенезе** развитие осуществляется из нередуцированных яйцеклеток без оплодотворения; при гаплоидном или генеративном партеногенезе - из нормальной гаплоидной яйцеклетки. **Гиногенетическое** развитие, наблюдаемое у некоторых рыб, происходит с участием двух родителей, но без оплодотворения: сперматозоиды лишь стимулируют развитие яйцеклеток, причем активацию могут вызывать сперматозоиды других видов.

При **андрогенезе** развитие осуществляется без участия яйцеклетки за счет слияния пронуклеусов двух сперматозоидов. Он может происходить у видов, для которых характерна полиспермия - проникновение в яйцеклетку нескольких сперматозоидов (иглокожие, моллюски, насекомые). Обычно пронуклеус одного сперматозоида сливается с пронуклеусом яйцеклетки, а все другие сперматозоиды дегенерируют. Андрогенез идет, если яйцеклетка по каким-либо причинам неспособна к оплодотворению.

Очевидно, что при нерегулярных типах полового размножения характер наследования признаков изменяется. Так, при диплоидном амеиотическом партеногенезе и гиногенезе в потомстве возникают только самки, которые имеют генотип и фенотип матери. При андрогенезе образуются особи мужского пола, фенотип которых зависит от генотипа сперматозоидов. Изучение наследования с помощью метода гибридизации при этих; способах размножения становится практически невозможным. В то же время партеногенетические способы размножения позволяют сохранять нужные экспериментатору сочетания признаков и определенные хенотипы.

II.4. Модельные объекты и их роль в генетическом анализе

Особую роль в генетическом анализе **играют** так называемые модельные объекты, **работая** с которыми исследователь может значительно ускорить и облегчить процесс анализа. Модельным объектом обычно считают организмы, удовлетворяющие большинству требований экспериментатора при решении определенной генетической задачи, прежде всего обеспечивающие большую разрешающую способность анализа.

Впервые внимание к важности модельных объектов в генетических исследованиях привлек *И. Г. Мендель*. Он посвятил этому вопросу специальный раздел в **работе** "Опыты над растительными гибридами", так и назвав его: "Выбор подопытных растений". Он писал, что выбор растительной группы, которая будет служить опытам, должен быть сделан с наивозможной осторожностью, если мы не хотим подвергнуть риску самый успех опыта (1965). И далее перечислял качества, особенности растений, удобных для генетических опытов: наличие у них константных альтернативно проявляющихся признаков, хорошая плодовитость гибридов, простота постановки скрещиваний, сравнительно короткий период вегетации.

Со времен Менделя в практику генетических исследований введены многие модельные объекты, которые используются для решения различных генетических задач. Это дрозофила, кукуруза, мышь, арабидопсис, дрожжи, нейроспора, кишечная палочка (*E. coli*) и др.

Рассмотрим некоторые эукариотические объекты, наиболее широко используемые в научных исследованиях и учебном процессе, и оценим их возможности и **вклад** в решение основных задач генетического анализа.

Дрозофила (Drosophilamelanogaster)

Род *Drosophila* относится к семейству *Drosophilidae* отряда *Diptera*. К настоящему времени описано более тысячи видов, относящихся к этому роду. Генетически наиболее изучены *Dr. melanogaster*, *virilis*, *funebri*. Дрозофила - один из прекраснейших модельных объектов, обладающий всеми качествами, необходимыми для успешного проведения генетического анализа. С 1909 г. в генетических экспериментах широко используют *Dr. melanogaster*.

Рис. II.6. Жизненный цикл дрозофилы (Drosophilamelanogaster)

Дрозофила - насекомое с полным превращением. В лаборатории при оптимальной температуре (24-25°C) цикл ее развития проходит за 9-10 дней. Продолжительность стадий в этих условиях: яйцо - 1 день, личинка - 4,5-5 дней, куколка - 3,5- 4,5 дней, имаго. Личиночная стадия делится на три возраста - от линьки до линьки, перед окукливанием личинка теряет подвижность (рис. II.6). Вылупившиеся самки в течение 6-12 час не способны к спариванию и оплодотворению, примерно 67% самцов в первые сутки спаривания бывают стерильными. Установлено, что самцы и самки становятся половозрелыми на вторые сутки после вылупления и максимальная половая активность и плодовитость проявляется у 4-5-дневных мух. Для скрещивания используют только неоплодотворенных (виргинных) самок, так как в семяприемнике оплодотворенной самки в течение нескольких суток (до 2-3 недель) может сохраняться сперма от предыдущей копуляции (длительность ее сохранения зависит от ее жизнеспособности и скорости расходования). Молодые самки и самцы в течение первых 3-4 час после вылета имеют более длинное светлое тело, еще не расправившиеся крылья, сложенные на спинке. В последующие часы девственные самки не отличаются от оплодотворенных. Отбор виргинных самок начинают обычно с первого дня вылета мух - сначала отбирают светлых виргинных самок, затем удаляют из пробирок всех вылетевших мух и дважды в день с интервалом около 10 час отбирают из культур всех вылетевших самок. Самки начинают откладывать яйца на 2-3-й день после вылупления. Число яиц в суточной кладке быстро увеличивается и достигает максимума на 4-5-й день (50-70 яиц в сутки), затем интенсивность кладки медленно уменьшается. Репродуктивный период у самцов продолжается 20-50 дней, у самок - 30-80 дней. За этот период самки способны спариваться до 10 раз, и количество потомков одной самки может достигать 1-3 тыс. Плодовитость мух зависит от плотности популяции и температуры содержания имаго. При высокой плотности культуры отмечено уменьшение плодовитости, причем реакция самок на плотность популяции - генетически обусловленный и изменчивый признак. Максимальная плодовитость проявляется при температуре 24°C, максимум интенсивности откладки при 28°C. С понижением температуры развитие дрозофилы сильно замедляется, так при 10°C оно растягивается до 70 дней и больше. При повышении температуры развитие ускоряется. Однако следует помнить, что при температуре 31° самцы дрозофилы становятся стерильными из-за потери подвижности сперматозоидов, причем их фертильность восстанавливается при перенесении мух в нормальные условия.

Важно знать, что у самцов и самок дрозофилы имеются существенные различия в протекании мейоза. У самок зрелый овоцит I находится на стадии метафазы I, второе деление мейоза осуществляется в оплодотворенном яйце. У самцов в профазе I отсутствуют стадии лептономы, зигонемы, пахинемы, не образуется синаптонемный комплекс, отсутствуют хиазмы и не идет кроссинговер. Это приводит к тому, что мейотические мутации проявляют свое действие либо только у самцов, либо только у самок.

