

С. Г. Инге - Вечтомов

ГЕНЕТИКА

С

ОСНОВАМИ СЕЛЕКЦИИ

Допущено
Государственным комитетом СССР
по народному образованию
в качестве учебника
для студентов
биологических специальностей
университетов



Москва
«Высшая школа» 1989

ББК 28.04
И 59
УДК 575

Рецензенты:

кафедра генетики и селекции Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (зав. кафедрой проф. С. В. Шестаков); проф. Ю. К. Фомичев (Белорусский государственный университет им. В. И. Ленина)

Инге-Вечтомов С. Г.

И 59 Генетика с основами селекции: Учеб. для биол. спец. ун-тов. — М.: Высш. шк., 1989. — 591 с.: ил.
ISBN 5—06—001146—1

В учебнике рассмотрены основные вопросы классической и современной генетики и селекции. Общегенетические закономерности, показанные на примерах жизненных циклов про- и эукариот, позволяют проследить развитие таких новейших направлений, как генная инженерия, генетическая токсикология, генетика индивидуального развития и цитология человека. В заключение сделаны теоретические обобщения по эволюции генетического материала, даны практические приложения генетики как основы селекции, вопросы и задачи, способствующие усвоению материала.

И 2001010000 (4309000000) — 201 88—88
001 (01)—89

ББК 28.04
57.023

ISBN 5—06—001146—1

© Издательство «Высшая школа», 1989

Предисловие

Генетика — основа современной биологии. Этот факт становится очевидным по мере дифференциации и специализации различных биологических наук. Универсальные законы наследственности и изменчивости справедливы для всех организмов. Методы генетики приложимы к любым биологическим исследованиям. Именно поэтому XVI Всемирный генетический конгресс в Канаде (1988) проходил под девизом «генетика и единство биологии».

По своей сути генетика — наука пограничная. Классический генетический анализ основан на применении сугубо биологических методов: скрещиваний, изучения потомства гибридов, а также изменчивости организмов. Выявляемая этими методами генетическая дискретность — не что иное, как отражение молекулярной дискретности в организации клеток и организмов, т. е. дискретности белков и нуклеиновых кислот. С одной стороны, это показывает пределы разрешающей способности генетического анализа (строго говоря, белки и нуклеиновые кислоты — предмет изучения биохимии), а с другой — объясняет неизбежность совместной разработки смежных областей. Отсюда необходимость в современном учебнике генетики экскурсов во многие пограничные дисциплины, особенно в молекулярную биологию.

Первые учебные пособия по генетике созданы А. Вейсманом (на рубеже столетий) и Р. Гольдшмидтом (1911) за границей и Е. А. Богдановым (1914) и Ю. А. Филипченко (1915) в нашей стране. Поначалу в учебники были включены менделевские закономерности, основы цитологии и математические методы изучения изменчивости наряду с многочисленными второстепенными наблюдениями эмпирического характера и умозрительными теориями наследственности и эволюции.

В дальнейшем учебники менялись в сторону все большей строгости, в них выделялась логика генетических доказательств, отражавшая успехи генетики как точной науки, чему способствовали развитие хромосомной теории и совершенствование методов генетического анализа.

Такой характер учебной литературы свойствен классическому периоду становления этой науки, начиная с «Генетики» Ю. А. Филипченко, написанной в 1929 г., и кончая предвоенным периодом (П. Ф. Рокицкий, 1932; В. Ф. Натали, 1937; Н. И. Гришко и Л. Н. Делоне, 1938, и др.). Те же тенденции отчетливо выражены в монографии А. С. Серебровского «Генетический анализ», завершённой в 1948 г., но увидевшей свет только в 1970 г.

В послевоенный период учебники по этой дисциплине в СССР не издавались вплоть до 1963 г., когда вышла «Генетика» М. Е. Лобашева, переработанная затем в 1967 г.

За это время мировая генетика обогатилась методами физики и химии. На её базе возникла молекулярная биология. Биохимическая и молекулярная генетика внесла огромный вклад в теорию гена. Развивалась синтетическая теория эволюции, в качестве основы вобравшая в себя многие положения генетики. Все эти достижения науки нашли отражение в учебниках генетики, выходящих за рубежом. Достаточно вспомнить учебник Е. Синнота и Л. Дэнна, неоднократно перерабатывавшийся и переиздававшийся и в последних вариантах (с 1958 г.) публиковавшийся при участии третьего автора — Ф. Г. Добжанского.

Отечественные биологи были лишены возможности участвовать во всех этих событиях. Трагические последствия августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г., утвердившей безраздельное господство антинаучных идей Т. Д. Лысенко, нанесли огромный вред исследовательской работе биологов и практическому использованию достижений генетики в нашей стране. Еще более ощутимый вред был нанесен подготовке биологов и преподаванию генетики. В 1948 г. все генетики и им сочувствующие были изгнаны из стен высшей школы.

В дальнейшем профессиональные генетики за редчайшим исключением так и не вернулись в высшие учебные заведения. Это означало уничтожение отечественных генетических школ. Прервалась связь между поколениями, нарушилась сигнальная наследственность.

В настоящее время вакуум в области учебной литературы по генетике, вновь возникший после 1967 г., начинает постепенно заполняться. Два издания выдержали «Основы современной генетики» (1979 и 1983) С. М. Гершензона. Вышел учебник С. И. Алиханяна, А. П. Акифьева, Л. С. Чернина «Общая генетика» (1985), «Генетика» Г. В. Гуляева (1977) и некоторые другие, монографии Н. П. Дубинина «Общая генетика» (1976), «Генетика» (1985). В последнее время изданы пособия по отдельным специальным курсам: «Курс генетики микроорганизмов» И. А. Захарова (1978), «Основы генетической инженерии» В. Н. Рыбчина (1986). Этого явно мало.

О достоинствах и недостатках настоящего учебника судить читателю. Книга написана с учетом специфики преподавания генетики в нашей стране. Она построена как пособие для главного курса по специальности «Генетика», т. е. наряду с основными положениями науки о наследственности и изменчивости содержит

также некоторые разделы, развиваемые далее в ряде общих и специальных курсов, углубляющих генетическое образование. Прежде всего имеются в виду курсы «Генетический анализ», «Цитогенетика», «Мутационный процесс», «Генетика популяций», «Молекулярная генетика» и др.

Эти курсы в свою очередь служат основой для дальнейшего совершенствования «Общей генетики» или «Генетики с основами селекции». Многие успехи генетики животных, растений или микроорганизмов, казавшиеся вчера частными достижениями в конкретной области, сегодня становятся основой новых направлений генетики. Так произошло, например, с геной инженерией, родившейся на стыке генетики микроорганизмов и ряда «исключений из правил» в частной генетике других объектов.

В подборе и организации материала автор опирался прежде всего на опыт преподавания генетики в Ленинградском государственном университете, в котором в 1919 г. Ю. А. Филипченко организовал первую в нашей стране кафедру генетики, где в 1957 г. М. Е. Лобашев впервые после 1948 г. возобновил преподавание генетики. Освоение курса генетики невозможно без практических и семинарских занятий. Мы рекомендуем распределить материал между лекциями и практическими, а также семинарскими занятиями (см. примечание к оглавлению), избежав дублирования. При этом учтены ограниченное время, отведенное учебными планами на генетику, слабая техническая оснащенность и бедность генетических коллекций на большинстве биологических факультетов.

Построение учебника в чем-то может показаться необычным. Уже в первой главе дается представление о структуре ДНК. Это позволяет в дальнейшем не разрывать общую и молекулярную генетику, к чему мы стремились, исходя из соображений, изложенных в самом начале предисловия.

Представление о геной инженерии вводится в середине книги, а не в конце, что дает возможность опираться на последние достижения в изложении проблем мутационного процесса, теории гена, онтогенетики, генетики человека и др. Подробно изложено генетическое значение жизненных циклов ряда объектов, поскольку хотелось, чтобы учебник был полезен не только студентам, специализирующимся по генетике, но и биологам широкого профиля. При этом автор исходил из того, что нельзя стать генетиком, не будучи биологом, и нельзя быть современным биологом, не зная генетики.

Настоящий учебник — результат коллективного труда. Он формировался в творческих дискуссиях с сотрудниками кафедры генетики и селекции Ленинградского университета при подготовке различных лекционных курсов и практических занятий.

Большую помощь в написании учебника своими критическими замечаниями оказали рецензенты: Ю. К. Фомичев (Белорусский

государственный университет), коллектив преподавателей кафедры генетики Московского государственного университета во главе с С. В. Шестаковым (М. М. Асланян, В. М. Глазер, Н. Н. Орлова и др.).

Большую помощь в работе над учебником оказали сотрудники кафедры генетики Ленинградского государственного университета М. М. Тихомирова, Л. З. Кайданов, В. Г. Смирнов, Н. М. Иркаева, Д. А. Горденин, Ю. И. Павлов, Т. С. Карпова, С. П. Соснихина. Особую благодарность автор приносит Л. В. Бондаренко и О. А. Зеленой за помощь при подготовке книги к печати.

Целый ряд исследователей любезно предоставили оригинальные фотографии в качестве иллюстраций.

Всем товарищам, прямо или косвенно способствовавшим выходу этой книги, автор приносит искреннюю благодарность.

Автор

Генетика и ее место в системе естественных наук

1.1. Предмет генетики

Генетика изучает два неразрывных свойства живых организмов: наследственность и изменчивость. Слово «генетика» придумал У. Бэтсон (1906), он же определил новую науку как физиологию наследственности и изменчивости.

Диалектическое единство этих двух свойств обнаруживается на всех уровнях организации живых систем. Изменчивость — это разнообразие. О разнообразии живого можно судить по данным систематики. Например, известно 286 тыс. видов цветковых растений, 100 тыс. видов грибов, 1—1,5 млн. видов насекомых и т. д. При этом каждый вид характеризуется чертами, воспроизводящимися из поколения в поколение, что демонстрирует свойство наследственности.

Свойства наследственности и изменчивости также прослеживаются в пределах отдельных видов. Легче всего это можно видеть на примере человека. Разнообразие людей практически по любым признакам не требует доказательства. Варьирует морфология: цвет глаз, волос, форма ушей, конечностей. Различаются темпераменты, способности к разнообразной деятельности. Неодинаковы обмен веществ, восприимчивость к различным болезням и т. д.



Рис. 1.1. Одинайцевые близнецы Лилия и Юлия Мякошины



Рис. 1.2. Г. И. Мендель (1822—1884)

В то же время каждый человек знает те черты, которыми он напоминает своих братьев и сестер, родителей, дедушек и бабушек, а также более отдаленных предков.

Почему люди разнообразны? Почему люди похожи друг на друга: как представители одного вида или как родственники?

Ответ на оба вопроса дает генетика, и ответ на них одинаков: потому что каждый человек получил наследственные задатки — гены от своих родителей. Именно благодаря механизму наследования каждый индивидуум имеет черты сходства с предками. Именно потому, что каждый человек

появляется в результате слияния гамет и рекомбинации генов в длительном ряду поколений, дети никогда не повторяют своих родителей. Вообще невозможно найти двух идентичных людей. Чрезвычайно похожи только однояйцевые близнецы и то лишь потому, что появляются в результате вегетативного размножения — деления одной и той же оплодотворенной яйцеклетки (рис. 1.1). При этом следует отметить, что однояйцевые близнецы чрезвычайно похожи только тогда, когда они живут в одинаковых условиях. Если же они выросли в разных условиях, то их легко различить, несмотря на то, что они обладают идентичным набором генов. Следовательно, признаки организма формируются на основе наследственных задатков и под влиянием окружающей среды.

Механизм наследственной передачи признаков, а точнее их задатков — генов, в настоящее время хорошо изучен. Этим мы обязаны прежде всего чешскому ученому Г. Менделю (рис. 1.2), который в 1865 г. сформулировал законы наследования дискретных факторов, или генов, как их теперь называют.

1.2. Основные этапы развития генетики

Первые представления о наследственности содержатся в трудах ученых античной эпохи. Уже к V в. до н. э. сформировались две основные, чисто умозрительные теории: прямого и непрямого наследования признаков. Сторонником прямого наследования был Гиппократ, который считал, что репродуктивный материал собирается из всех частей тела и таким образом все органы тела непосредственно влияют на признаки потомства. По мнению Гиппократа, здоровые части тела поставляют здоровый репродуктивный материал, а нездоровые — нездоровый, и в результате признаки, приобретаемые в течение жизни, должны наследоваться.

Точку зрения Гиппократоса оспаривал Аристотель (IV в. до н. э.). Он был сторонником теории непрямого наследования признаков и считал, что репродуктивный материал вовсе не поступает из всех частей тела, а производится из питательных веществ, по своей природе предназначенных для построения разных частей тела.

Теория прямого наследования просуществовала 23 века. Последней серьезной вариацией на эту тему можно считать теорию пангенезиса Ч. Дарвина (1868), развитую в книге «Изменение животных и растений в домашнем состоянии». Согласно этой теории у растений или животных все клетки «отделяют от себя крошечные геммулы, рассеянные по всему организму». Геммулы попадают в репродуктивные органы, и таким образом признаки передаются потомкам. Как считал и сам Ч. Дарвин, эта теория весьма напоминала взгляды Гиппократоса.

Уже в 1871 г. дарвиновская теория, а правильное, гипотеза пангенезиса была экспериментально проверена Ф. Гальтоном — крупным естествоиспытателем, двоюродным братом Ч. Дарвина. Ф. Гальтон переливал кровь черных кроликов белым, а затем скрещивал реципиентов. «Я повторял это в трех поколениях и не нашел ни малейшего следа какого-либо нарушения чистоты серебристо-белой породы», — писал он. Следовательно, по крайней мере в крови кроликов геммулы не содержатся.

Ситуация становится драматической, если вспомнить, что в 1865 г., еще до публикации дарвиновской гипотезы пангенезиса, уже вышла в свет работа Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами», в которой были сформулированы законы непрямого наследования, позже ставшие основой генетики. Эксперименты Менделя были неизвестны Дарвину. В своей работе «Действие перекрестного и самооплодотворения» (1876) Ч. Дарвин ссылается на сводку Гоффмана «Проблема вида и разновидности» (1869), в которой пять раз упомянута статья Менделя. Эти ссылки не привлекли внимания Дарвина.

Неверно думать, что современники не заметили «Опытов...» Менделя. С 1865 по 1900 г. работу Менделя цитировали по меньшей мере 6 раз, в том числе в Британской энциклопедии за 1881—1885 гг. в статье о «гибридизме». Современники не поняли Менделя. Биология того времени не была готова к восприятию его идей, несмотря на то что он отнюдь не был единственным или первым ученым, ставившим опыты по гибридизации растений. Достаточно упомянуть И. Г. Кельрейтера (1733—1806), немецкого ботаника (работавшего в нескольких городах Европы, в том числе в Петербурге), открывшего гибридную мощь и одинаковый результат реципрокных скрещиваний у табака. Англичанин Т. Э. Найт (1759—1838), экспериментируя, как позднее и Мендель, с горохом, вновь обратил внимание на одинаковый результат реципрокных скрещиваний, на единообразие гибридов первого поколения и расщепление при самоопылении гибридов. Его соотечественник и современник Дж. Госс обнаружил (1822), что гиб-

риды второго поколения при последующем самоопылении делятся на расщепляющиеся и не расщепляющиеся.

Французский исследователь О. Сажрэ (1763—1851) обратил внимание на перераспределение константных признаков при гибридизации. Он предвосхитил понятие комбинативной изменчивости: «Нельзя не восхищаться той простоте способов, которой придерживается природа для возможности бесконечно варьировать ее произведения и избежания однообразия. Эти два способа — слияние и распределение признаков, различным образом комбинируемые, могут довести разновидности до безграничного числа» (1825).

Ни один из предшественников Г. Менделя даже не пытался проанализировать свои результаты количественно: подсчитать соотношение классов среди гибридов различных поколений.