К несомненным достоинствам дрозофилы следует отнести наличие огромного числа разнообразных мутаций, большинство из которых хорошо проявляется фенотипически, малое число хромосом ($2n = 8$), простоту разведения.

Не удивительно, что в течение многих лет (примерно до 40-х гг.) дрозофила была основным объектом в теоретических исследованиях и в учебном процессе по **генетике**. Именно исследования на дрозофиле привели к разработке хромосомной теории наследственности, генетической теории определения пола, выяснению механизмов возникновения мутаций и разработке методов их количественной оценки, а также методов цитологического картирования на политенных хромосомах. На дрозофиле изучали действие радиации и других мутагенных факторов, проведены исследования в области популяционной и эволюционной **генетики**. Число исследований на дрозофиле вновь резко возросло в последние 10-20 лет в связи с разработкой новых подходов и использованием методов молекулярной биологии, биохимии и генетической **инженерии**. Это позволило проанализировать содержание и состав ДНК и РНК в метафазных и политенных хромосомах, структуру некоторых генов у дрозофилы. Политенные хромосомы используют для изучения процессов транскрипции и репликации ДНК, а также в филогенетических исследованиях разных видов *Diptera*. Применение методов фракционирования белков позволяет изучать **генетику** изоферментов у дрозофилы, на основе которой строятся биохимические карты, изучается регуляция активности генов, контролирующих изоферменты, а также генная активность в онтогенезе. Особый раздел **работы** на дрозофиле - культивирование эмбриональных клеток и имагинальных дисков - способствует решению проблем **генетики** соматических клеток и **генетики** развития. Среди замечательных заслуг дрозофилы следует назвать открытие **мобильных** генетических элементов (МГЭ) и супермобильных локусов. Можно сказать, что по полноте информации о структуре генома среди высших эукариот дрозофила стоит на первом месте.

Кукуруза (Zea mays Z.)

Кукуруза - один из основных объектов фундаментальных исследований в области **генетики** и селекции растений. Это раздельнополое однодомное растение из семейства *Graminaceae*. Ее диплоидный набор хромосом равен 20, хромосомы легко анализируются в световом **микроскопе**, т. е. удобны для цитогенетического анализа. Простота кастрации (удаление мужских соцветий - метелок), наличие мутаций, вызывающих мужскую стерильность, возможность завязывания семян как при перекрестном опылении, так и при самоопылении, наличие огромного числа разнообразных мутаций облегчает **работы** по гибридизации. Кроме того, кукуруза имеет высокий коэффициент размножения: пылью одного мужского соцветия можно опылить более 100 женских соцветий и получить при этом до 50 тыс. семян; за один день можно осуществить до 100 скрещиваний. Именно поэтому она широко используется не только в научных исследованиях, но и в учебном процессе, так как на ее крупных женских соцветиях (початках) легко и просто проводить анализ расщеплений по признакам семян.

В настоящее время у кукурузы выявлены генные, хромосомные, геномные и цитоплазматические наследственные изменения; наилучшим образом изучены генные мутации. К 1980 г. описано до 450 генов, для 360 из них определены группы сцепления. Изучены и описаны гены, контролирующие поведение хромосом в митозе и мейозе, ферментные системы, образование хлорофилла и других пигментов; структуры и функции вегетативных органов; структуру и окраску эндосперма; регуляторные системы, ответственные за мутабельность и экспрессию других генов, за развитие разных элементов системы размножения, обуславливающих мужскую и женскую стерильность, избирательность оплодотворения и т. д. У кукурузы найдены спонтанные и получены индуцированные различные хромосомные перестройки: нехватки, транслокации, дупликации, инверсии. В последние годы на ней широко используются транслокации для определения групп сцепления. Получены полиплоидные формы кукурузы, и многие из

них хорошо изучены. Эуплоидная серия включает гаплоиды, диплоиды, триплоиды, тетраплоиды и др. Встречаются у кукурузы и анеуплоиды - трисомики и моносомики.

На кукурузе впервые наряду с дрозофилой были получены цитологические доказательства кроссинговера и открыты **мобильные** генетические элементы (Мак-Клинтон, 1938, 1950). На ней изучалось влияние длительного инбридирования и эффекты гетерозиса у растений и разрабатывались приемы гибридной селекции на основе получения и скрещивания чистых линий (межлинейные и двойные межлинейные гибриды); хорошо изучены цитоплазматические мутации, особенно мутации, связанные с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС), использование которой составляет одно из достижений **генетики** кукурузы и **генетики** растений в целом.

Дрожжи (Saccharomyces cerevisiae)

Дрожжи - одноклеточные грибы - относятся к классу *Ascomycetes*. Дрожжевая клетка содержит дискретное ядро, окруженное ядерной мембраной, и другие органеллы (например, митохондрии), а также два типа плазмид. Жизненный цикл включает гапло- и диплофазу. В зависимости от соотношения этих фаз различают гомоталлические дрожжи, у которых гаплоидны только аскоспоры, и гетероталлические с устойчивыми гапло- и диплофазами. Их вегетативные диплоидные клетки ($2n = 34$) образуются при копуляции гаплоидных клеток противоположных типов спаривания - a и α . Эти клетки неограниченно долго растут и образуют колонии, размножение которых осуществляется почкованием. Вегетативные гаплоидные клетки могут служить в качестве гамет. Для получения гибридов гаплоидные клетки a - и α -типов выращивают в жидкой среде в течение одних суток. Образовавшиеся при этом диплоидные зиготы изолируют из смеси родительских клеток либо микроманипулятором, либо с помощью генетических маркеров на селективных средах. Важно, что смена дипло- и гап-лофаз легко контролируется экспериментально путем переноса диплоидных зигот на бедную среду, содержащую только ацетат "атрия. В этих условиях диплоидная зигота вступает в мейоз, в результате которого образуется 4 гаплоидных аскоспоры, расположенных в **сумке** случайным образом. Слияние аскоспор противоположных типов спаривания вновь приводит к образованию диплоидных клеток (рис. II. 7).

Рис. II.7. Жизненный цикл дрожжей (Saccharomyces cerevisiae)

Для изучения мейотического расщепления выделяют аскоспоры, проращивают их и учитывают фенотипы развившихся от них культур, т. е. регистрация расщепления проводится на гаплоидном уровне. Расщепление анализируется либо на случайной выборке спор, либо методом тетрадного анализа (см. гл. III).

Все штаммы *Saccharomyces cerevisiae* могут расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях, что делает их хорошим объектом для изучения **генетики** митохондрий. К недостаткам дрожжей можно отнести очень мелкие, практически невидимые в световом **микроскопе** хромосомы, что исключает возможность проведения на них цитогенетических исследований.

Первые **работы** по **генетике** микроорганизмов связаны с дрожжами. Это изучение влияния рентгеновских лучей на изменчивость (Надсон, Филиппов, 1925). С 1937 г. начались систематические **работы** по гибридизации дрожжей. На них проведено изучение механизмов конверсии генов и разработаны модели рекомбинационного анализа; они используются почти во всех экспериментах по биохимической и молекулярной **генетике**.

Нейроспора (Neurospora crassa)

Нейроспора - хлебная плесень - многоклеточный гриб, его вегетативное тело состоит из нитей (гифов), переплетение которых образует **мицелий**. Клетки гриба многоядерны, и ядра гаплоидны, перегородки между стенками клеток мицелия имеют отверстия, так что цитоплазма гриба объединена. На гифах формируются вегетативные споры (конидии) с разным числом ядер: многоядерные **макроконидии** или одноядерные **микроконидии**, при прорастании которых вновь образуется мицелий. Таким

образом, бесполое размножение нейроспоры осуществляется прорастанием спор. Мицелии диких штаммов способны к неограниченному росту.

На соответствующих средах гриб образует плодовые тела, называемые перитециями.

Для полового размножения необходимо участие двух плесеней противоположных типов спаривания А и а. Половой процесс, носящий название гаметангиомии, осуществляется с участием специализированных клеток - гаметангиев. **Женский гаметангий** состоит из двух частей - аскогона и тонких длинных волокон - трихогин (от греч. трихос - волос, гине - самка). В качестве **мужского гаметангия** выступают гаплоидные микроконидии. При оплодотворении конидия по трихогине попадает в аскогон. Гаплоидные ядра после плазмогонии объединяются попарно, образуя дикарион. Из аскогона вырастают аскогенные гифы, в которых ядра дикариона синхронно делятся. На аскогенных гифах в плодовых телах (перитециях) развиваются **сумки** (аски). После оплодотворения оба гаплоидных ядра некоторое время существуют отдельно и многократно делятся митотически, образуя множество аскогенных гиф. Спустя определенное время кончик каждой аскогенной гифы выпячивается и изгибается. Ядра в ней делятся митотически, и образуются четыре гаплоидных ядра. Затем возникают три клетки, две из них содержат по одному, и одна-два гаплоидных ядра, которые сливаются и образуют диплоидное ядро зиготы. Зигота делится мейотически, при этом в обоих делениях сохраняется ориентация веретена и споры располагаются в определенном (линейном) порядке. Четыре гаплоидные споры еще раз делятся митотически и образуются аск с **8 упорядоченными** спорами, расположенными вдоль оси аска (рис. II. 8).

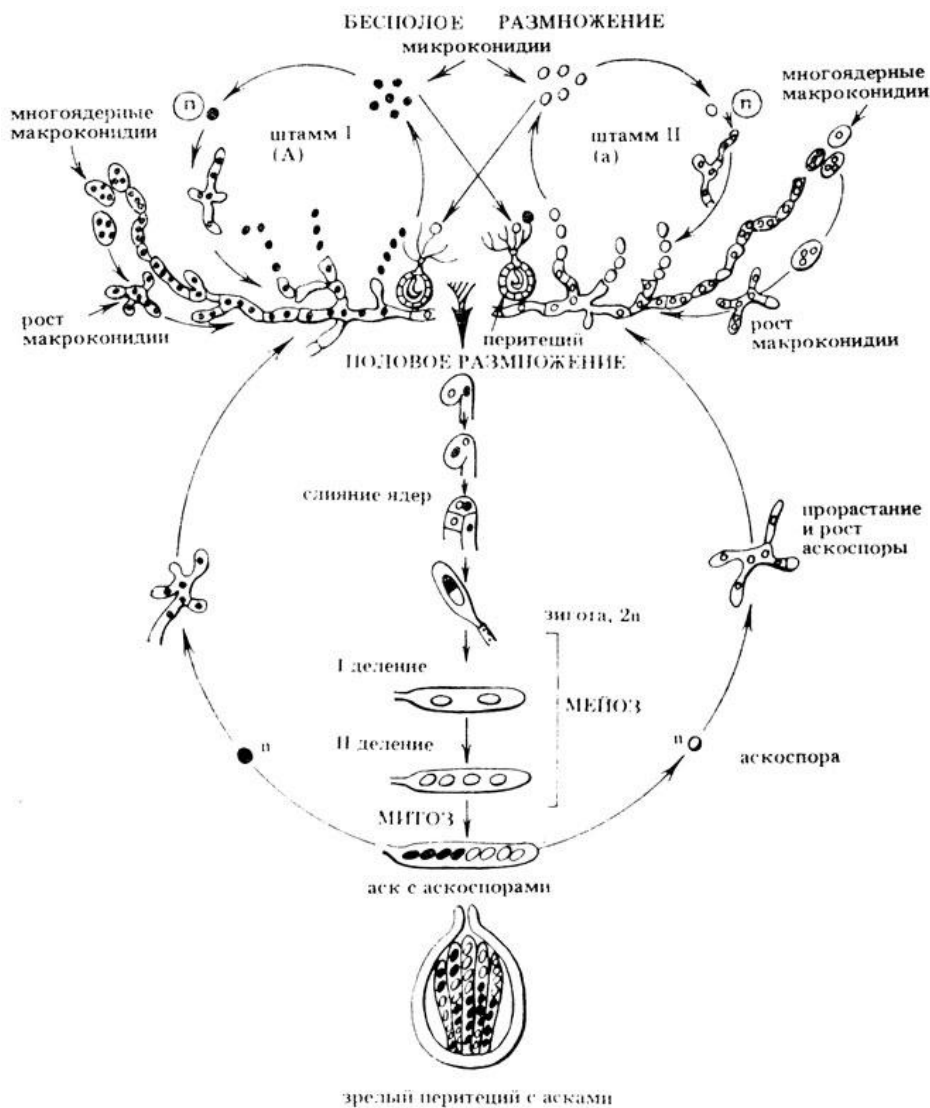


Рис. II.8. Жизненный цикл нейроспоры (*Neurospora crassa*) Аспергилл (*Aspergillus nidulans*)

Гифы разных штаммов нейроспоры могут сливаться и образовывать **гетерокарион**, содержащий ядра разного генотипа, на котором могут формироваться как гомо-, так и гетерокариотические макроконидии, а также микрoконидии с генотипами исходных штаммов.