Главное достижение Г. Менделя заключается в том, что он сформулировал и применил принципы гибридологического анализа для проверки конкретной гипотезы — *гипотезы о наследственной передаче дискретных факторов*. Выявленные Г. Менделем закономерности наследования по достоинству были оценены только в 1900 г., когда они вновь были открыты независимо друг от друга тремя исследователями: Гуго Де Фризом в Голландии, Карлом Корренсом в Германии и Эрихом Чермаком в Австрии. К. Корренс и Э. Чермак еще раз продемонстрировали справедливость менделевских закономерностей для гороха, а Г. Де Фриз подтвердил это сразу для 16 видов растений.

Вскоре было доказано, что те же законы наследования справедливы и для животных. У. Бэтсон в 1902 г. продемонстрировал это на примере наследования формы гребня у кур, а Л. Кюэно в том же 1902 г. — на примере наследования серой и белой окраски шерсти у домово́й мыши. Уже в 1909 г. У. Бэтсон опубликовал сводку, где перечислил около 100 признаков растений и приблизительно столько же у животных, для которых доказано наследование по Менделю. Менделизм прочно вошел в науку.

Что же изменилось за 35 лет после менделевских открытий? Прежде всего сформировалась и развилась клеточная теория (табл. 1.1). В общих чертах было выяснено поведение хромосом в митозе и мейозе и при оплодотворении у растений и животных, установлено постоянство хромосомных наборов.

Таблица 1.1. Основные этапы развития клеточной теории

Годы	Событие	Автор
1838—1839	Возникновение клеточной теории	Т. Шванн М. Шлейден
1865	Выход работы «Опыты над растительными гибридами»	Г. Мендель
1870	Описание митоза: у растений	Е. Страсбургер
1879—1882	у животных Открытие слияния пронуклеусов при оплодотворении:	В. Флемминг

1875	у животных	Э. ван Бенеден О. Гертвинг
1883	у растений	Н. Н. Горожанкин
1884		Е. Страсбургер
1883—1884	Возникновение ядерной теории наследственности	В. Ру Е. Страсбургер О. Гертвинг
1883	Появление термина «хромосома»	В. Вальдейер
1884—1887	Открытие «расщепления» хромосом	Л. Гейзер Л. Гиньяр Э. ван Бенеден
1885	Установление постоянства хромосомных наборов	К. Рабль
1887	Описание редукционного деления	В. Флемминг Э. ван Бенеден
1900	Переоткрытие законов Менделя	К. Корренс Э. Чермак Г. Де Фриз

Еще до переоткрытия законов Менделя возникла ядерная гипотеза наследственности, которая была подтверждена изящными опытами немецкого исследователя Т. Бовери (1862—1915), доказавшего равнозначность мужского и женского пронуклеусов при оплодотворении у морского ежа (1889). Если оплодотворять яйца, ядра которых разрушены встряхиванием, или даже их безъядерные фрагменты, то личинка развивается нормально только за счет мужского пронуклеуса. Правда, такие личинки примерно в 4 раза меньше обычных.

В своих опытах Т. Бовери использовал два вида морских ежей: *Echinus microtuberculatus* и *Sphaerechinus granularis*, личинки которых различаются по строению скелета. При нормальном оплодотворении личинки имеют скелет промежуточного строения. Если же оплодотворять безъядерные яйцеклетки *E. microtuberculatus* спер-

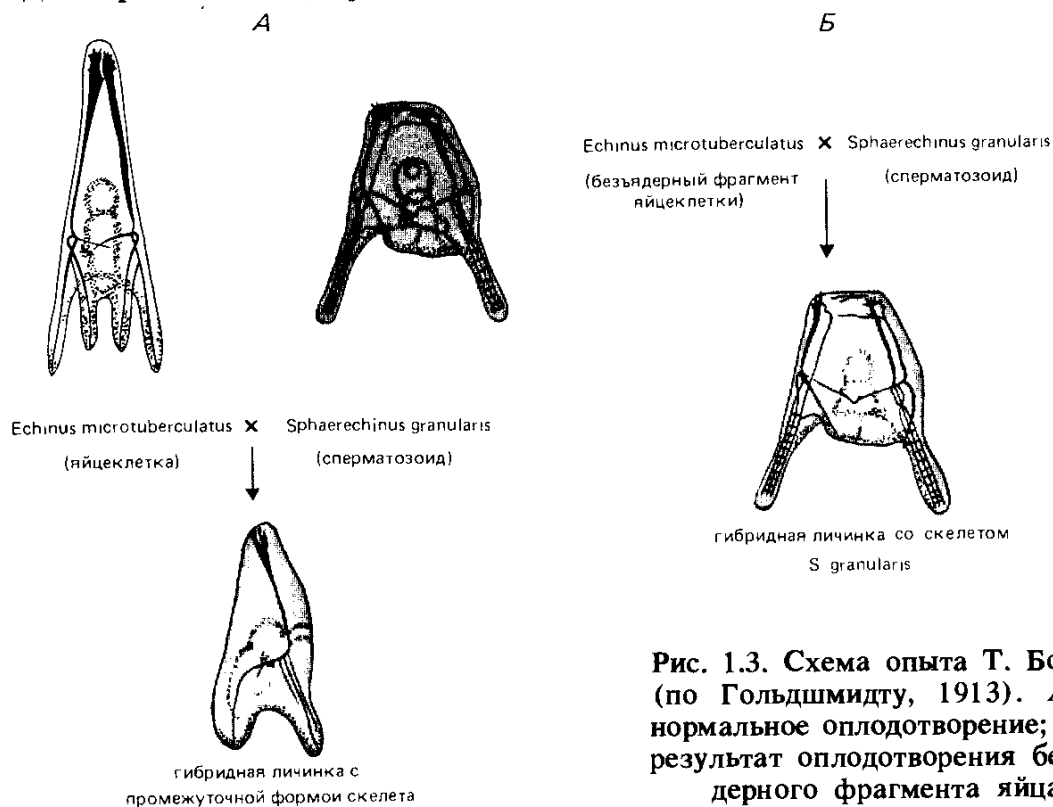


Рис. 1.3. Схема опыта Т. Бовери (по Гольдшмидту, 1913). А — нормальное оплодотворение; Б — результат оплодотворения безъядерного фрагмента яйца

матозоидами *S. granularis*, то личинки полностью повторяют строение скелета *S. granularis*, хотя и обладают меньшими размерами, чем при обычном оплодотворении (рис. 1.3). Таким образом, доказывалась роль ядра в наследовании.

До хромосомной гипотезы оставался один шаг. Его сделал У. Сэттон, обративший внимание на поразительный параллелизм в поведении менделевских факторов и хромосом. Уже после переоткрытия законов Менделя Сэттон в 1903 г. поместил менделевские факторы в хромосомы.

Большое влияние на развитие учения о наследственности оказали взгляды выдающегося немецкого биолога А. Вейсмана (1834—1914). Созданная им в основном умозрительная теория во многом предвосхищала хромосомную теорию наследственности. В дальнейшем она была уточнена с учетом данных цитологии и сведений о роли ядра в наследовании признаков. А. Вейсман доказывал невозможность наследования признаков, приобретенных в онтогенезе, и подчеркивал автономию зародышевых клеток. Ему, в частности, принадлежит объяснение биологического значения редукции числа хромосом в мейозе как механизма поддержания постоянства диплоидного хромосомного набора вида и основы комбинативной изменчивости.

В самом начале XX в. (1901) Г. Де Фриз сформулировал мутационную теорию, во многом совпавшую с теорией гетерогенеза (1899) русского ботаника С. И. Коржинского (1861—1900). Согласно мутационной теории Коржинского — Де Фриза, наследственные признаки не являются абсолютно константными, а могут скачкообразно изменяться вследствие изменения — мутирования их задатков.

Таким образом, методология генетики сформировалась на базе гибридологического анализа, цитологического метода и изучения мутационного процесса. Эти три подхода в изучении наследственности и изменчивости, ставшие основой так называемой классической генетики, развиваются и обогащаются новыми методами на протяжении всей истории генетики и являются ее основой до настоящего времени.

Важнейшая веха в развитии генетики — создание хромосомной теории наследственности, связанной с именем американского эмбриолога и генетика Томаса Ханта Моргана (1866—1945) (рис. 1.4) и его школы. На основе экспериментов с новым тогда объектом — плодовой мушкой (*Drosophila melanogaster*) Морган вместе со своими учениками А. Стёр-



Рис. 1.4. Т. Х. Морган (1866—1945)

тевантом (1891—1970), К. Бриджесом (1889—1938) и Г. Мёллером (1890—1967) к середине 20-х годов нашего века сформулировал представления о линейном расположении генов в хромосомах и создал первый вариант теории гена — элементарного носителя наследственной информации. Проблема гена стала центральной проблемой генетики. Она разрабатывается и в настоящее время.

Дальнейшее развитие учение о наследственной изменчивости нашло в трудах советского ученого Николая Ивановича Вавилова (1887—1943), сформулировавшего в 1920 г. закон гомологических рядов наследственной изменчивости. Этот закон обобщил огромный фактический материал о параллелизме изменчивости близких родов и видов, связав таким образом воедино генетику и систематику. Он явился крупным шагом на пути последующего синтеза генетики и эволюционного учения.

Теория мутационного процесса обогатилась в 1925 г. открытием индуцированного мутагенеза. Советские микробиологи Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов в 1925 г. обнаружили влияние радиоактивного излучения на мутационный процесс у низших грибов. В 1927 г. американец Г. Мёллер продемонстрировал мутагенный эффект рентгеновских лучей в экспериментах с дрозофилой, а другой американский биолог Дж. Стадлер (1927) открыл аналогичные эффекты у растений.

Используя метод индуцированного мутагенеза, советские ученые в 1929 г. во главе с А. С. Серебровским (1892—1948) приступили к изучению строения гена у *Drosophila melanogaster*. В своих исследованиях (1929—1937) они впервые показали его сложную структуру.

В этот период широко развернулись исследования по генетике в СССР. Уже в 1919 г. Ю. А. Филипченко (1882—1930) основал первую в СССР кафедру генетики в Петроградском университете и при ней в 1920 г. исследовательскую лабораторию генетики в Петергофском естественнонаучном институте Петроградского университета. В 1929 г. он опубликовал первый учебник «Генетика», объединивший написанные им ранее книги: «Изменчивость и методы ее изучения» и «Наследственность». Уже после смерти Ю. А. Филипченко вышла его книга «Генетика мягких пшениц», ставшая первым руководством по генетическому анализу растений. В 1921 г. Ю. А. Филипченко организовал в Академии наук при КЕПС (Комитет по естественным производительным силам) исследовательскую лабораторию по генетике, которая впоследствии была преобразована в институт генетики. Этот институт уже после смерти Ю. А. Филипченко в 1930 г. возглавил Н. И. Вавилов.

В 1930 г. А. С. Серебровский основал кафедру генетики в Московском университете. Здесь он продолжал работу по генетике животных одновременно с преподаванием, завершив в 1948 г. свой классический труд «Генетический анализ», увидевший свет только в 1970 г.

В 1932 г. в Ленинградском университете была открыта еще

одна кафедра — генетики растений, которую возглавил Г. Д. Карпеченко (1899—1942), экспериментально показавший возможность объединения двух геномов разных видов растений. Тем самым он доказал один из путей видообразования у растений.

В 20—30-е годы крупнейшим центром исследований по генетике был Институт экспериментальной биологии в Москве, организованный в 1916—1917 гг. Н. К. Кольцовым (1872—1940). В этом институте выполнил свои основополагающие работы С. С. Четвериков (1880—1959), обосновавший в 1926 г. и экспериментально подтвердивший значение мутационного процесса в природных популяциях.

На рубеже 40-х годов Дж. Бидл (род. в 1903 г.) и Э. Тейтум (1909—1975) заложили основы биохимической генетики. Они показали, что мутации у хлебной плесени *Neurospora crassa* блокируют различные этапы клеточного метаболизма и высказали предположение о том, что гены контролируют биосинтез ферментов.

В 1944 г. американцы О. Эвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти доказали генетическую роль нуклеиновых кислот в экспериментах по трансформации признаков у микроорганизмов — пневмококков. Они идентифицировали природу трансформирующего агента как молекулы ДНК. Это открытие символизировало возникновение нового этапа в генетике — рождение молекулярной генетики, которая легла в основу целого ряда революционизирующих открытий в биологии XX века. Ключ к разгадке наследственности оказался спрятанным в структуре биополимера сравнительно простого химического строения.

Приоритет в расшифровке структуры молекулы ДНК принадлежит американскому вирусологу Дж. Уотсону (род. в 1928 г.) и английскому физику Ф. Крику (род. в 1916 г.), опубликовавшим в 1953 г. структурную модель этого полимера.

1.3. ДНК — носитель наследственной информации

ДНК представляет собой полимерную молекулу, в состав которой входят четыре основания: пуриновые — аденин (А), гуанин (G) и пиримидиновые — тимин (Т), цитозин (С). Каждый из них соединен с одной молекулой сахара — дезоксирибозой и с остатком фосфорной кислоты в виде дезоксирибонуклеотидов, которые и представляют собой мономеры, входящие в состав ДНК и образующие полидезоксирибонуклеотиды, или полинуклеотиды. Как показал в 1949—1951 гг. Э. Чаргафф, количество А в любой молекуле ДНК равно количеству Т, а количество G равно количеству С (правило Чаргаффа).

Дж. Уотсон и Ф. Крик, опираясь на это правило, обобщили данные рентгеноструктурного анализа, полученные в лабораториях М. Уилкинса и Р. Франклин, и построили молекулярную модель ДНК. Дж. Уотсон и Ф. Крик так описали основные черты этой модели (рис. 1.5):

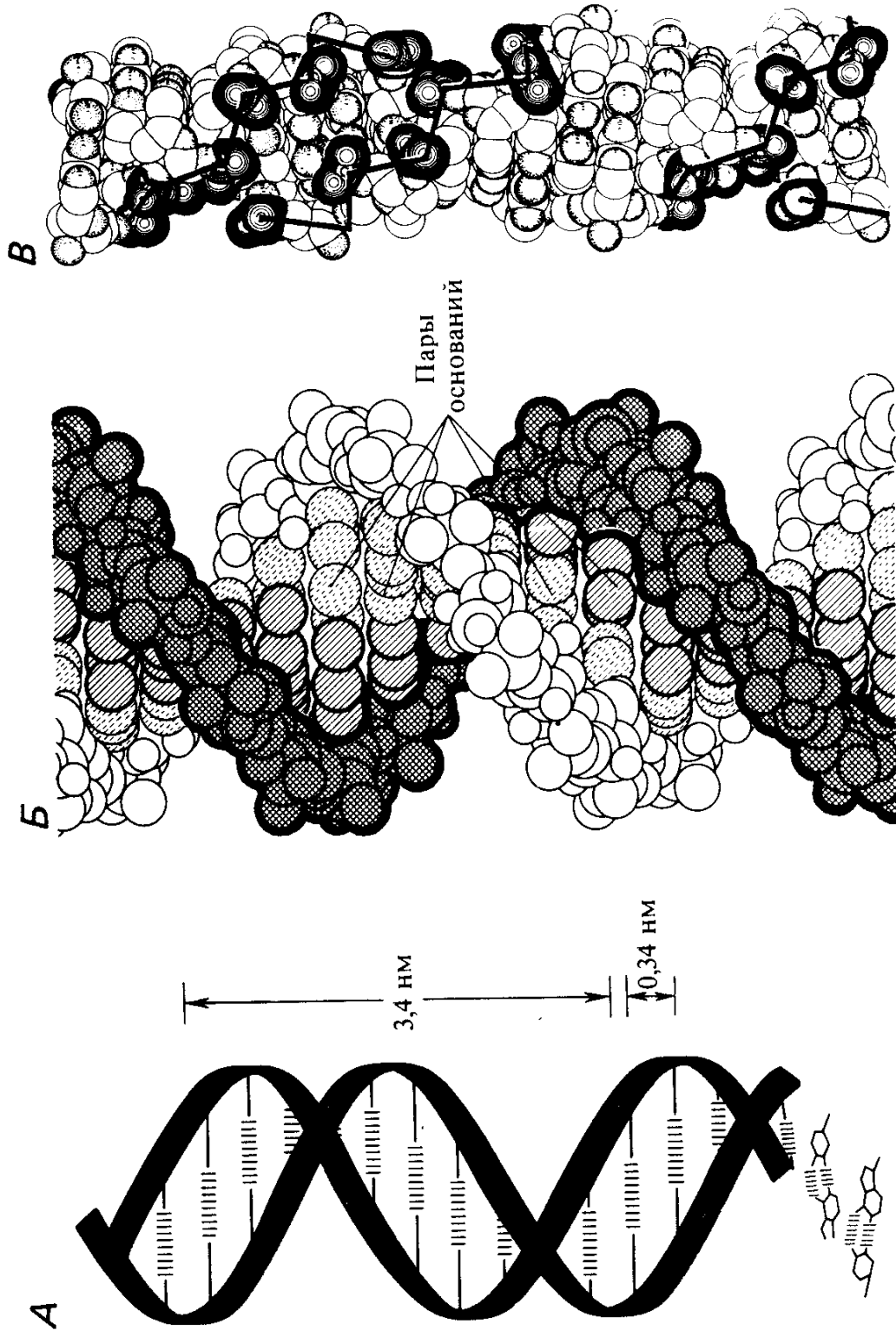


Рис. 1.5. Строение ДНК. А — схема двойной спирали; Б — правая спираль — В-форма ДНК (обратите внимание на регулярную спираль, образуемую сахаро-фосфатным «скелетом» молекулы); В — левая спираль — Z-форма ДНК (ломаная линия соединяет фосфатные группировки); Г — нуклеотид (дезоксиденозин-5'-фосфат)

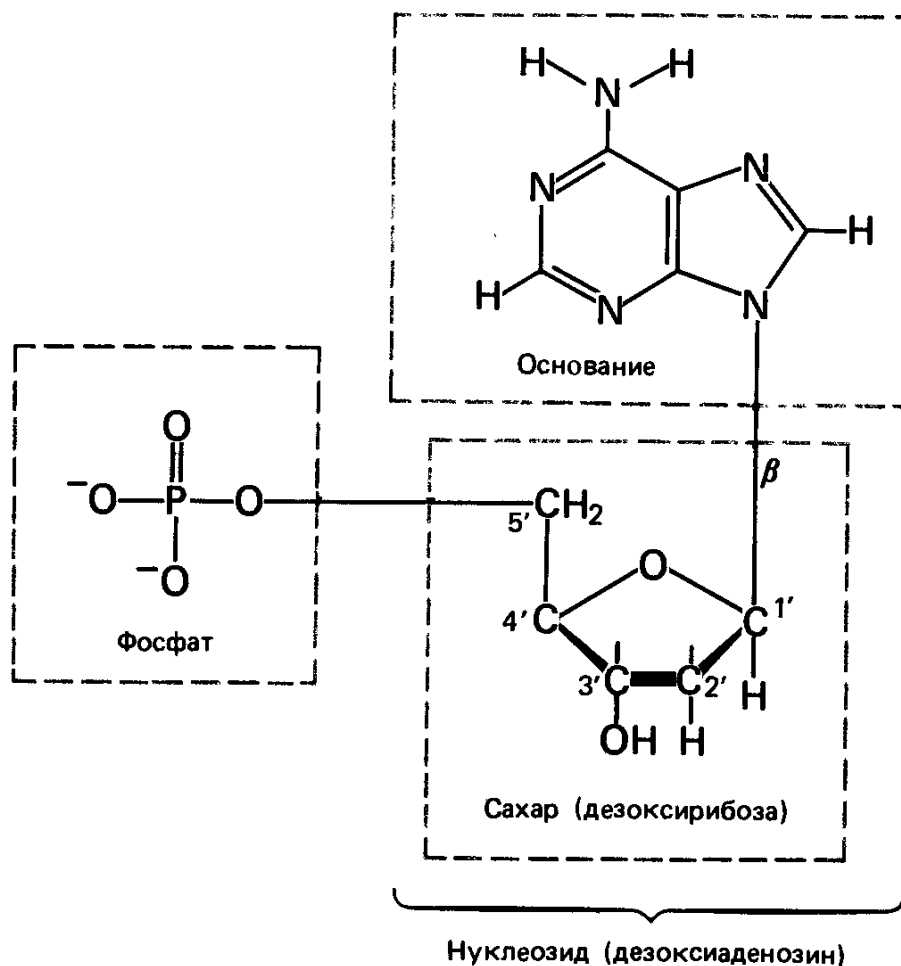


Рис. 1.5. Продолжение.

1. Число полинуклеотидных цепей равно двум.
2. Цепи образуют правозакрученные спирали по 10 оснований в каждом витке.
3. Цепи закручены одна вокруг другой и вокруг общей оси.
4. Последовательность атомов (по отношению к кольцу дезоксирибозы) одной цепи противоположна таковой в другой цепи, т. е. цепи антипараллельны.
5. Фосфатные группировки находятся снаружи спиралей, а основания — внутри и расположены с интервалом 0,34 мкм под прямым углом к оси молекулы.
6. Цепи удерживаются вместе водородными связями между основаниями.
7. Пары, образуемые основаниями А — Т и G — С, в высшей степени специфичны. Таким образом, полинуклеотидные цепи комплементарны друг другу.

На основании этой модели Дж. Уотсон и Ф. Крик предположили, что гены отличаются друг от друга чередованием пар нуклеотидов, и наследственная информация закодирована в виде последовательности нуклеотидов.

Мутации представляют собой результат изменения чередования нуклеотидов.

Воспроизведение генов заложено в структуре ДНК — в комплементарности ее оснований и заключается в разъединении комп-

лементарных полинуклеотидных цепей и последующей достройке новых, комплементарных цепей из нуклеотидов клетки.

Таким образом, в структуре ДНК заложена возможность так называемой конвариантной редупликации. Этим термином Н. В. Тимофеев-Ресовский назвал способность живых организмов воспроизводить себе подобных, мутировать и вновь воспроизводить мутантные варианты. Иначе говоря, свойства наследственности и изменчивости оказались связанными со свойствами конкретного химического соединения — универсального носителя наследственной информации.

Долго считалось, что ДНК может быть только в виде правозакрученной спирали, однако в 1979 г. американский ученый А. Рич доказал, что ДНК существует и в виде левозакрученной спирали (рис. 1.5, В). Эта форма — Z-ДНК — встречается на участках, обогащенных парами G—C и, по-видимому, играет существенную роль в процессах рекомбинации и регуляции действия генов.

Дальнейший прогресс в понимании механизмов репликации генов, их функционирования и перекомбинации всецело связан с успехами молекулярной генетики. На основе этих исследований родилась новая отрасль науки — геновая инженерия, которая позволяет манипулировать индивидуальными генами, получать в пробирке их новые сочетания, получать мутации по желанию экспериментатора, переносить гены одних организмов в клетки других и таким образом конструировать биологические системы, которых никогда не было в природе.

1.4. Методы генетики

Гибринологический метод представляет собой специфический метод генетики. Он в значительной степени совпадает с методом генетического анализа, однако не исчерпывает его, поскольку в генетическом анализе гибринологический метод часто сочетается с методами получения мутаций. Метод гибринологического анализа, заключающийся в гибридизации и последующем учете расщеплений, в законченной форме был предложен Г. Менделем. Им были сформулированы непреложные правила, которым следуют все генетики:

1. Скрещиваемые организмы должны принадлежать к одному виду.

2. Скрещиваемые организмы должны четко различаться по отдельным признакам.

3. Изучаемые признаки должны быть константны, т. е. воспроизводиться из поколения в поколение при скрещивании в пределах линии (родительской формы).

4. Необходимы характеристика и количественный учет всех классов расщепления, если оно наблюдается у гибридов первого и последующих поколений.

Со времен Менделя генетический анализ обогатился целым рядом методов. В частности, методы получения мутаций позволяют создавать исходную гетерогенность для последующего применения гибридологического анализа. Метод отдаленной гибридизации позволяет выяснять степень эволюционного родства между видами и родами. При этом большое значение имеет цитологический метод. В последние годы широкое распространение получили методы гибридизации соматических клеток животных и растений.

Математический метод. Само рождение генетики как точной науки стало возможным благодаря использованию математического метода в анализе биологических явлений. Г. Мендель применил количественный подход к изучению результатов скрещиваний, а также, что не менее важно, к построению гипотез, объясняющих полученные результаты. С тех пор сравнение количественных данных эксперимента с теоретически ожидаемыми стало неотъемлемой частью генетического анализа. Для этого используют методы вариационной статистики. Математический метод незаменим при изучении наследования количественных признаков, а также при изучении изменчивости, особенно ненаследственной, или модификационной.

Цитологический метод используется для изучения клетки как основной единицы живой материи. Исследование строения хромосом вместе с гибридологическим анализом лежит в основе цитогенетики.

В свое время изучение параллелизма в поведении хромосом и наследовании признаков заложило основу формирования хромосомной теории наследственности. В настоящее время анализ конъюгации хромосом в мейозе, наблюдение обменов между гомологичными и негомологичными хромосомами расширяют наши представления о материальных носителях наследственности.

Генетика активно использует и методы других смежных наук. Методы химии и биохимии применяются для более детальной характеристики наследуемых признаков обмена веществ, для изучения свойств молекул белков и нуклеиновых кислот. Для этих же целей служат методы иммунологии и иммунохимии, позволяющие идентифицировать весьма специфично даже мизерные количества тех или иных генных продуктов, прежде всего белков.

Генетика широко использует методы физики: оптические, седиментационные, методы меченых атомов для маркирования и идентификации различных классов макромолекул. Наиболее широко физические, химические и физико-химические методы применяются в молекулярной генетике и генной инженерии.

Генетики, работающие с различными объектами, не могут обойтись и без методов медицины, зоологии, ботаники, микробиологии и других дисциплин. В то же время все большая связь с эволюционной теорией повышает значение для генетики *сравнительного метода*.

1.5. Значение генетики для других наук и практики

Характерная черта методологии генетики состоит в том, что она оперирует дискретными индивидуальными единицами наследственной информации — генами. Этот подход определяет не только место генетики среди других биологических дисциплин, но в еще большей мере — место генетики в общей системе естественных наук. Благодаря открытиям Г. Менделя биология наряду с физикой и химией с начала XX столетия участвовала в формировании современного атомистического мировоззрения, основателями которого были Демокрит (460—370 г. до н. э.) и Эпикур (341—270 г. до н. э.).

Современная генетика вместе с ее практическими отраслями является частью общечеловеческой науки, которая в значительной мере исходит из того, что окружающий мир складывается из неких элементарных сущностей. Физика и химия оперируют молекулами, атомами и элементарными частицами, биология — индивидуумами, клетками и генами.

Положение генетики среди других биологических наук определяет предмет ее исследования — наследственность и изменчивость — свойства, универсальные для всех живых существ.

Генетика и селекция. Генетика представляет собой теоретическую основу селекции растений, животных и микроорганизмов. Опираясь на частную генетику различных объектов, селекционеры подбирают исходный материал для создания новых пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов. При этом применяются различные системы скрещиваний, метод гибридологического анализа, индуцирование мутаций и т. д. Так, «зеленая революция» последних лет в значительной степени основывалась на использовании карликовых мутантов различных злаков. Низкорослые, короткостебельные формы пшеницы, риса, ячменя и других растений устойчивы к полеганию и удобны для машинной уборки, что значительно сокращает потери урожая. Широкое распространение получили методы полиплоидизации растений — умножения числа хромосомных наборов. Полиплоиды обычно мощнее своих диплоидных сородичей и более урожайны. Человек издавна использует естественные полиплоидные формы пшеницы, им созданы искусственные полиплоиды ржи, сахарной свеклы, земляники, арбуза и других культур. Гетерозис, или гибридная мощь растений, открытая И. Г. Кельрейтером, также находит применение в селекции сельскохозяйственных растений и животных. Так, в растениеводстве широко распространены межлинейные и сортолинейные гибриды кукурузы и сорго.

Основываясь на менделевских закономерностях, селекционеры выводят новые породы пушных зверей с различными окрасками и оттенками меха (норка, лисица, ондатра, кролик и др.).

Методы генетики активно используются в рыбоводстве, птицеводстве. Селекция на основе генетики количественных признаков

применяется для повышения мясной и молочной продуктивности скота, а также для повышения урожайности растений.

Большую роль мутационная селекция сыграла в развитии микробиологической промышленности: при создании штаммов — продуцентов белково-витаминных концентратов из дрожжей, продуцентов антибиотиков, витаминов, аминокислот и других биологически активных веществ на основе массового выращивания низших грибов и бактерий.

Новейшие методы генной инженерии применяются для выведения штаммов бактерий и дрожжей, синтезирующих гормоны роста животных, интерферон человека, антиген вируса гепатита и других вирусов, необходимые для борьбы с инфекционными заболеваниями. Развивается клеточная и генная инженерия высших растений, позволяющая переносить гены одних видов и родов растений в другие. Например, при использовании культуры соматических клеток ген фазеолина (основного запасного белка) бобов перенесен в клетки подсолнечника.

Гибридизация соматических клеток растений позволяет объединять геномы видов, никогда не скрещивающихся в природе. Так получены соматические гибриды картофеля и томата, различных декоративных растений и др.

Генетика и медицина. Развитие генетики человека привело к пониманию того, что наряду с заболеваниями, которые вызывают бактериальные, вирусные и другие инфекции, существует значительное число (около 2500) наследственных заболеваний. Генетическая гетерогенность человеческой популяции включает целый ряд аномалий обмена веществ, нарушений конституции и психических заболеваний, причиной которых являются генные мутации и хромосомные аберрации. Известный генетик Ф. Г. Добжанский писал: «Если мы сохраняем слабых и генетически больных и даем им возможность продолжения рода, мы можем опасаться заката генетического. Но если мы дадим им умереть или страдать, в то время как можем помочь, мы, несомненно, предвидим закат моральный».

Ранняя диагностика некоторых наследственных заболеваний позволяет вовремя вмешаться в течение болезни и посредством диетологических или медикаментозных воздействий предотвратить аномальное развитие и гибель больного. Так можно избежать трагических последствий и нормализовать развитие новорожденных, больных галактоземией, не усваивающих молочный сахар, или больных фенилкетонурией, чувствительных к ароматическим аминокислотам, если исключить из их рациона нежелательные соединения.

Ранняя диагностика наследственных заболеваний до рождения ребенка или определение гетерозиготного носительства генных и хромосомных аномалий позволяет избежать нежелательных последствий путем планирования семьи. Большую роль при этом играет медико-генетическое консультирование населения.

До последнего времени излечение наследственных заболеваний

было невозможно. Все разработанные меры лишь устраняли симптомы заболеваний. Развивающаяся техника генной инженерии в ближайшем будущем обещает возникновение новой области медицины — генотерапии, благодаря которой можно будет исправить или заменить аномальные части генетического материала.

Генетика и экология. Хозяйственная деятельность человека часто связана с вмешательством в естественные природные процессы, вследствие чего сокращается площадь лесов, изменяется водный баланс, появляются загрязняющие примеси в водоемах, воздухе и почве. Прогнозирование и предотвращение возможных нежелательных последствий такого вмешательства невозможны без знания как экологии, так и генетики и прежде всего знания генетики популяций, которая оперирует большими численностями организмов, обменивающихся генами в естественных условиях. При этом необходимо предусматривать сохранение оптимальных размеров и условий существования популяций растений, животных и микроорганизмов. Сохранение их генофонда — это сохранение неоценимого природного богатства генов, которые в дальнейшем могут быть использованы человеком в селекционном процессе.

Не случайно великий советский генетик Н. И. Вавилов еще в 1926 г. обратил внимание на те области земного шара, которые согласно его теории являются центрами происхождения многих культурных растений. Эти области особенно богаты разнообразием генофонда и нуждаются в пристальном внимании экологов и генетиков.

Очень важный аспект экологической генетики — изучение мутагенной активности разнообразных физических и химических агентов, используемых человеком. Распространение в нашем обиходе мутагенов может повысить концентрацию аномальных генов, увеличить вероятность наследственных заболеваний. Поэтому каждое новое воздействие, каждое новое вещество, предназначенное для медицины, сельского хозяйства или пищевой промышленности, проходит испытание на генетическую активность. Для этого генетики создают специальные тест-системы: штаммы микроорганизмов, культуры дрозофилы, линии мышей, культуры клеток животных и человека. И только убедившись, что то или иное вещество — не мутаген, можно использовать его для тех или иных целей. Особая важность такой службы генетической безопасности становится очевидной, если учесть, что почти 90 % мутагенов являются канцерогенами.