В генетических исследованиях нейроспора появилась в 40-х гг. нашего столетия, и опыты на ней позволяют сформулировать основополагающую гипотезу "один ген - один фермент". На нейроспоре получены прямые доказательства закона чистоты гамет, прохождения кроссинговера на стадии четырех нитей; разработан метод тетрадного анализа, на ней ведется изучение митохондриального наследования; биохимических и молекулярных генетических процессов.

Представитель класса *Ascomycetes* из семейства *Aspergillaceae*. Это гомоталлический гриб, половой цикл которого сходен с циклом нейроспоры. Бесполое размножение осуществляется с помощью конидий. Мицелий диких штаммов не способен к неограниченному росту, он образует многочисленные гаплоидные зеленые колонии ($n = 8$). На питательной среде примерно через 6 час конидии прорастают, и из каждой конидии образуется бесцветная гифа, разделенная на множество клеток с помощью перегородок с отверстиями, через которые ядра могут перемещаться из клетки в клетку. Гифы, переплетаясь, образуют мицелий. Через 20 час начинается созревание мицелия, его ядра увеличиваются, хромосомы большинства клеток становятся политенными. В клетках, в которых не происходит политенизации хромосом, при их дифференцировке возникают особые гифы - **конидионосцы**. На конце конидионосца формируется пузырек, который

отделяется от него перегородкой. При созревании пузырька образуются выросты - одноядерные клетки (первичные стеригмы). Последние образуют одну или две вторичные одноядерные стеригмы, при делении которых формируется шарообразная конидия. После 100 делений возникают цепочки одноядерных конидий, которые постепенно стареют, меняя цвет, и отмирают. Но многие из них сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет. Цепочки конидий образуют колонообразную головку. Гифы разных мицелиев могут срастаться, при этом образуется **гетерокарион**, содержащий ядра разных генотипов. Если конидионосец формируется на гетерокариотическом мицелии, то образующиеся цепочки конидий могут быть генетически и фенотипически различными (так как в каждую конидиогенную клетку попадает только одно ядро), например, зелеными и белыми.

Половой процесс у аспергилла протекает на среде, содержащей мало азота и много восстановителей. При этом формируются половые органы - спирально закрученные, короткие гифы, при слиянии которых возникает двуядерная клетка, от которой отходят многочисленные аскогенные гифы. Ядра в этих гифах делятся митотически и после деления остаются рядом. Аскогенные гифы обрастают мицелием и превращаются в примордий, развивающийся в клейстотеций, в котором формируются аски. Гаплоидные ядра родоначальников асков сливаются и сразу же происходит мейоз, образуется 4 гаплоидных дочерних ядра, которые делятся митотически и превращаются в аскоспоры, расположенные в аске беспорядочно. Количество асков в зрелом клейстотеций может колебаться от 10 до 100 000 (рис. II. 9).

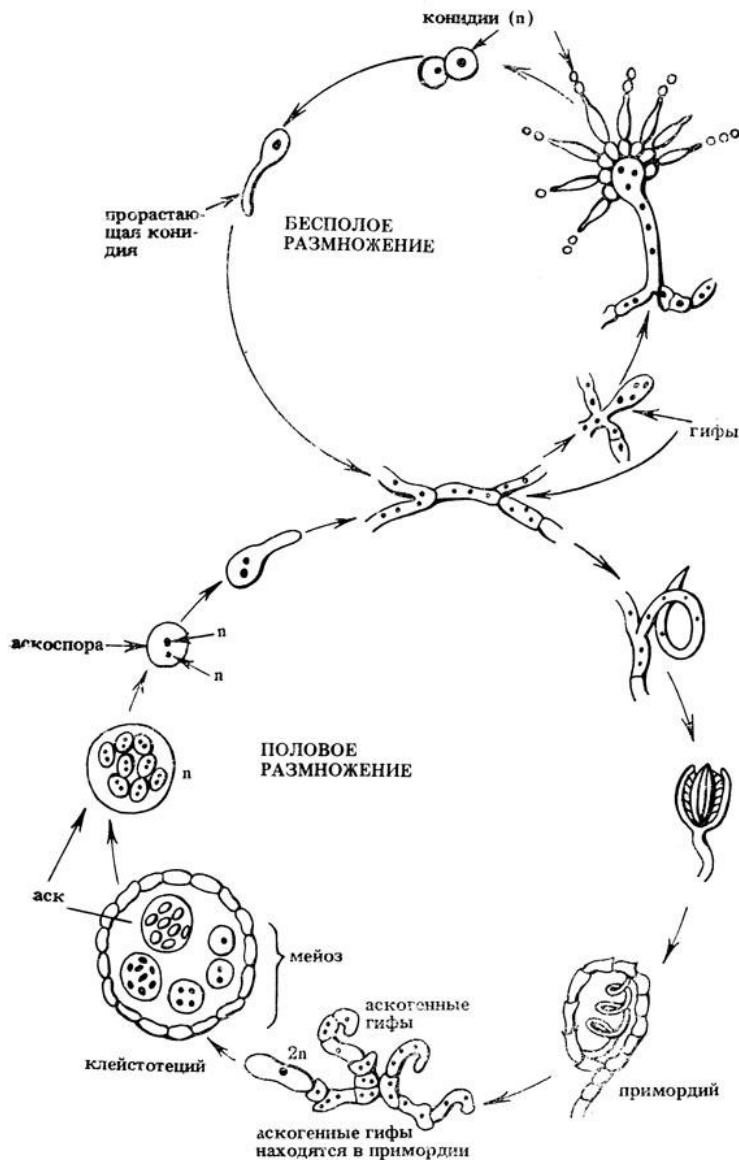


Рис. II.9. Жизненный цикл аспергилла (*Aspergillusnidulans*)

На аспергилле Понтекорво с сотрудниками (1952) открыл **парасексуальный процесс**, доказав существование митотической рекомбинации. Это дало возможность использовать парасексуальный процесс в генетическом анализе не только на аспергилле, но и на других грибах. На аспергилле впервые был разработан специальный метод картирования с использованием гаплоидизации гетерозиготных диплоидов, на нем применяют те же методы генетического анализа, что и на других микроорганизмах - анализ случайной выборки спор, митотической сегрегации и др.

Следует указать, что для каждого генетического объекта создается своя собственная генетическая номенклатура, символика, с помощью которой обозначаются доминантные и рецессивные мутации, хромосомные перестройки, записываются генотипы линий и штаммов. Объем настоящего пособия не позволяет привести генетическую номенклатуру модельных объектов, с ней можно ознакомиться в литературе, приведенной в конце главы.

Литература

1. Берри Д. Биология дрожжей. М., 1985.
2. Гершкович И. Генетика. М, 1968. С. 30-35.
3. Захаров И. А. Курс генетики микроорганизмов. Минск, 1978. С. 6-20, 187.
4. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова Н. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1976. С. 97-105.

5. *Захаров И. А.* Генетические карты высших организмов. Л., 1979. С. 29-33.
6. *Коваленко С. П.* *Aspergillus nidulans* как объект генетических исследований // Цитология и генетика. 1969. Т. III. № 6. С. 550-558.
7. *Лобашев М. Е.* Генетика. Л., 1967. С. 73-102.
8. *Медведев Н. Н.* Практическая генетика. М., 1968. С. 22-50.
9. *Мику В. Е.* Генетические коллекции кукурузы // Общие проблемы биологии. 1983. Т. 2. С. 56-78.
10. Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле. Новосибирск, 1977. С. 7-13, 46-54, 90-111, 207.
11. *Федоров В. С.* Генетика ржи (*Secale cereale* L.) II. Ксении. Исследования по генетике. Л., 1961. С. 116-121.
12. *Хейс У.* Генетика бактерий и бактериофагов. М., 1965. С. 53-55, 60-61.
13. *Инге-Вечтомов С. Г.* Дрожжи // Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. 1982. Т. 1. С. 148-159, 178-180.

Заключение

Генетический анализ позволяет решать основные проблемы и частные задачи **генетики**. Он может быть успешным только при наличии большого разнообразия форм изучаемого вида, для чего создаются генетические коллекции. Для решения всех генетических задач используют различные подходы и методы, **специфическим методом** генетического анализа является гибридологический метод.

Даже краткое знакомство с биологией некоторых объектов говорит о необходимости знания их биологических особенностей, что помогает и облегчает проведение генетического анализа, позволяет грамотно подбирать исходный материал для скрещиваний, выбирать методы анализа, увеличивающие его разрешающую способность. *Пределом разрешения при генетическом анализе является возможность экспериментально определять наиболее близкие расстояния между мутациями и редкие частоты мутирования отдельных генов.*

Задачи генетического анализа проще и быстрее решаются на модельных объектах, на которых проверяются гипотетические генетические модели, разрабатываются новые методы анализа, которые затем используются на других объектах; они служат тест-системами при оценке действия мутагенных и других факторов.

ЛЕКЦИЯ №4

Анализ наследования отдельных признаков

Изучение наследования отдельных признаков - первый этап генетического анализа. Основная его цель заключается в выявлении генов, контролирующих признак, и изучении свойств этих генов. Сведения о генетике отдельных признаков составляют фундамент для создания генетических моделей, для решения других задач генанализа.

Сравнивая работу генетика-аналитика с работой химика, *А. С. Серебровский* говорил о некотором сходстве их методов, особенно в логике построения выводов. Однако, подчеркивал *А. С. Серебровский*, работа генетика-аналитика несравненно труднее, ибо "химик имеет возможность выделить свои элементы в чистом виде и изучить свойства этих выделенных элементов, а генетик лишен этих возможностей, так как организм способен жить только обладая более или менее полным набором разнообразных генов... и генетик вынужден изучать элементы, только сравнивая между собой различные, часто сложные вещества, не имея возможности разложить их на простые". Кроме того, генетик "не имеет "чистых реактивов" - т. е., проводя скрещивания, только частично имеет представление о генотипе исходных форм" (*Серебровский, 1970*).

Первая трудность, связанная с невозможностью изучения отдельных элементов - генов и их свойств, на современном уровне развития генетики преодолима - можно выделять отдельные гены, определять последовательность нуклеотидов в них, изучать их

свойства. Что касается второй трудности, связанной с фактической невозможностью знать генотип исходных форм **по всем генам**, то она существует и сейчас. Тем не менее, используя различные приемы и методы генетического анализа на основе уже открытых закономерностей и представлений, можно успешно изучать наследование отдельных признаков, основным методом их изучения является гибридологический (см. гл. I).

Работа начинается с выбора исходного материала и составления схем скрещиваний. Желательно использовать в скрещиваниях гомозиготные формы. Выводы о характере наследования делают только после анализа результатов первого и второго поколений, анализирующего или других проверочных скрещиваний, а в ряде случаев после проведения дополнительных исследований с помощью других методов - патогенетического, биохимического и др.

Анализ мутаций

Типы мутаций. Методы выявления и количественного учета мутаций. Использование мутаций в генетическом анализе

Установление генов, их идентификация, картирование хромосом и генов возможно только тогда, когда исследователь располагает набором мутаций, нарушающих нормальную работу генов. Они - инструмент для проведения генетического анализа. Кроме того, в круг проблем, решаемых с помощью мутаций, входят: исследование природы и механизмов спонтанного и индуцированного мутагенеза; определение зависимости частоты возникновения разных типов мутаций (генных, хромосомных, геномных) от дозы мутагена и условий обработки; оценка специфичности действия мутагенов разного типа и возможностей направленного мутагенеза; выявление природы обратных мутаций, а также роли репликации, репарации и рекомбинации в мутационном процессе. Именно поэтому изучение мутационного процесса представляет собой одну из важнейших задач генетического анализа.

В настоящей главе рассматривается проблема обнаружения и количественного учета разных типов мутаций и их использование в генетическом анализе. Для этого создают специальные методы (учитывающие биологические особенности объекта, его жизненный цикл, особенности размножения и т. д.), описание которых - задача достаточно сложная и необъятная. Поэтому в основном ограничимся рассмотрением некоторых методов, применяемых на модельных объектах, и некоторых скрининг-методов.

Выявление и количественный учет генных мутаций

Выявление и количественный учет мутаций связаны с рядом трудностей: во-первых, большинство из них рецессивны и могут проявляться только в гомозиготном (или гемизиготном) состоянии, для чего приходится получать несколько поколений от организмов, подвергнутых обработке мутагеном. Во-вторых, мутацию не всегда можно отличить от редкой рекомбинации. Наконец, изменения фенотипа могут быть связаны не с мутациями, а с морфозами и модификациями.

Исключительно простые и наглядные методы обнаружения различных генных гаметических мутаций (летальных и видимых) разработаны в 1927 г. Меллером, за что он был удостоен Нобелевской премии.