Генетика и другие биологические науки. Методы и принципы генетики находят применение во всей системе биологических наук.

Как можно убедиться в дальнейшем, дискретность генов отражает дискретность кодируемых ими макромолекул — белков и рибонуклеиновых кислот. Именно поэтому генетика наряду с биохимией стала основой молекулярной биологии.

Современная так называемая синтетическая теория эволюции вобрала в себя значительную часть генетической методологии на основе развития теории Ч. Дарвина о происхождении видов путем

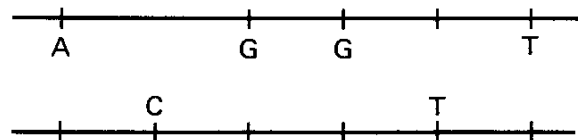
естественного отбора. Тем самым было сформулировано представление об элементарном эволюционном событии — изменении частот определенных аллелей в популяции.

Генетика животных, растений, микроорганизмов находит применение в зоологии, ботанике, микробиологии. Возможность получения генетически детерминированных различий поведения животных широко используется в физиологии животных, в физиологии высшей нервной деятельности. Многие проблемы биохимии решаются с помощью мутантов с измененным метаболизмом (с теми или иными блоками биосинтезов) или измененной регуляцией метаболических путей и т. д.

Без преувеличения можно сказать, что генетика как наука о наследственности и изменчивости находит применение во всех областях деятельности человека, связанных с живыми существами: растениями, животными и микроорганизмами.

Вопросы к главе I

1. Что является предметом генетики?
2. Перечислите основные методы генетики.
3. Какие события сыграли решающую роль в признании менделевских закономерностей наследования?
4. Какие азотистые основания образуют пары в ДНК? На какие группы они подразделяются?
5. Заполните пробелы в схеме ДНК:



6. Перечислите основные характеристики модели ДНК Уотсона—Крика.
7. Какие правила гибридологического анализа предложил Г. Мендель?
8. Каково значение генетики для развития смежных биологических наук? Для практики?

1

ЧАСТЬ

НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ

Глава 2

Законы наследования. Моногибридное скрещивание

2.1. Генотип и фенотип

Открытие основных закономерностей наследования стало возможным потому, что Г. Мендель руководствовался рядом правил постановки эксперимента. Эти правила, перечисленные в предыдущей главе, послужили основой метода гибридологического анализа. Работая с самоопыляющимся растением — горохом садовым, Г. Мендель исследовал семь признаков (табл. 2.1). Убедившись в течение ряда циклов самоопыления в константности выбранных признаков, Г. Мендель скрестил растения, различающиеся по отдельным признакам, получил от них семена и высевал их. Таким образом он вырастил гибриды первого поколения, обозначаемые F_1 . Эти растения оказались единооб-

Таблица 2.1. Признаки растений гороха, исследованные Г. Менделем

Признаки	Альтернативные проявления признаков	
	доминантные	рецессивные
Форма зрелых семян	Круглые	— Морщинистые
Окраска семядолей	Желтая	— Зеленая
Окраска семенной кожуры и коррелирующая окраска цветков	Серая	— Белая
Форма зрелых бобов	Пурпурные	— Белые
Окраска незрелых бобов	Выпуклые	— С перехватами
Расположение цветков	Зеленые	— Желтые
Высота растения	Пазушное	— Верхушечное
	Высокие	— Низкие

разными по каждому из признаков. В F_1 было зарегистрировано лишь одно из пары альтернативных проявлений каждого признака, названное *доминантным* (см. табл. 2.1). (В дальнейшем для краткости будем говорить: альтернативные признаки или просто признаки, подразумевая под этим альтернативные проявления одного признака.)

Эти результаты иллюстрируют *первый закон Менделя* — закон единообразия гибридов первого поколения, а также правило доминирования.

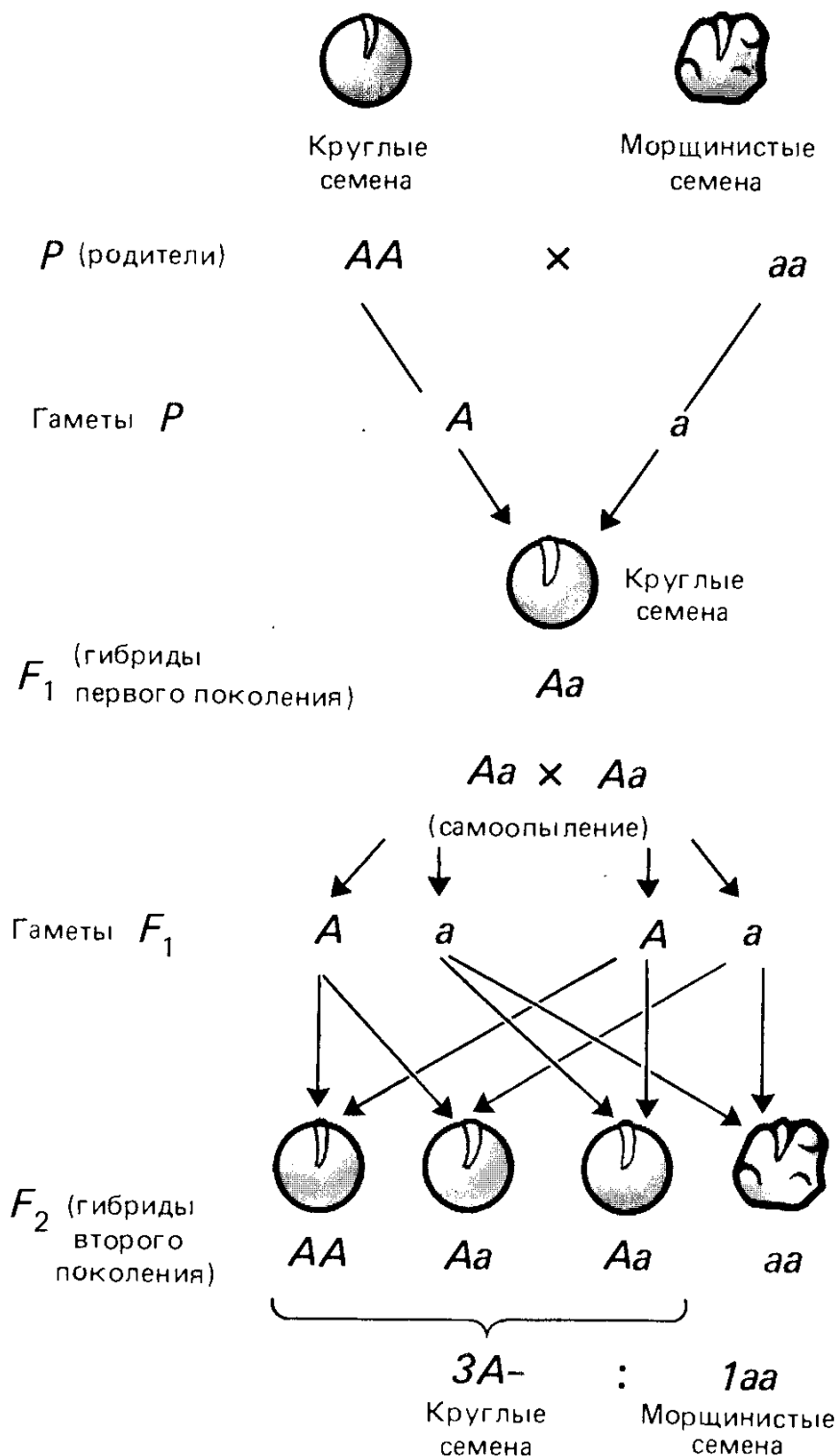


Рис. 2.1. Наследование задатков в моногибридном скрещивании

Гибриды F_1 подверглись самоопылению, и образовавшиеся семена вновь были посеяны. Так было получено второе поколение гибридов, или F_2 . Среди гибридов F_2 обнаружилось расщепление по каждому из признаков: появились как круглые, так и морщинистые семена; как с желтой, так и с зеленой окраской семядолей; как с серой, так и с белой семенной кожурой, и т. д. по всем признакам. Таким образом, у части гибридов F_2 вновь появились признаки, не обнаруженные у гибридов F_1 . Эти признаки названы *рецессивными*. Соотношение потомков с доминантным проявлением признака и потомков с рецессивным проявлением признака оказалось очень близко к $3/4:1/4$. Это соотношение выражает второй закон Менделя, или закон расщепления.

Если обозначить задатки доминантного и альтернативного ему рецессивного признака (например, круглые и морщинистые семена) как A и a , то можно представить весь ход проделанного опыта в виде схемы. Родительские формы, обозначаемые P , были константны; каждый из них содержал задатки только одного типа (рис. 2.1), т. е. родительские формы были *гомозиготными* по исследуемому признаку и соответственно образовывали гаметы либо A , либо a .

Гомозиготным называется организм, произошедший от слияния гамет, несущих одинаковые наследственные задатки.

Гибриды F_1 образуются в результате слияния гамет с задатками альтернативных признаков, т. е. гибриды F_1 *гетерозиготны* (Aa).

Гетерозиготным называется организм, произошедший от слияния гамет, несущих различные наследственные задатки.

Понятия «гомозиготность» и «гетерозиготность» ввел в генетику У. Бэтсон (1902).

Вследствие доминирования в F_1 проявляется признак только одного из родителей — округлость семян. Наконец, среди гибридов F_2 обнаруживается расщепление в соответствии со случайной комбинацией двух типов гамет A и a (рис. 2.1).

Тот же результат можно получить и другим способом. Зная, какие типы гамет образуют гибриды F_1 , строят так называемую решетку Пеннета (табл. 2.2), названную так по имени одного из видных генетиков начала века, предложившего этот способ определения соотношений гибридов F_2 . При этом по горизонтали и по вертикали выписывают гаметы родителей и, комбинируя их, в квадратах таблицы получают генотипы потомков.

Соотношение 3:1 — это расщепление по фенотипу, т. е. по исследуемому признаку. В то же время группа растений F_2 с доминантным признаком неоднородна. Часть из них (Aa) при дальнейшем самоопылении вновь расщепляется в следующем поколении, или в F_3 , а другая часть (AA) не расщепляется. Эти два типа растений количе-

Таблица 2.2. Решетка Пеннета для моногибридного скрещивания

Гаметы F_1	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

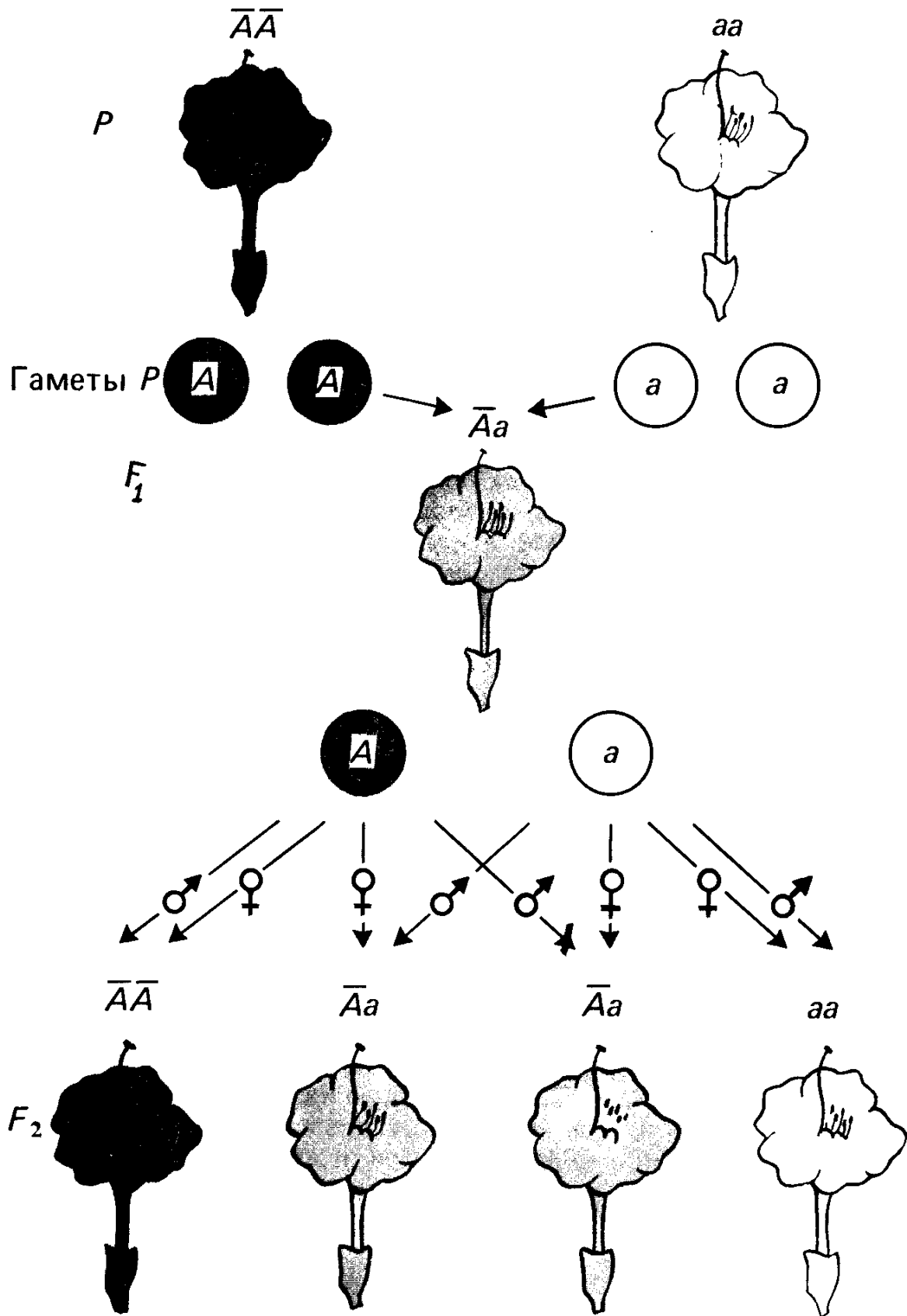


Рис. 2.2. Расщепление в моногибридном скрещивании при неполном доминировании у ночной красавицы, *Mirabilis jalapa*

ственно соотносятся как $2Aa:1AA$ и, как принято говорить, различаются по *генотипу*, т. е. по своим наследственным задаткам — генам. Таким образом, в случае *полного доминирования* расщепление по генотипу $1AA:2Aa:1aa$ не совпадает с расщеплением по фенотипу: $3A — : 1aa$. Прочерк в данном случае означает, что генотипы AA и Aa объединены и записаны в виде *фенотипического радикала* $A—$.

Расщепление по генотипу и фенотипу может совпадать в тех случаях, когда признак проявляет *неполное доминирование*, т. е. наблюдается его промежуточное выражение у гетерозигот при сравнении с обеими гомозиготными родительскими формами, как, например, при наследовании красной и белой окраски цветков у ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*). В этом случае гетерозиготные растения имеют розовые цветки и в F_2 наблюдается расщепление в соотношении $1AA$ (красные цветки): $2Aa$ (розовые цветки): $1aa$ (белые цветки) (рис. 2.2).

Наивно думать, что мудрость Г. Менделя проявилась только в том, что он подсчитал соотношение классов при расщеплении. Гораздо существеннее, что он создал математически обоснованную и проверяемую гипотезу комбинирования наследственных задатков, с помощью которой можно предсказать характер расщепления.

Согласно гипотезе Г. Менделя расщепление, которое он наблюдал, реализуется вследствие равновероятного образования гамет A и a у гибридов F_1 , а также вследствие равновероятной (случайной) встречи гамет обоих типов при оплодотворении, т. е. при образовании гибридов F_2 .

Мендель хорошо понимал, что результаты таких процессов можно наблюдать только при больших выборках растений. Например, изучая расщепление по форме семян, он исследовал 7324 горошины и получил соотношение: 5474 круглых и 1850 морщинистых; по окраске семян исследовал 8023 горошины и получил соотношение: 6022 желтых и 2001 зеленых и т. д., что очень близко к соотношению 3:1.