В этих методах используются специально созданные линии-анализаторы. В их генотипах содержатся инверсии, блокирующие кроссинговер, благодаря чему вновь возникающая мутация всегда наследуется с хромосомой, полученной от мутагенизированной особи. В ряде случаев линии содержат сбалансированные летали, позволяющие неограниченно долго сохранять летальные и другие мутации в сбалансированной хромосоме (см. гл. VII).

ЛЕКЦИЯ №5

Обнаружение и количественный учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы. Метод меллер-5 и CID

С помощью названных методов можно проводить количественный учет рецессивных летальных мутаций, возникающих в X-хромосоме зрелых сперматозоидов самцов дрозофилы.

Метод Меллер-5

Линия-анализатор Меллер-5 содержит в генотипе две инверсии sc^8 и $\delta 49$. Инверсия sc^8 захватывает большую часть X-хромосомы. Для предотвращения возможного кроссинговера в этой инверсии в нее введена другая, более короткая, подавляющая кроссинговер в средней части X-хромосомы, что приводит к полному подавлению кроссинговера в X-хромосоме. Важно, что эти инверсии не влияют на жизнеспособность мух. Кроме того, линия Меллер-5 маркируется какими-либо видимыми мутациями (например, w^a -apricot - абрикосовые глаза и В-Var - полосковидные глаза).

Самцов, подвергнутых мутагенной обработке, в **возрасте 3-5 дней** скрещивают с самками из линии Меллер-5 того же возраста, поскольку более молодые самцы имеют разную чувствительность к мутагенам, а у молодых самок обычно замедлена яйцекладка. Через двое суток эти мухи удаляются. Через 9-10 дней (при температуре опыта 24-25° С) начинается анализ мух **F₁ только двухдневных яйцекладок**, так как на третий день в оплодотворении участвуют половые клетки, находившиеся на стадии сперматид в момент обработки самцов.

Самцы первого поколения имеют фенотип линии Меллер-5. У самок глаза красные, более узкие, чем у мух дикого типа (действие неполнодоминантного гена В), каждая из них имеет одну X-хромосому, пришедшую от отца. В этой X-хромосоме у некоторых самок F₁ может быть локализована вновь возникшая рецессивная летальная мутация, у большинства самок леталь отсутствует. Для того, чтобы определить, какая из них несет летальную мутацию в X-хромосоме, в первые 2-3 дня лета мух к проводят индивидуальные скрещивания самок F₁ с самцами из линии Меллер-5. (Скрещивание с самцами первого поколения нецелесообразно, так как они могут иметь мутации или хромосомные aberrации в Y-хромосоме, полученной ими от мутагенизиро-ванного отца, влияющие на жизнеспособность и плодовитость этих самцов.) Через 9-10 дней в течение 9 дней проводится анализ F₂; **культуры просматриваются ежедневно**.

Если в X-хромосоме самки F₁ летальная мутация отсутствует, то в потомстве F₂ проявляется расщепление: половина самцов и самок имеют дикий фенотип, половина - фенотип линии Меллер-5. Работа с такой культурой прекращается.

Рис. X.1. Количественный учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы. Метод Меллер-5

*Если в X-хромосоме самки F₁ содержалась леталь, то в F₂ за 8-9 дней лета не появятся нормальные самцы. Для проверки нескольких самок из этой культуры вновь скрещивают с самцами Меллер-5 и анализируют F₃. При отсутствии нормальных самцов и в F₃ делается вывод о наличии летальной мутации в X-хромосоме исследуемой самки F₁ (рис. X.1). Частота леталей определяется как доля (%) X-хромосом, несущих летальную мутацию, от общего числа проанализированных X-хромосом. Например, если в опыте изучено потомство 800 самок F₁, т. е. 800 X-хромосом, полученных от исходных мутагенизированных самцов, и летальные мутации обнаружены в потомстве 26 самок (в 26 X-хромосомах), то частота возникновения рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме в данном опыте составляет 3,25% ($\frac{26}{800} \times 100\%$). Преимущество этого метода заключается в чрезвычайно простом учете результатов: **культуры просматриваются через стекло пробирок, без наркотизации мух.***

Метод CID

В линии CIB кроме одной большой инверсии и маркера В (Bar), содержится рецессивная леталь в гетерозиготном состоянии, поэтому в F₁ не образуется самцов CIB и в F₂ появляются только нормальные самцы, если в X-хромосоме нет летали. Если X-хромосома, полученная самками F₁ с гаметой мутагенизированного самца, несет леталь, то в F₂ вообще не появляются самцы. В этом методе также используются самцы и самки 3- 5-дневного возраста, и учет проводится в потомстве двухдневных кладок самок F₁ при индивидуальных скрещиваниях путем просмотра культур без наркотизации мух (рис. X.2). Метод CIB в настоящее время применяется редко, так как одна инверсия неполностью "запирает" кроссинговер.

Рис. X.2. Количественный учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы. Метод CIB

Поскольку мутация - событие достаточно редкое, при постановке конкретного опыта важно оценить, какое количество самцов следует облучить и какое количество культур нужно поставить. Очевидно, что увеличение числа обработанных самцов и культур увеличивает вероятность выявления мутаций. При расчете можно исходить из того, что для получения F₁ в каждую пробирку среднего размера помещают по 2-3 самки и 3-4 обработанных самца. От двухдневной кладки в каждой пробирке можно получить до 100 и больше мух (в зависимости от дозы мутагена).

ЛЕКЦИЯ №6

Методы учета перестроек хромосом

При воздействии разных мутагенов и спонтанно в генеративных и соматических клетках возникают перестройки (абберрации) хромосом. Они влияют на поведение хромосом в мейозе, на гаметогенез, жизнеспособность и фертильность организмов, экспрессию и характер рекомбинации генов. Абберрации по-разному проявляются фенотипически и их выделяют с помощью различных методов: гибридологического, цитологического и др.

. Анализ делеций и дупликаций

Нехватки концевых участков хромосом и **делеции** (выпадение и утрата внутренних участков хромосом), возникающие в генеративных клетках, в **гомо- и гемизиготном состоянии, а также у гаплоидов**, как правило, **летальны, но могут сохраняться в гетерозиготе.**

Гетерозиготы по нехваткам и делециям обладают плейотропным действием, снижают плодовитость и жизнеспособность особей. Если делеции затрагивают генетически активные районы, они почти всегда проявляются фенотипически, как, например, упоминавшаяся в гл. VIII мутация *Notchy* дрозофилы, на которой выявлено более 130 делеции разной протяженности типа *Notch*. Установлено, что разные аллели в гемизиготном состоянии у самок (делеционные мутанты) могут проявляться не так, как у нормальных гемизиготных самцов.

Рис. X.6. Выявление крупных делений в X-хромосоме дрозофилы с помощью сцепленных X-хромосом. Рецессивные мутации: f(forked) - вильчатые щетинки, ct(cut) - обрезанный край крыла, w(white) - белые глаза, y (yellow) - желтое тело

Крупные делеции в X-хромосоме дрозофилы выявляют методом сцепленных X-хромосом. Для этого самки \widehat{XXY} маркируются несколькими рецессивными мутациями и скрещиваются с мутагенизированными самцами дикого типа. В их потомстве могут возникать суперсамки (метасамки) \widehat{XXX} , которые при отсутствии делеции в X-хромосоме, полученной от самца, должны быть дикого типа. Если у самца образуются

делеция, захватывающая область маркеров, то у самок **XXX** проявляется один или несколько рецессивных маркеров (рис. X.6).

Прекрасным объектом для обнаружения делеций служат гигантские политенные хромосомы некоторых насекомых - *Drosophila*, *Chironomus* и др. (см. гл. VIII, рис. VIII.2). Своеобразный метод учета делеций на участке, разделяющем два адениновых гена (*ade 3A* и *ade 3B*), предложен **на нейроспоре**. Метод основан на том, что мутанты по этим генам растут на среде с аденином **только при наличии этого участка**. Если он делетирован, то мутации не растут даже на среде, обогащенной аденином. Критерием, с помощью которого выявляют эти делеции, является отсутствие роста адениновых мутантов на среде с аденином. Делеций генов *ade 3A* и *ade 3B* этим методом не выявляются.

Для выявления делеций на некоторых **растениях**, например на кукурузе, применяют так называемый "**тест на специфические локусы**" - аллели, контролируемые рецессивные признаки эндосперма: окраску, форму, наличие или отсутствие крахмала и пр. *Тест основан на выявлении эффекта "псевдодоминирования" у гетерозигот* по этим маркерам. Для этого подвергают мутагенной обработке пыльцу нормальных растений и опыляют ею женские растения, маркированные несколькими рецессивными мутациями по признакам эндосперма. *О наличии делеций узнают по проявлению рецессивных признаков на гибридных семенах M_1* . Очевидно, что можно проанализировать большое число зерен в початках. Однако этот тест не позволяет **количественно** оценить частоту возникновения делеций в **спермиях**, так как в зрелом пыльцевом зерне у ряда растений генеративное ядро уже разделено на два ядра и генотип второго ядра, сливающегося с яйцеклеткой, остается неизвестным. Если же обрабатывать мутагеном клетки **микроспор**, то можно определить частоту их возникновения, так как в микроспоре оба ядра спермиев имеют одинаковый генотип. Поэтому эндосперм и зародыш оказываются гетерозиготными по одной и той же делеции. Кроме того, у растений, гетерозиготных по делеции, происходит гибель части гамет, и растения M_1 образуют до 50% абортивной пыльцы.

Эффект "псевдодоминирования" используют в некоторых случаях для выявления делеций у мышей.

Наличие делеций у диплоидных организмов выявляют также по отсутствию рекомбинаций между сцепленными маркерами, она приводит к уменьшению расстояния на генетической карте между крайними генами.

К сожалению, далеко не всегда удается отличить делецию от генной мутации. *Четкий критерий делеций - отсутствие обратного мутирования и рекомбинирования с определенными мутациями.*

В результате разрывов хромосом, неравного кроссинговера, а также благодаря избыточной репликации участков хромосом и последующего их включения в хромосому возникают дубликации. Они бывают внутривхромосомными (прямые, инвертированные, смежные, тандемные) или межхромосомными. Гены гистонов, тРНК, рРНК и др., повторяющиеся в геноме эукариот сотни раз и относящиеся к классу умеренных повторов, представляют собой дубликации, которые достаточно легко обнаруживаются на политенных хромосомах (см. гл. VIII).

Использование разных типов мутаций в генетическом анализе

Развитие исследований в области мутагенеза на грибах-аскомицетах, растениях, животных и человеке привело к открытию механизмов и причин наследственной изменчивости у эукариот. Эти исследования, методологической основой которых является использование разных типов мутаций, сопровождаются разработкой методов генетического анализа.

Генные мутации широко применяются в линиях-анализаторах при определении группы сцепления, картировании хромосом и генов; они наиболее удобны и просты для

познания сути аллельных взаимодействий, определения биохимической природы изменения и оценки влияния каждого конкретного этапа метаболизма на фенотипическое проявление признака; их используют также для клонирования генов путем комплементации мутаций фрагментами генома из банка генов, несущими нормальные копии генов.

С помощью **аббераций хромосом** можно получать новые группы сцепления и иной порядок расположения генов в хромосоме, на них изучают эффекты положения генов, влияние ау- и гетерохроматина на фенотипическое проявление признака, межхромосомные отношения в генотипе организма. **Инверсии и транслокации** вводят в качестве "запирателей кроссинговера" в генотип линий-анализаторов, они служат основой для создания сбалансированных хромосом.

Делеции являются ценным инструментом для картирования хромосом, изучения влияния дозы гена на проявление признака, для клонирования генов.

Исследуя перестройки хромосом, можно проследить эволюцию кариотипа родственных видов.

Изменение числа хромосом - **эуплоидия и анеуплоидия** - один из источников наследственной изменчивости в эволюции и селекции.

Анеуплоиды используются в генетическом анализе для определения групп сцепления (см. гл. VIII). На основе создания полных наборов нуллисомиков, моносомиков и трисомиков удалось генетически идентифицировать все хромосомы, принадлежащие к разным видам, у пшеницы. Такие же исследования проводятся и на других растениях, где удается создать необходимые анеуплоидные серии - на сорго, люцерне, перце и др.

Особый интерес для генетического анализа представляют **гаплоиды**. В очень редких случаях они возникают спонтанно, но их можно получать, используя культуру пыльников или изолированных микроспор, или в культуре макрогаметофитов; путем опыления растений облученной пылью; партеногенетически; в результате межвидовых скрещиваний.

Для получения гаплоидов у ячменя *Hordeumvulgare* и пшеницы *Triticumvulgare* в последнее время применяют оригинальный метод, названный "бульбозным методом". Он заключается в скрещивании *Hordeumvulgare* (♀) или *Triticumvulgare* (♀) с ячменем вида *Hordeumbulbozum* (♂), откуда и название метода. У гибридов от этих скрещиваний в первых делениях зиготы элиминируются все хромосомы *Hordeumbulbozum* и остается только гаплоидный набор вида, с которым проводится скрещивание - либо *Hordeumvulgare*, либо *Triticumvulgare*.