2.2. Проверка гипотезы — метод χ^2

Статистика позволяет объективно оценить значимость отклонения от теоретически ожидаемого результата и тем самым выяснить, насколько получаемый результат соответствует проверяемой гипотезе. Чаще всего для такой цели используют метод χ^2 (хи-квадрат), согласно которому проверяемой гипотезе соответствует предположение о случайности отклонений от теоретически ожидаемого:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E},$$

где \sum — сумма результатов по всем классам, наблюдаемым в эксперименте, O — наблюдаемое, E — ожидаемое.

Таблица 2.3. Расчет χ^2 для расщепления, полученного Менделем в F_2 , при скрещивании растений гороха, различающихся по форме семян

Величина	Круглые	Морщинистые	Всего
Наблюдаемое (O)	5474	1850	7324
Ожидаемое (E)	$7324 \times \frac{3}{4} = 5493$	$7324 \times \frac{1}{4} = 1831$	7324
$O - E$	-19	+19	0
$(O - E)^2$	261	261	
$\frac{(O - E)^2}{E}$	0,047	0,142	$\chi^2 = 0,189$

Для упомянутого расщепления по признаку формы горошины χ^2 можно рассчитать по табл. 2.3. Полученное значение $\chi^2 = 0,189$. Далее нужно оценить значимость отклонения полученного результата, т. е. узнать, случайно оно или нет. Для этого вводится понятие степеней свободы, или независимых переменных, соответствующее числу классов, значения которых могут варьировать независимо. В данном случае число степеней свободы равно 1. (В экспериментах такого рода число степеней свободы составляет $k - 1$, где k — общее число классов.)

Остается оценить уровень значимости полученного результата при одной степени свободы. Для этого пользуются таблицей (табл. 2.4) предельных значений χ^2 при различных степенях свободы и при различных уровнях значимости отклонений. Обычно используют уровень значимости 0,05. Если вычисленное значение χ^2 не превышает табличного, то можно утверждать, что отклонения от теоретически ожидаемого соотношения вызваны случайными причинами, и исходная гипотеза подтверждается.

Так, вычисленное значение $\chi^2 = 0,189$ (табл. 2.3) не превышает значение 3,84 (предельное при одной степени свободы и уровне значимости 0,05). Следовательно, результат, полученный Менделем, прекрасно согласуется с его гипотезой.

Таблица 2.4. Значения χ^2 , соответствующие различным уровням значимости и степеням свободы

Степени свободы	Уровни значимости		
	0,05	0,01	0,001
1	3,84	6,64	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,82	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,52
6	12,59	16,81	22,46
7	14,07	18,48	24,32
8	15,51	20,09	26,13
9	16,92	21,67	27,88
10	18,31	23,21	29,59

2.3. Анализирующее скрещивание

Как и всякая гипотеза, соответствующая реальным механизмам, гипотеза Менделя содержала возможность предсказания. Так, согласно логике Менделя, если действительно гетерозиготы F_1 образуют с равной вероятностью гаметы, несущие доминантные и рецессивные задатки, то при возвратном скрещивании гибридов F_1 (Aa) с растениями, гомозиготными по рецессивным задаткам (aa), следует ожидать совпадения в расщеплении по генотипу и фенотипу. При этом число особей с доминантным и рецессивным проявлением признака должно быть одинаковым (рис. 2.3). Действительно, при подобном скрещивании было по-

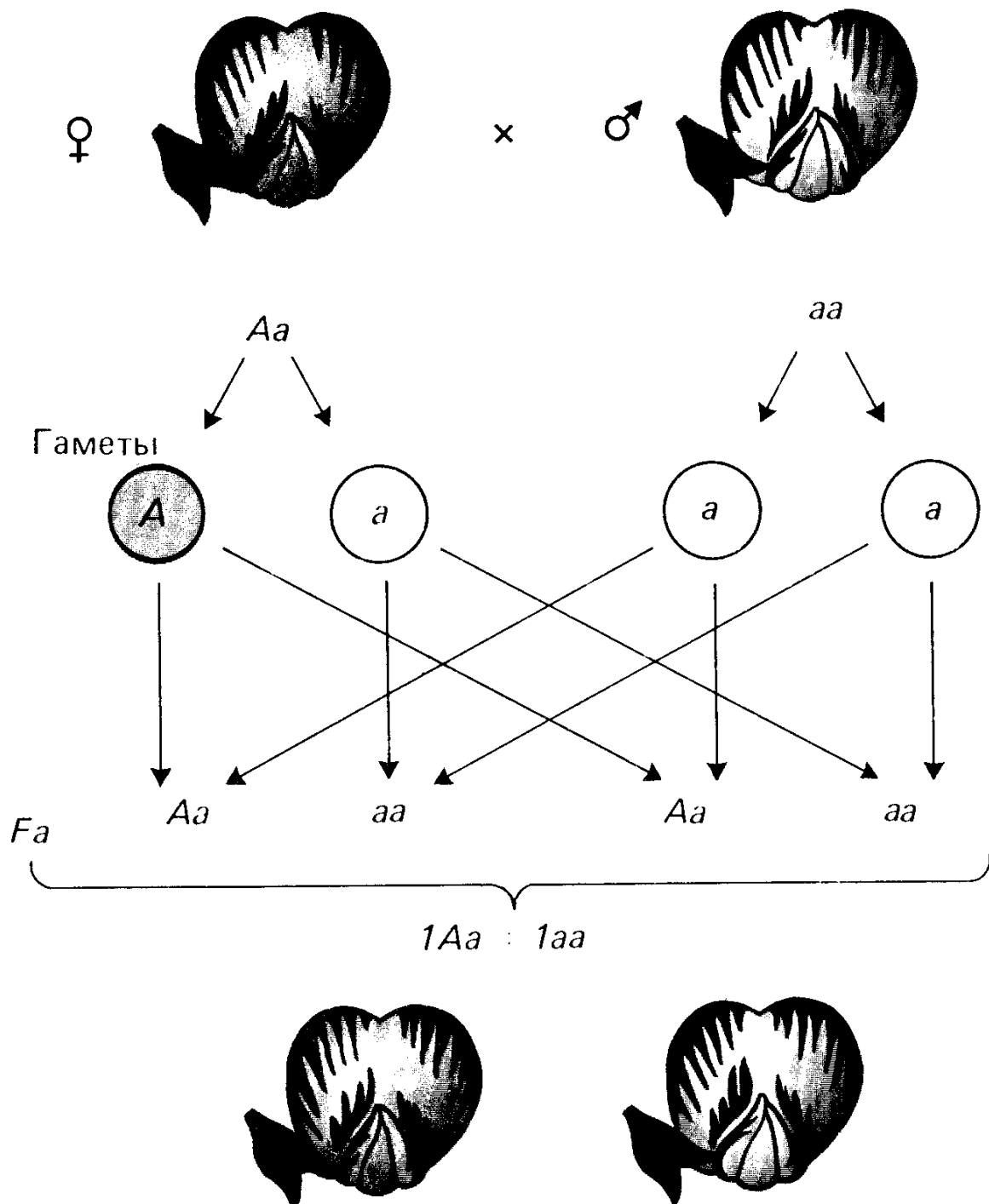


Рис. 2.3. Анализирующее скрещивание (по окраске цветков гороха)

лучено именно такое соотношение классов. Например, скрещивая гибриды, гетерозиготные (Aa) по признаку окраски цветка (пурпурная/белая), с растениями, имеющими белые цветки (aa), Мендель получил соотношение: 85 растений с пурпурными цветками и 81 с белыми, что очень близко к ожидаемому соотношению $1Aa:1aa$.

Скрещивание формы с доминантным признаком и формы — гомозиготного рецессива получило название *анализирующего скрещивания*. Гаметы гомозиготного рецессива как бы анализируют генотип формы, несущей доминантный признак, вскрывают соотношение типов гамет, образуемых гетерозиготой, или выявляют гомозиготность доминантной формы.

На основе анализа своих скрещиваний Мендель пришел к важному выводу о том, что рецессивные задатки не исчезают в гетерозиготном организме, а остаются неизменными и вновь проявляются при встрече с такими же рецессивными задатками в последующих поколениях или в анализирующих скрещиваниях.

Позднее У. Бэтсон, исходя из этого феномена, сформулировал *правило чистоты гамет*, согласно которому явление расщепления основано на наследовании дискретных единиц — доминантных и рецессивных задатков (У. Бэтсон в 1902 г. предложил называть их *аллеломорфами*), не смешивающихся в гетерозиготном организме и расходящихся «чистыми» при образовании гамет.

В настоящее время принято понятие *ген*, которое введено в обиход датским генетиком В. Иоганнсенем в 1909 г. взамен менделевского «зачатка». Тогда же В. Иоганнсен предложил сокращенный термин *аллель* вместо аллеломорф для обозначения реального состояния гена: A или a . Тогда же он ввел понятие *генотип* и *фенотип*.

Генотип — это совокупность наследственных задатков организма, *фенотип* — совокупность признаков организма.

Рассматриваемые в этой главе закономерности наследования касаются проявления признака и расщеплений в тех скрещиваниях, где родители различались только по аллелям одного гена.

Скрещивание, в котором родительские формы отличаются по аллелям одного гена, называется моногибридным.

2.4. Концепция элементарных признаков

Уже при первом знакомстве с результатами опытов Менделя на примере моногибридного скрещивания можно убедиться в том, что генетик постоянно имеет дело с признаками и определяющими их генами. Передача генов (их аллелей) из поколения в поколение прослеживается по проявлению того или иного признака, его доминантного или рецессивного состояния. При этом закономерности расщепления отражают процессы образования гамет и оплодотворения.

Закономерности расщепления, сконцентрированные в правиле чистоты гамет, отражают способность гена к стабильному само-

воспроизведению. В то же время стабильность фенотипа, закономерное проявление доминантного или рецессивного признака отражает другую характеристику гена — его способность фенотипически проявляться. Эти два свойства гена неотделимы друг от друга. Тем не менее закон единообразия гибридов первого поколения в большей степени касается действия гена, нежели закон расщепления.

Здесь уместно подчеркнуть один важный принцип гибридологического анализа, введенный Менделем, — исследование дискретных признаков, различия по которым наследуются альтернативно. Таким образом, понятие «признак» в менделевских экспериментах — это уже специальный термин. Он конкретизируется на основании гибридологического анализа и выступает в форме элементарной составляющей фенотипа. Подобно тому как мы говорим об элементарных, дискретных единицах генотипа, или генах, следует говорить и об элементарных единицах фенотипа — *элементарных признаках*, или *фенах*, различия между которыми наследуются по альтернативной моногибридной схеме.

В опытах Менделя в качестве элементарных признаков выступали: форма горошин, которая могла быть круглой или морщинистой, окраска цветков — пурпурная или белая, рост растения и т. д. (см. табл. 2.1). Альтернативные выражения каждого элементарного признака детерминировались различными аллелями одного гена.

Одна аллель детерминирует развитие доминантного, другая — рецессивного состояния признака.

Что может выступать в качестве элементарного признака или фена? Практически любой признак используется в гибридологическом анализе в качестве элементарного: форма, окраска органов или целых организмов, наличие или отсутствие органов. Иначе говоря, вся морфология организма может быть представлена как система элементарных признаков.

Поведение животных или человека тоже может быть разложено на элементарные признаки. Например, известны так называемые вальсирующие мыши. При скрещивании их с нормальными мышами в F_1 наблюдают нормальное поведение, а в F_2 — расщепление в соотношении $3/4$ нормальных : $1/4$ вальсирующих. У дрозофилы по моногибридной схеме наследуется признак «скорость впадения в эфирный наркоз».

Известно огромное количество особенностей обмена веществ, которые также представляют собой элементарные признаки.

В 1902 г. А. Гаррод начал публикации о врожденных аномалиях метаболизма у человека. Одна из его работ носила название «Врожденные ошибки метаболизма» (1909). Сейчас известно более 100 видов метаболических аномалий у человека, наследующихся по менделевской моногибридной схеме, например галактоземия или фенилкетонурия (с. 20).

Наконец, строение отдельных белковых молекул представляет собой выражение элементарных признаков. Ярким и хорошо изу-

ченным примером этого рода служат так называемые гемоглобинопатии человека — «болезни гемоглобина». Известно несколько десятков примеров аномальных гемоглобинов, отличающихся от нормального гемоглобина одной аминокислотой в молекуле. И в каждом случае альтернативные состояния признака (нормальный — измененный гемоглобин) наследуются в соответствии с моногибридной схемой, т. е. в каждом случае структуру гемоглобина детерминируют разные аллели одного и того же гена (см. гл. 20).

Проявление элементарных признаков на уровне белков было обнаружено уже в 50-х годах нашего века и имело принципиальное значение для понимания механизмов действия гена. Очевидно, все признаки организма связаны с обменом веществ и в конечном итоге им определяются. А обмен веществ, метаболизм контролируют многочисленные белки — ферменты.

Благодаря этому в большинстве случаев при детальном исследовании удается конкретизировать представление об элементарном признаке, или фене, в виде структуры какого-то одного белка.

Примером служит уже рассмотренная наследственная болезнь галактоземия: в первом приближении это сложный комплекс морфологических и психических аномалий, который наследуется по моногибридной, или моногенной, схеме. Исследование метаболизма больных позволяет свести все эти нарушения к одному метаболическому дефекту — неспособности усваивать галактозу. Наконец, и эти сведения можно конкретизировать: у больных не работает один фермент — галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза. И этот дефект рецессивен по отношению к нормальному выражению признака, т. е. к нормальной работе галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы.

Обобщая примеры такого рода, можно сказать, что дискретность фенотипа, выявляемая генетическим анализом в виде элементарных признаков, или фенов, соответствует молекулярной дискретности генных продуктов, которые в конечном итоге и ответственны за все процессы в клетке и организме.

2.5. Доминирование и другие взаимодействия аллелей

Более пристальное рассмотрение элементарных признаков, т. е. признаков, альтернативные состояния которых наследуются по моногибридной схеме, позволяет подойти к проблеме доминирования, исследовать его механизм. И не только механизм доминирования, но и механизм действия и взаимодействия аллеломорфных пар вообще.

Казалось бы, с точки зрения рассмотрения генетически детерминированной активности фермента (или отсутствия активности), явление доминирования не представляет проблемы. Ферментативная активность должна доминировать над ее отсутствием.

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* есть формы, наследственно различающиеся по окраске колоний: красные и белые. Красная

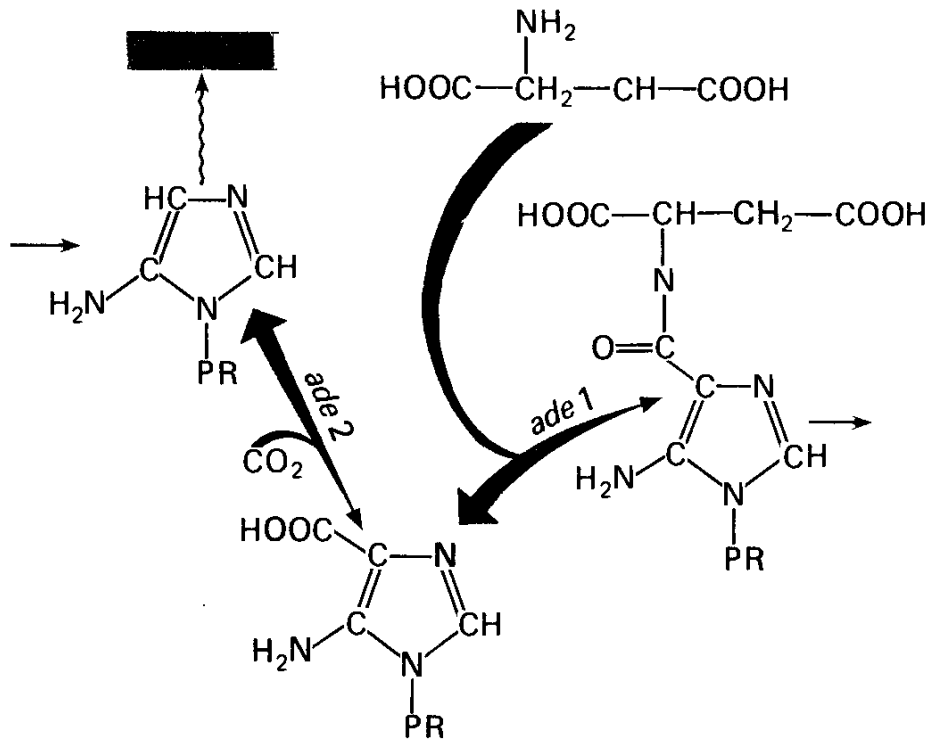


Рис. 2.4. Блок пути биосинтеза пуринов, приводящий к накоплению красного пигмента и потребности в аденине у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, возникает вследствие изменения генов *ade1* и *ade2*, контролирующих соответственно сукциноаминоимидазолкарбоксамидриботидсинтетазу (САИКАР-синтетазу) и аминоксидазолриботидкарбоксилазу (АИР-карбоксилазу)

пигментация — рецессивный признак. Она возникает вследствие генетического блока в биосинтезе пуринов: отсутствует активность фермента фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазы и поэтому дрожжи для своего роста нуждаются в экзогенном аденине. Субстрат реакции (аминоимидазолриботид) накапливается в клетке и конденсируется в красный пигмент (рис. 2.4). У белых дрожжей упомянутый фермент работает нормально, пигмент не накапливается и дрожжи не нуждаются в аденине. Они синтезируют его сами. Подобные примеры можно найти в описании любого метаболического пути, генетический контроль которого хорошо изучен.