На гаплоидных растениях легче, чем на диплоидных изучать природу мутаций, связанных не только с изменением отдельных генов, но и с неравным кроссинговером, мелкими нехватками и другими абберациями, эффектом положения генов. При удвоении набора гаплоидов в течение одного года можно получить практически полностью гомозиготные диплоидные формы, необходимые в селекционной работе для получения чистых линий, что особенно важно при работе с перекрестноопыляемыми растениями, где для получения относительной гомозиготности нужны многие годы (до 10 лет и больше). Эти гомозиготные линии используют в селекции на гетерозис. Гаплоиды успешно применяются в мутационной селекции, поскольку у них отсутствует явление доминирования и вследствие этого возможно выделение мутантных форм для анализа уже в первом после обработки поколении. Они представляют собой хороший материал для создания серий моносомиков.

Особая роль в генетическом анализе принадлежит **МГЭ**. Их широко используют прежде всего для получения как генных, так и хромосомных мутаций, например делений. Кроме того, они являются молекулярно-генетическими маркерами, с помощью которых проводится картирование любых геномов, что особенно важно при изучении геномов человека и других организмов, трудно поддающихся генетическому анализу традиционными методами.

Очевидно, что познание молекулярных механизмов и факторов изменчивости и изучение природы их действия и разработка методов выявления мутаций дают очень важную информацию для понимания не только генетических, но и других общебиологических проблем, в частности, проблемы эволюции, а также для целей селекции и медицины.

Литература

1. Айала Ф. Современная генетика. М., 1988. Т. 3. С. 54-56.
2. Абилов С. К., Порошенко Г. Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники. Токсикология. 1986. Т. 14. С. 79-94.
3. Ананьев Е. В. Молекулярная цитогенетика мобильных генетических элементов у *Drosophilamelanogaster* // Итоги науки и техники. Молекулярная биология. 1984. Т. 20. С. 65-79, 82-85, 98-100.
4. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М., 1978. С. 30-35, 38, 83-85, 176-186.
5. Большой практикум по генетике животных и растений. М., 1977. С. 43-63.
6. Горлов И. П. Влияние перестроек робертсоновского типа на частоту и распределение хиазм у самцов мышей // Рекомбиногенез. Кишинев, 1986. С. 61-65.
7. Дубинин Н. П. Рекомбиногенез при гибридном дисгенезе и синтетическая теория эволюции // Рекомбиногенез. М., 1986. С. 3-14.
8. Дыленок Л. А., Ядевич А. П. Моносомный анализ в генетических исследованиях пшеницы. Минск, 1984. С. 3-20, 88-89.
9. Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека (атлас). М., 1982. С. 264.
10. Льюин Б. Гены. М., 1987. С. 472-489.
11. Усманов П. Д., Мюллер А. Применение эмбрионального теста для анализа эмбриональных леталей, индуцированных облучением пыльцевых зерен // Генетика. 1970. № 7. С. 50-60.
12. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1985. С. 116-127, 140-151, 181-217.
13. Якушкевич С. И. Использование арабидонсис в практических занятиях по общей генетике. М., 1985.

Заключение

Генетический анализ проводится не только для расшифровки и познания генетических процессов, не только для выявления генотипов изучаемых организмов, но в конечном итоге для того, чтобы использовать эти знания в решении практических задач, связанных с сельским хозяйством, медициной и биотехнологией.

Можно выделить два основных подхода, два основных направления генетического анализа.

Классический подход, от фенотипа к генотипу, к установлению генов, основан на расчленении организма на отдельные признаки и анализе передачи этих признаков по поколениям. Его специфический метод - гибридологический анализ.

Важнейшие генетические и общебиологические концепции такие, как хромосомная теория наследственности, теория гена, эволюционная теория, разработаны на данных такого анализа.

В практическом плане классический подход позволяет не только выявлять наследуемые различия между формами, их генотипы, но и синтезировать организмы с наиболее выгодными для исследователя сочетаниями уже известных признаков, а также с новыми свойствами, возникающими в результате различных генных взаимодействий, вероятность появления которых можно прогнозировать. Он используется в исследованиях по частной генетике разных видов, в медико-генетической практике. *За последние 50 лет применение генетических подходов к выведению новых и совершенствованию старых сельскохозяйственных культур обеспечило половину прироста их продукции.* Многие селекционные методы базируются на знаниях, полученных в экспериментах генетиков-

аналитиков (системы отбора, инбридинг, использование цитоплазматической мужской стерильности для получения чистых линий и выведения на их основе гетерозисных гибридных сортов, использование индуцированных мутантов в селекции самоопыляющихся растений и т. д.). Однако селекционный процесс, проводимый с помощью классических методов анализа, протекает достаточно медленно.

В основе молекулярно-генетического подхода лежит другая стратегия - "от гена к фену". Особую роль в его разработке сыграло развитие техники получения рекомбинантных молекул ДНК, позволяющих выделять определенные гены и клонировать их для последующего использования в генетическом анализе. В этом случае исследования идут на уровне нуклеотидов. Рекомбинантные молекулы помогают изучать структуру хромосомных генов; определение последовательности нуклеотидов в них дает возможность получать информацию о последовательности аминокислот в белке, который ими контролируется. *Молекулярно-генетические методы служат прекрасным инструментом для изучения механизмов кардинальных генетических процессов - репликации, репарации, рекомбинации, а также транскрипции и трансляции; открывают возможность направленного мутагенеза и синтеза белков с заданными свойствами.* С помощью молекулярно-генетического подхода разработаны новые методы в генетике человека, изучают врожденные дефекты метаболизма, проводят раннюю (пренатальную) диагностику наследственных заболеваний, выявляют их гетерозиготных носителей и вырабатывают стратегию лечения больных; проводят картирование генома. **Преимущество этих методов** заключается в том, что с их помощью можно картировать любые гены, независимо от характера их фенотипического проявления.

Все сказанное позволяет заключить, что только на основе синтеза классического и молекулярно-генетического подходов возможно плодотворное решение всех задач генетического анализа, теоретических и практических проблем генетики, целью которой является управление наследственностью и изменчивостью для обеспечения здоровья и благосостояния человека и сохранения природы.

Источник:

Орлова Н.Н. 'Генетический анализ' - Москва: МГУ, 1991 - с.318