Явление доминирования не исчерпывает все случаи взаимодействия аллелей (рис. 2.5). Уже упоминалось явление неполного доминирования (с. 27). Кроме того, известны случаи отсутствия доминантно-рецессивных отношений или, точнее, случаи кодоминирования. Типичный пример такого взаимодействия аллелей — наследование антигенных групп

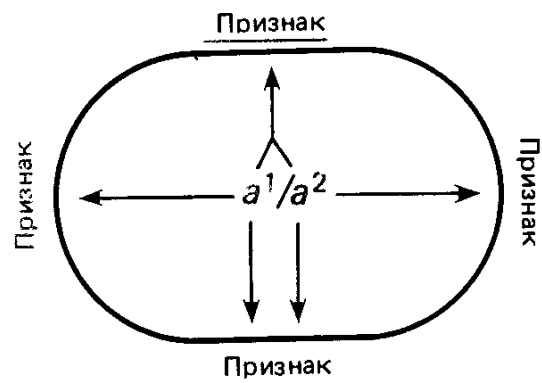


Рис. 2.5. Типы взаимодействия аллелей (a^1 , a^2 — аллели одного гена)

крови человека: А, В, АВ и О, детерминируемых геном *I*.

Известны три типа аллелей этого гена: I^A , I^B , i^O . При гомозиготности $I^A I^A$ эритроциты имеют только поверхностный антиген А (группа крови А, или II). При гомозиготности $I^B I^B$ эритроциты несут только поверхностный антиген В (группа В, или III). В случае гомозиготности $i^O i^O$ эритроциты лишены А и В антигенов (группа О или I). В случае гетерозиготности $I^A i^O$ или $I^B i^O$ группа крови определяется, соответственно, А (II) или В (III). Эритроциты имеют, соответственно, антигены только А или только В. Это уже известный случай полного доминирования.

Если же человек гетерозиготен $I^A I^B$, его эритроциты несут оба антигена: А и В (группа крови АВ, или IV). Это и есть случай кодоминирования. Аллели I^A и I^B работают в гетерозиготе как бы независимо друг от друга, что и определяют с помощью иммунологических методов.

Знание генетического контроля групп крови имеет большое практическое значение. Дело в том, что у людей с группой О в плазме крови присутствуют гемагглютинины α и β , с группой А — гемагглютинин β , с группой В — α . У людей группы АВ в плазме нет ни α - ни β -гемагглютининов. При этом агглютинин α специфически связывает и осаждает эритроциты с антигеном А, агглютинин β — эритроциты с антигеном В. На этих взаимоотношениях основана система переливания крови (табл. 2.5). Кровь группы О

Таблица 2.5. Группы крови человека

Реципиенты (гемагглютинины)	Доноры (генотип)			
	О ($i^O i^O$)	А ($I^A I^A$; $I^A i^O$)	В ($I^B I^B$; $I^B i^O$)	АВ ($I^A I^B$)
О ($\alpha \beta$)	—	+	+	+
А (β)	—	—	+	+
В (α)	—	+	—	+
АВ (О)	—	—	—	—

Примечание: «+» — реакция осаждения эритроцитов при переливании крови.

можно переливать всем людям, кровь группы А — людям с группами крови А и О, группы В — людям с группами В и О, а кровь группы АВ — только людям с той же группой (табл. 2.5). Нарушение этих правил приводит к геморрагическому шоку вследствие связывания эритроцитов гемагглютинами плазмы.

Знание этих закономерностей используется также в судебной медицине для идентификации пятен крови и при установлении отцовства.

Пример наследования групп крови иллюстрирует и проявление множественного аллелизма: ген *I* может быть представлен тремя разными аллелями, которые комбинируются в зиготах только попарно.

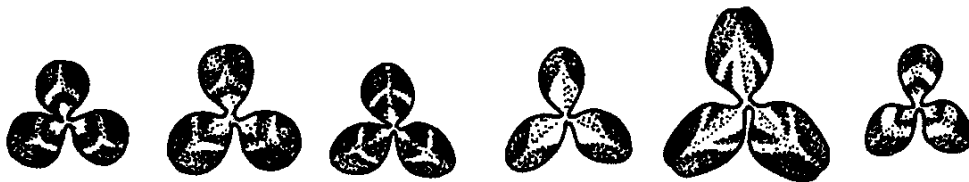
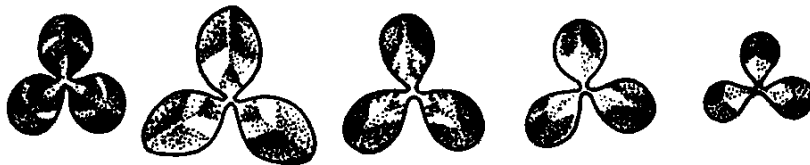
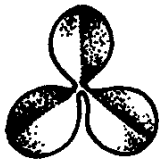


Рис. 2.6. Множественная серия аллелей, определяющих рисунок на листьях белого клевера и их взаимодействие в гетерозиготе (по: D. Suzuki, A. Griffiths, R. Levontin, 1981). Показаны следующие генотипы:

vv — гомозиготный рецессив

V^1V^1

V^hV^h ; V^lV^h

V^fV^f ; V^lV^f ; V^hV^f

$V^{ba}V^{ba}$; V^lV^{ba} ; V^hV^{ba} ; V^fV^{ba}

$V^{bb}V^{bb}$; V^lV^{bb} ; V^hV^{bb} ; V^fV^{bb} ; $V^{ba}V^{bb}$

$V^{by}V^{by}$; V^lV^{by} ; V^hV^{by} ; V^fV^{by} ; $V^{ba}V^{by}$; $V^{bb}V^{by}$

Явление множественного аллелизма широко распространено в природе. Известны обширные серии множественных аллелей, определяющих тип совместимости при опылении у высших растений, при оплодотворении у грибов, детерминирующих окраску шерсти животных, глаз у дрозофилы, форму рисунка на листьях белого клевера, наконец, у растений, животных и микроорганизмов известно много примеров так называемых аллозимов или аллельных изоэнзимов — белковых молекул, различия между которыми определяются аллелями одного гена.

Во многих случаях попарные взаимодействия членов серии аллелей приводят к тому, что исследуемый признак проявляется

иначе, чем у гомозиготных родительских форм. В качестве примера можно привести наследование узора на листьях белого клевера (рис. 2.6). На рисунке показаны формы, гомозиготные по различным аллелям гена *V* (по вертикали), и формы, несущие разные сочетания этих аллелей.

В некоторых случаях механизм взаимодействия аллелей расшифрован. Вернемся к примеру с красными и белыми дрожжами. Существует большое число красных аденинзависимых мутантов дрожжей. Большинство из них несет изменения одного и того же гена. Во всех случаях потребность в аденине и красная окраска колоний рецессивны по отношению к белой окраске и, соответственно, к отсутствию потребности в аденине. Аллель, определяющая доминантный признак, обозначается, как это принято в генетике, прописными буквами: *ADE* — сокращенное наименование признака. Такую аллель условно называют нормальной или аллелью дикого типа. Поскольку путь биосинтеза аденина состоит из многих (двенадцати) этапов, каждый ген, контролирующий отдельный этап, имеет свой номер. Интересующий нас ген — *ADE 2*.

Для обозначения аллелей этого гена, определяющих мутантный, рецессивный признак (рецессивных аллелей), используют те же буквы, но строчные — *ade*, а поскольку таких аллелей много, справа приписывают номер аллели: *ade 2-1*, *ade 2-2* и т. д. В гомозиготном состоянии (или в гомозиготе) все они определяют характерный рецессивный или мутантный фенотип — красную окраску колонии и потребность в аденине вследствие отсутствия активности фермента фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазы.

В некоторых случаях при объединении в гибриде двух разных аллелей независимого происхождения, рецессивных по отношению к дикому типу, наблюдают восстановление нормы, т. е. признака дикого типа (табл. 2.6). При этом частично восстанавливается и ферментативная активность. Такое восстановление дикого фенотипа происходит весьма специфично — только в некоторых комбинациях аллелей (табл. 2.6).

Таблица 2.6. Взаимодействие аллелей гена *ADE 2* у дрожжей-сахаромицетов при попарных сочетаниях в гетерозиготе

Аллели	<i>ADE 2</i>	<i>ade 2-1</i>	<i>ade 2-2</i>	<i>ade 2-3</i>	<i>ade 2-4</i>
<i>ADE 2</i>	+	+	+	+	+
<i>ade 2-1</i>	+	+	+	+	—
<i>ade 2-2</i>	+	+	—	+	—
<i>ade 2-3</i>	+	+	+	—	—
<i>ade 2-4</i>	+	—	—	—	—

Примечание: «+» — восстановление нормального фенотипа, «—» — отсутствие взаимодействия.

Это загадочное, на первый взгляд, явление описано для многих объектов: дрозофилы, мышей, зеленой водоросли *Chlamydomonas*, многих грибов и т. п. Лучше всего оно изучено у микроорганизмов.

Примерно у 50 % генов, которые исследованы таким образом, обнаружен данный тип взаимодействия, получивший название межаллельной комплементации. Механизм его расшифрован. Оказалось, что все гены, аллели которых взаимодействуют подобным образом, контролируют структуру ферментов, построенных из одинаковых белковых субъединиц, т. е. одна и та же полипептидная цепь повторена в них несколько раз: от двух до восьми.

Если исследовать гомозиготы по рецессивным аллелям (см. табл. 2.6), то в этом случае в белковой молекуле повторяются одинаковые и одинаково испорченные субъединицы. А вот если изучать гибриды, гетерозиготные по разным рецессивным аллелям (такие гибриды также называют *компаундами*) (см. табл. 2.6): *ade 2-1/ade 2-2*; *ade 2-1/ade 2-3* и т. д., то в этом случае фермент будет содержать субъединицы, испорченные немного по-разному, и иногда эти субъединицы, взаимодействуя, приводят к восстановлению ферментативной активности. Как происходит это взаимодействие?

Для ответа на этот вопрос необходимо обратиться к современным представлениям о структуре белков, характере складывания в них непрерывной полипептидной цепи. В каждом белке есть несколько функциональных центров: для связывания субстрата, для взаимодействия с коферментами, с регуляторными молекулами, с мембранами клетки и т. д. Каждый функциональный центр обычно представлен полуавтономным участком специфически уложенной полипептидной цепи — *доменом* (рис. 2.7).

Разные рецессивные аллели одного и того же гена отличаются друг от друга тем, что кодируют полипептиды с повреждениями различных доменов. Если в гетерозиготе (компаунде) объединятся аллели с разными повреждениями таким образом, что в молекуле фермента, состоящей из субъединиц — продуктов одного и того же гена, соберутся все необходимые функциональные центры, то ферментативная активность будет восстановлена.

В соответствии с этим объяснением можно нагляднее представить данные табл. 2.6 (см. рис. 2.7). Тогда становится понятным, почему только отдельные сочетания аллелей приводят к восстановлению дикого фенотипа. Здесь имеет место явление *внутримолекулярного, или локального, доминирования*.

Итак, рассмотрев различные типы взаимодействия аллелей, отметим, что во всех случаях, где наблюдается та или иная форма доминирования, одну аллель можно рассматривать как активную, т. е. детерминирующую проявление признака, а другую — как неактивную. Луч-

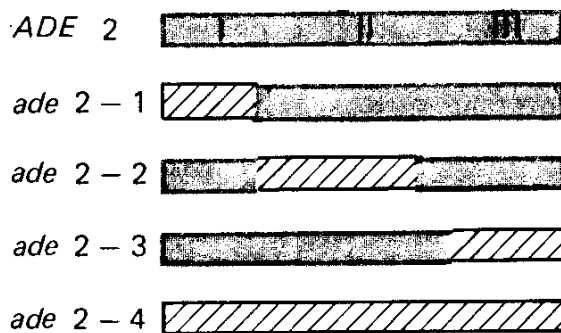


Рис. 2.7. Схематическое изображение повреждения различных функциональных центров (I, II, III) в белковой молекуле фосфорибозиламиноимидазолкарбокислазы у дрожжей-сахаромицетов

ше всего эти взаимоотношения иллюстрируют специфические функции белков — носителей элементарных признаков, или фенов. При этом следует подчеркнуть, что свойства доминантности — рецессивности относятся, строго говоря, не к самим аллелям, а к признакам. Таким образом, может быть принято рациональное зерно гипотезы «присутствия — отсутствия» У. Бэтсона, который предложил ее тогда, когда не только не было известно, как действуют гены, но и самого термина «ген» еще не существовало. По У. Бэтсону, рецессивные аллели представляют собой результат утраты доминантных аллелей. Теперь известно, что на самом деле мутации, приводящие к появлению рецессивных аллелей, далеко не всегда сопровождаются физической потерей генетического материала (см. гл. 12). Тем не менее они, как правило, возникают в результате утраты какой-либо нормальной функции.

Важно также отметить, что несмотря на различные и порой сложные по своим механизмам взаимодействия аллелей, которые уже рассмотрены, все они подчиняются первому закону Менделя — закону единообразия гибридов первого поколения.

Вопросы к главе 2

1. Дайте определение понятий «генотип», «фенотип». Приведите примеры.
2. Какое скрещивание называется анализирующим и почему? Привести пример.
3. У человека рецессивный ген s детерминирует врожденную глухоноту. Наследственно глухонемой мужчина женился на женщине с нормальным слухом. Их ребенок имеет нормальный слух. Можно ли определить генотип матери и ребенка?
4. Сколько фенотипических классов при неполном доминировании можно выявить в потомстве от самоопыления моногетерозиготы?
5. Из желтого семени гороха получено растение, которое дало 215 семян, из которых 165 желтых и 50 зеленых. Каковы генотипы всех форм? Докажите соответствие теории и экспериментальных данных.
6. Отец и мать ощущают горький вкус фенилтиомочевины. Двое из их четверых детей не чувствуют вкуса этого препарата. Принимая, что различия по чувствительности к фенилтиомочевине моногенны, определите, доминантна или рецессивна нечувствительность к фенилтиомочевине.
7. От брака двух людей с нормальной пигментацией родился ребенок альбинос. Объясните, почему это могло произойти, и определите генотипы родителей и ребенка.
8. Муж и жена гетерозиготны по рецессивному гену альбинизма. Если у них родится разнояйцевая двойня, какова вероятность того, что оба ребенка будут альбиносами?
9. Альбиносы у растений летальны, однако у многих видов они довольно часто проявляются (в виде проростков) в потомстве нормальных растений. Если альбиносы гибнут, то почему они полностью не исчезают?
10. Какое расщепление по фенотипу следует ожидать в F_2 моногибридного скрещивания, если жизнеспособные женские гаметы образуются с частотой $0,4A : 0,6a$, а мужские $0,8A : 0,2a$?

11. Какое расщепление по фенотипу следует ожидать в F_2 моногибридного скрещивания, если на ранних стадиях эмбрионального развития гибнет 20% зигот Aa и 80% зигот AA ?

12. Может ли у матери с группой крови А и отца с группой крови О родиться ребенок с группой крови В? Объясните ответ.

13. В каких случаях гибриды F_1 отличаются по фенотипу от обеих гомозиготных родительских форм?

Глава 3

Законы наследования. Полигибридные скрещивания

3.1. Закон независимого наследования признаков

Существование дискретных наследственных факторов, или генов, следует из анализа моногибридного скрещивания, рассмотренного в предыдущей главе. Родительские формы, взятые в скрещивание, могут различаться по нескольким фенам и соответственно по нескольким генам. Такие случаи также были рассмотрены в работе Менделя.

Скрещивание, при котором родительские формы различаются по аллелям двух генов, носит название *дигибридного*. Гибриды, гетерозиготные по двум генам (в данном случае гибриды F_1), называют *дигетерозиготными*. Точно так же рассматривают три-, тетра- и в общем случае полигибридные скрещивания и соответственно три-, тетра- и полигетерозиготы.

Классический пример анализа дигибридного скрещивания дал Г. Мендель, скрестивший две формы гороха, различающиеся одновременно по форме и по окраске семян (семядолей). Материнское растение образовывало круглые желтые семена, а отцовское — морщинистые зеленые семена. Согласно правилу доминирования и закону единообразия гибридов первого поколения все гибридные семена были круглыми желтыми. Растения, выращенные из этих семян, подвергались самоопылению и в результате получены гибридные семена второго поколения. В соответствии с законом расщепления вновь появились морщинистые, а также зеленые семена. При этом наблюдались все возможные сочетания исследуемых признаков. Этот феномен отражает сущность третьего закона Менделя, — закона независимого наследования признаков, или, говоря более строго, независимого комбинирования генов. При рассмотрении этого закона необходимо учесть, что речь идет об анализе расщепления по двум элементарным признакам, или фенам. Кроме того, следует учесть, что Мендель в своей работе не всегда терминологически различал наследование призна-

ков и их задатков. Тем не менее весь смысл его работы основывался на представлении о существовании наследственных задатков (а не самих признаков), передаваемых из поколения в поколение. Таким образом, в строгом смысле третий закон Менделя — это закон о независимом наследовании аллелей разных генов.

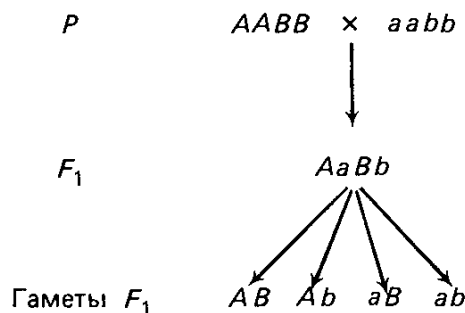
В рассматриваемом дигибридном скрещивании гибридные семена второго поколения (гибриды F_2) расщепились в следующем соотношении: 315 круглых желтых, 108 круглых зеленых, 101 морщинистых желтых, 32 морщинистых зеленых. Это соотношение очень близко к 9:3:3:1. Именно этого соотношения фенотипов и следует ожидать, если дигибридное расщепление представляет собой результат наложения двух моногибридных расщеплений:

$$(3A—:1aa) \times (3B—:1bb) = \\ = 9A—B—:3A—bb:3aaB—:1aabb$$

Аналогично можно представить и расщепление в F_2 дигибридного скрещивания по генотипу:

$$(1AA:2Aa:1aa) \times (1BB:2Bb:1bb) = \\ = 1 \underline{AABB} : 2 \underline{AABb} : 1 \underline{AAbb} : 2 \underline{AaBB} : 4 \underline{AaBb} : 2 \underline{Aabb} : \\ : 1 \underline{aaBB} : 2 \underline{aaBb} : 1 \underline{aabb}$$

Различные генотипические классы, составляющие единый класс расщепления по фенотипу, подчеркнуты одинаково. Таким образом, легко видеть, что выведенный здесь характер расщепления по генотипу и фенотипу соответствует друг другу и согласуется с реальными соотношениями, полученными Менделем в F_2 дигибридного скрещивания. Те же результаты можно получить исходя из независимого комбинирования аллелей разных генов при образовании гамет гибридами F_1 :



Воспользовавшись решеткой Пеннета (рис. 3.1), легко получить уже знакомое соотношение генотипических классов в F_2 . Такой подход основан на предположении о том, что все четыре типа гамет образуются у дигетерозиготных гибридов F_1 с равной вероятностью. Проверить это предположение можно при анализирующем скрещивании, в котором соотношение фенотипических классов должно отражать соотношение типов гамет F_1 :

$$AaBb \times aabb \\ \downarrow \\ 1AaBb : 1Aabb : 1aaBb : 1aabb$$

















Гаметы♂				
	AB	Ab	aB	ab
Гаметы♀				
AB	 $AABB$	 $AABb$	 $AaBB$	 $AaBb$
Ab	 $AABb$	 $AAbb$	 $AaBb$	 $Aabb$
aB	 $AaBB$	 $AaBb$	 $aaBb$	 $aaBb$
ab	 $AaBb$	 $Aabb$	 $aaBb$	 $aabb$

Рис. 3.1. Определение расщепления по генотипу в F_2 дигибридного скрещивания при помощи решетки Пеннета. Если для дигибридного скрещивания гороха обозначить: A — круглые семена, a — морщинистые семена, B — желтые семена, b — зеленые семена, то легко вывести соотношение фенотипических классов

Действительно, в одном из опытов Менделя в анализирующем скрещивании были получены следующие соотношения: 31 круглых желтых ($AaBb$), 26 круглых зеленых ($Aabb$), 27 морщинистых желтых ($aaBb$), 26 морщинистых зеленых ($aabb$).

Рассуждая аналогично, можно представить расщепление при тригибридном скрещивании, т. е. когда родители различаются по аллелям трех генов, а в F_1 образуются тригетерозиготы, при тетрагибридном скрещивании и так далее в любом полигибридном скрещивании. Соотношения генотипических и фенотипических классов в F_2 полигибридных скрещиваний, а также число типов гамет у гибридов F_1 определяются простыми формулами, представленными в табл. 3.1.

Исходя из этих формул легко представить, какое разнообразие таит в себе простая комбинаторика генов (аллелей) в естественных условиях. Каждый организм гетерозиготен по многим генам.

Таблица 3.1. Формулы, характеризующие расщепление при полигибридном скрещивании (гибриды F_1 гетерозиготны по n генам)

Число	Значение
Типов гамет F_1	2^n
Генотипических классов в F_2	3^n
Фенотипических классов (при полном доминировании) в F_2	2^n

Если предположить, что человек гетерозиготен хотя бы по 20 генам (в действительности эта цифра значительно больше), то число типов гамет, которое может образовывать такая полигетерозигота, составит: $2^{20} = 1\,048\,576$. Эта цифра дает некоторое представление о потенциальных возможностях комбинативной изменчивости.

3.2. Взаимодействие генов

Закон независимого наследования генов еще раз демонстрирует дискретный характер генетического материала. Это проявляется в независимом комбинировании аллелей разных генов и в их независимом действии — фенотипическом выражении. Однако в ряде случаев идентификация фенотипов сопряжена с некоторыми трудностями. Обратимся к примеру.

Комплементарность. У популярного генетического объекта плодовой мушки *Drosophila melanogaster* имеется большое число форм, наследственно различающихся по окраске глаз. У мух так называемого дикого типа или типа, распространенного в природе, глаза темно-красные. Существуют формы с ярко-красными глазами. Этот признак рецессивен по отношению к дикому типу. Он наследуется по моногибридной схеме при скрещивании нормальных мух и мух с ярко-красными глазами. Соответствующий ген обозначается: *st* (scarlet) — рецессив; *st*⁺ — доминант.

Существуют также мухи с коричневыми глазами. Это тоже рецессивный признак, наследующийся по моногибридной схеме при скрещивании диких мух и мух с коричневыми глазами. Соответствующий ген обозначается *bw* (brown) — рецессив; *bw*⁺ — доминант¹.

Если скрестить мух с ярко-красными глазами и мух с коричневыми глазами, то получаются следующие результаты. В F_1 все мухи имеют темно-красные глаза (дикий тип), а при скрещивании гибридов первого поколения в F_2 появляются четыре класса расщепления: мухи с темно-красными, ярко-красными, коричневыми и белыми глазами в соотношении 9 : 3 : 3 : 1 (рис. 3.2). Для объяснения этого результата обратимся к логике генетического анализа.

Результаты, получившиеся в F_1 , показывают, что существует некоторый тип взаимодействия. Можно предположить, что это взаимодействие аллелей одного гена при моногибридном скрещивании. Однако в F_2 появляются четыре класса (а не три, как в случае взаимодействия аллелей; см. гл. 2) в соотношении, харак-

¹ Доминантные аллели обозначают заглавными буквами, как было показано ранее (с. 36) для дрожжей, или строчными буквами со знаком «+», как это принято для дрозофилы.

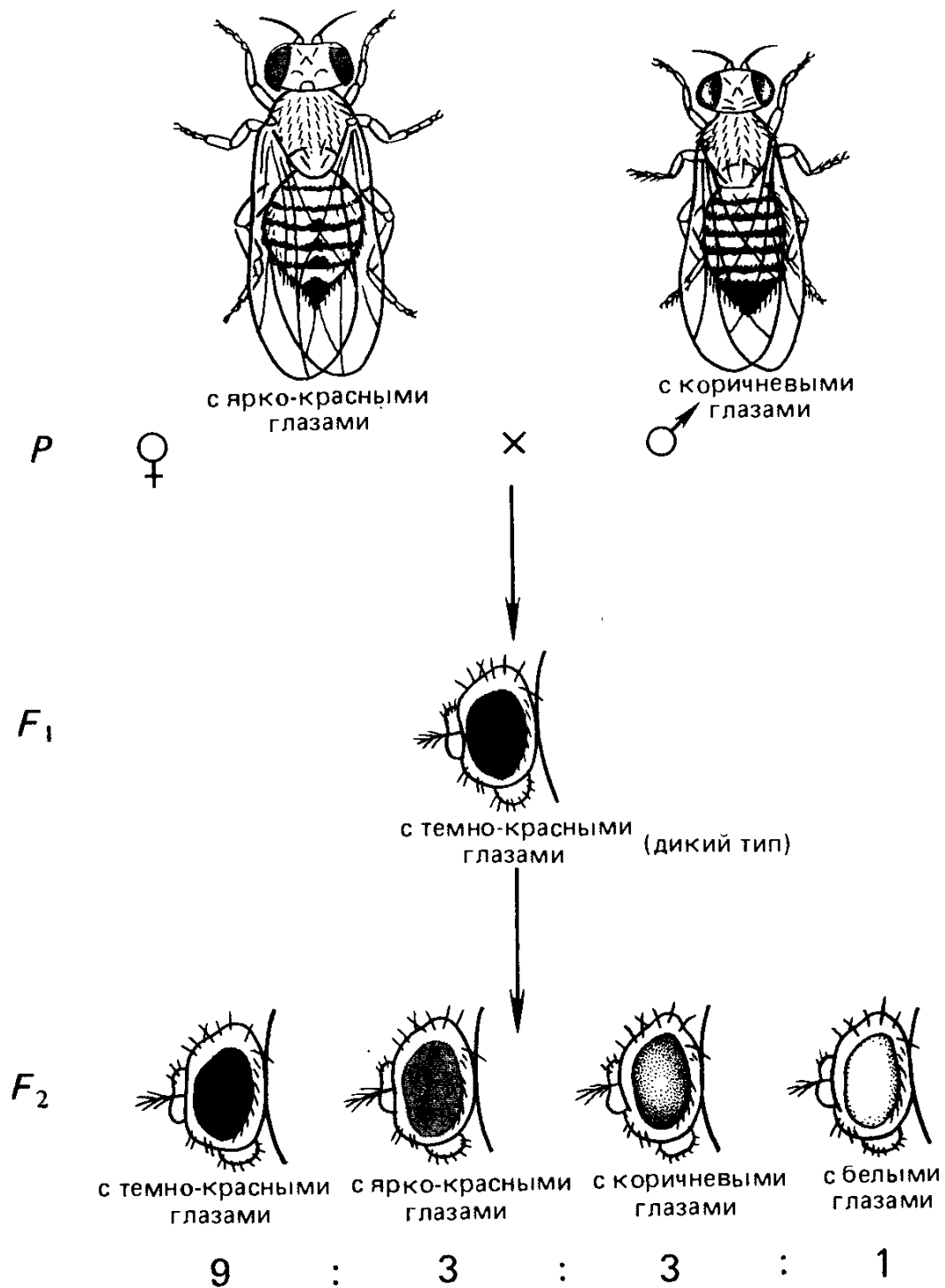


Рис. 3.2. Результаты, получаемые при скрещивании *D. melanogaster* с ярко-красными (*stst*) и коричневыми (*bw bw*) глазами

терном для дигибридного скрещивания при полном доминировании по обоим признакам, и среди них формируется самый малочисленный класс — мухи с белыми глазами.

Если справедливо предположение о том, что это скрещивание дигибридное, то генотипы родительских форм записывают:

$$P \text{ ♀ } stst \ bw^+ \ bw^+ \times \text{ ♂ } st^+st^+ \ bw bw,$$

где знак «+» соответствует нормальным (доминантным) аллелям генов: *bw* и *st*. Тогда самки и самцы образуют по одному типу

гамет — соответственно $st\ bw^+$ и st^+bw , а генотип гибридов F_1 будет: $st^+st\ bw^+ bw$.

Такие дигетерозиготные мухи должны образовать четыре типа гамет, которые во всевозможных сочетаниях при скрещивании между собой гибридов F_1 дадут в F_2 следующее расщепление по генотипу (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Расщепление по генотипу в F_2 от скрещивания дрозофил:
 $st\ st\ bw^+ bw^+ \times st^+ st^+ bw\ bw$

Гаметы ♂	$st^+ bw^+$	$st^+ bw$	$st\ bw^+$	$st\ bw$
Гаметы ♀				
$st^+ bw^+$	$st^+ st^+ bw^+ bw^+$	$st^+ st^+ bw^+ bw$	$st^+ st\ bw^+ bw^+$	$st^+ st\ bw^+ bw$
$st^+ bw$	$st^+ st^+ bw^+ bw$	$st^+ st^+ bw\ bw$	$st^+ st\ bw^+ bw$	$st^+ st\ bw\ bw$
$st\ bw^+$	$st^+ st\ bw^+ bw^+$	$st^+ st\ bw^+ bw$	$st\ st\ bw^+ bw^+$	$st\ st\ bw^+ bw$
$st\ bw$	$st^+ st\ bw^+ bw$	$st^+ st\ bw\ bw$	$st\ st\ bw^+ bw$	$st\ st\ bw\ bw$

С помощью фенотипических радикалов можно написать следующее расщепление по фенотипу:

- 9 $st^+ \text{—} bw^+ \text{—}$ — с темно-красными глазами
- 3 $st^+ \text{—} bw\ bw$ — с коричневыми глазами
- 3 $st\ st\ bw^+ \text{—}$ — с ярко-красными глазами
- 1 $st\ st\ bw\ bw$ — с белыми глазами

Учитывая, что аллели st и bw рецессивны (см. с. 42), можно объяснить появление первых трех фенотипических классов при расщеплении. При наличии нормальных аллелей st^+ и bw^+ мухи должны принадлежать к дикому типу по окраске глаз (9 с темно-красными глазами). При гомозиготности только по рецессивной аллели $bw\ bw$ мухи должны быть с коричневыми глазами (3), так же как при гомозиготности только по $st\ st$ мухи должны быть с ярко-красными глазами (3). Наконец, остается последний класс — двойной гомозиготный рецессив (1 $st\ st\ bw\ bw$), который соответствует мухам с белыми глазами. Все эти выводы можно проверить, исследуя далее расщепление при анализирующих скрещиваниях и скрещиваниях между особями F_2 .

Таким образом, предположение о дигибридном расщеплении в рассмотренном скрещивании подтверждается, а новообразование — белоглазые мухи в F_2 — результат взаимодействия рецессивных аллелей st и bw .

В рассмотренной схеме также наблюдалось взаимодействие генов в F_1 , в результате которого дрозофилы имели нормальный цвет глаз. Такой тип взаимодействия носит название *комплементарности* или *комплементарного* (взаимно дополнительного) *действия*, когда доминантные аллели обоих генов обусловили нормальный (или дикий) фенотип (под комплементарностью обычно подразумевают именно этот тип взаимодействия генов). В F_2 , рецессивные аллели тех же генов обусловили появление бело-

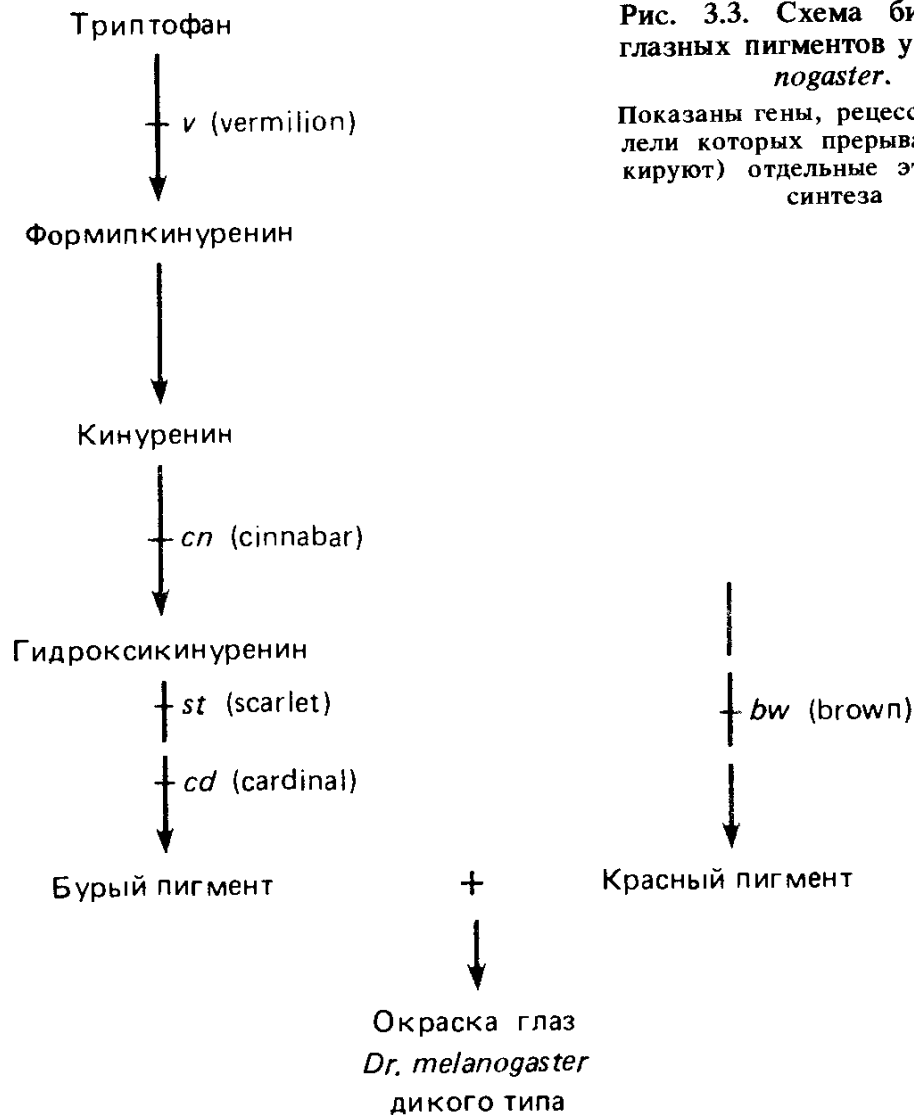


Рис. 3.3. Схема биосинтеза глазных пигментов у *D. melanogaster*.

Показаны гены, рецессивные аллели которых прерывают (блокируют) отдельные этапы биосинтеза

глазых мух. Был приведен пример того, что носит название *формально-генетического анализа*, при котором полностью абстрагируются от механизмов действия исследуемых генов. Если анализ проведен верно и формальные отношения генов и аллелей выявлены правильно, то последующее выяснение физиологических механизмов, лежащих в основе генных взаимодействий, только подтверждает и конкретизирует выводы.

Биохимический механизм взаимодействия аллелей генов *st* и *bw* исследован достаточно подробно (рис. 3.3). Известно, что у дрозофилы окраска глаз обусловлена синтезом двух пигментов — красного и бурого. Рецессивная аллель *bw* в гомозиготе прерывает синтез красного пигмента, поэтому глаза содержат только бурый пигмент. Рецессивная аллель *st* в гомозиготе блокирует синтез бурого пигмента, вследствие чего в глазах мух содержится только красный пигмент.

Когда в дигетерозиготе оказываются нормальные аллели обоих генов, синтезируются оба пигмента. Результат — комплементарное взаимодействие нормальных аллелей, наблюдаемое в F_1 . Если в F_2 в гомозиготе оказываются и *bwbw*, и *stst*, то не синтезируются

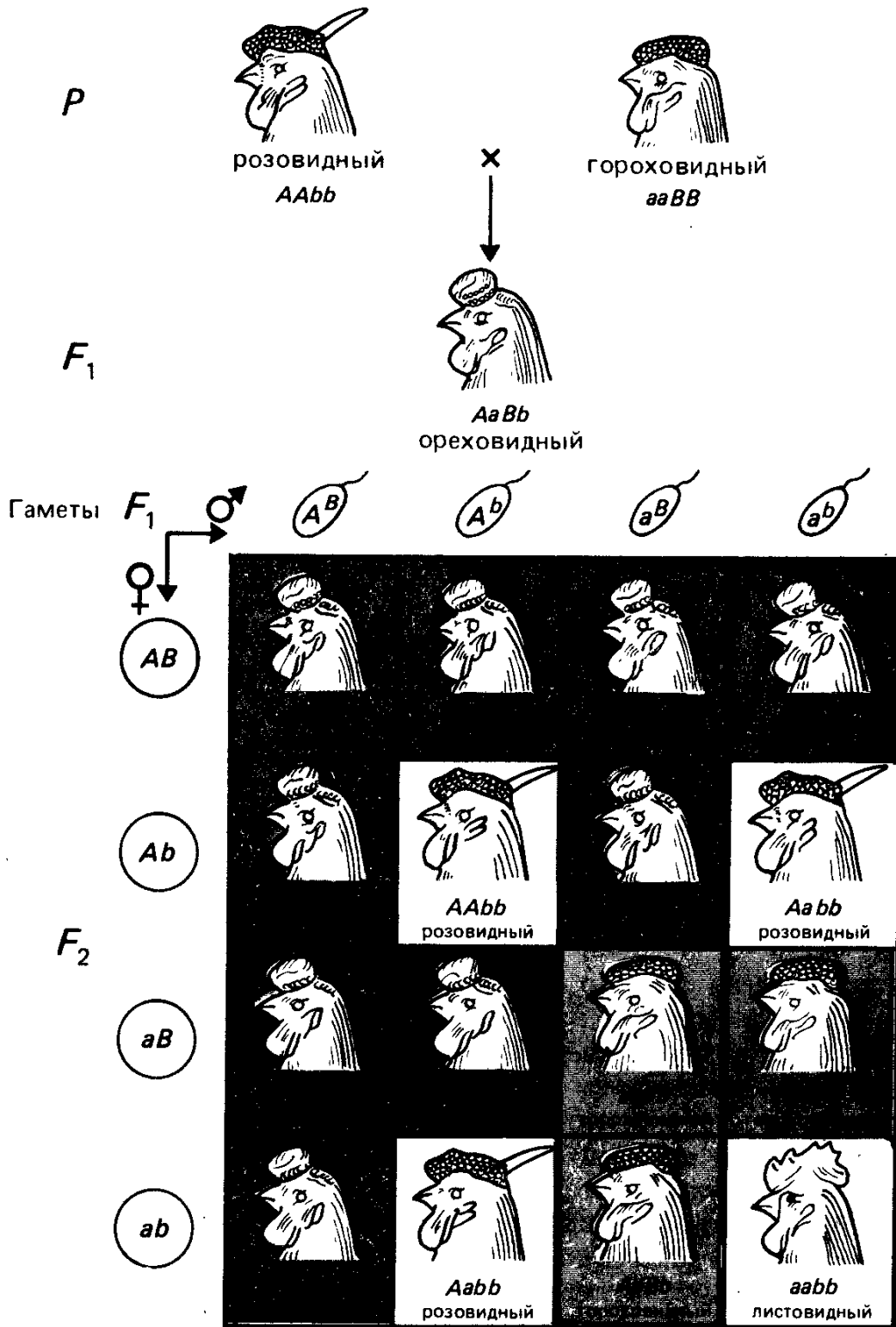


Рис. 3.4. Комплементарное взаимодействие генов, определяющих форму гребня у кур (соотношение 9:3:3:1)

ни красный, ни бурый пигменты, и глаза оказываются белыми, неокрашенными.

Можно рассмотреть и другой тип комплементарного взаимодействия генов у дрозофилы, если идти от метаболического эффекта генов к схеме их взаимодействия. Вновь обратимся к биосинтезу пигментов глаза у дрозофилы (см. рис. 3.3). Известно, что кроме рецессивных аллелей *st* синтез бурого пигмента бло-

кируют и рецессивные аллели гена *purple* (*pr*). Фенотип гомозигот *stst* и *pr pr* — ярко-красные глаза. При скрещивании таких мух в F_1 глаза нормальные — темно-красные, поскольку работают оба гена — комплементарно взаимодействуют их доминантные аллели. В F_2 наблюдается следующее соотношение фенотипов: 9 с темно-красными и 7 с ярко-красными глазами. Это объясняется тем, что выход в гомозиготу любой из двух рецессивных аллелей достаточен для блокирования синтеза пигмента, тем более, когда и *pr*, и *st* находятся в гомозиготе. Это тоже пример комплементарного взаимодействия, но без новообразования в F_2 .

По типу комплементарности взаимодействуют гены, контролирующие разные этапы одного и того же метаболического пути. Однако для многих морфологических признаков неизвестен биохимический механизм их реализации, поэтому приходится ограничиваться констатацией формально-генетической схемы их наследования. Так, по типу комплементарности взаимодействуют гены, определяющие форму гребня кур (рис. 3.4), форму плода у тыквы (рис. 3.5) и др.

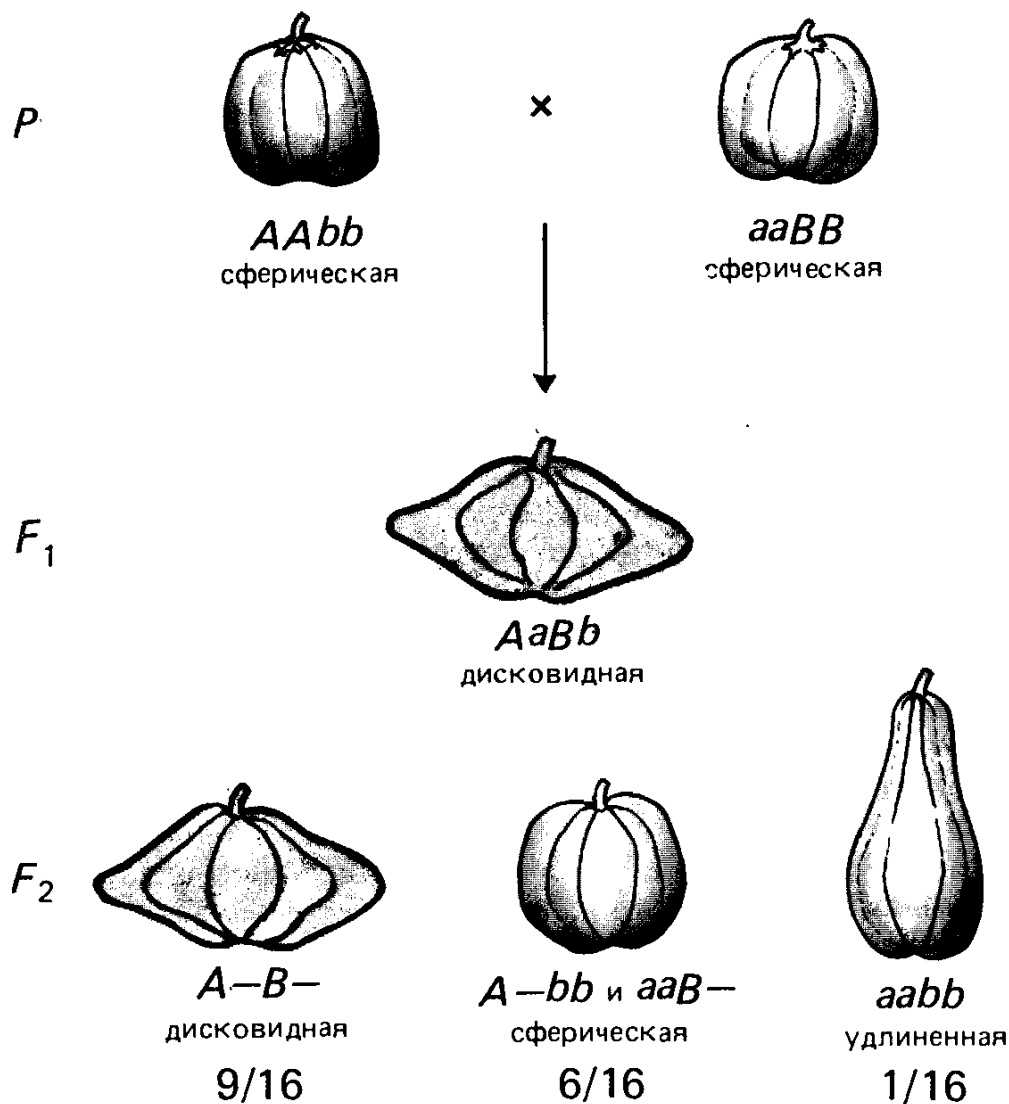


Рис. 3.5. Комплементарное взаимодействие генов, определяющих форму плода тыквы (соотношение 9:6:1)

Таблица 3.3. Соотношение фенотипических классов дигибридного расщепления в F_2 при различных типах взаимодействия генов (Из М. Е. Лобашева, 1967)

Взаимодействие		Генотипы								
между аллелями	между генами А и В	$AABB$	$AABb$	$AaBB$	$AaBb$	$AAbb$	$Aabb$	$aaBB$	$aaBb$	$aabb$
		Aa	Bb							
—	—	Отсутствует								
—	+	»								
+	+	»								
+	+	aa маскирует $B-$ и bb								
+	+	$A-$ » $B-$ и bb								
+	+	$\left\{ \begin{array}{l} A- \text{ » } B- \text{ и } bb \\ bb- \text{ » } A- \text{ и } aa \end{array} \right\}$								
+	+	$\left\{ \begin{array}{l} aa- \text{ » } B- \text{ и } bb \\ bb- \text{ » } A- \text{ и } aa \end{array} \right\}$								
+	+	$\left\{ \begin{array}{l} A- \text{ » } B- \text{ и } bb \\ B- \text{ » } A- \text{ и } aa \end{array} \right\}$								

Взаимодействие		Генотипы									
между аллелями	между генами А и В	$AABB$	$AABb$	$AaBB$	$AaBb$	$AAbb$	$Aabb$	$aaBB$	$aaBb$	$aabb$	
		Aa	Bb								
—	—	1	2	2	4	1	2	1	2	1	
—	+	3		6		3		3		1	
+	+	9		6		3		3		1	
+	+	9		6		3		3		1	
+	+	12						3		1	
+	+	12 (+1)?						3		1	
+	+	9			7						
+	+	15									1

Примечание: Знак «—» — неполное доминирование, знак «+» — полное доминирование; знак вопроса около фенотипических классов 12 (+1) означает возможность расщепления как 12:3:1, так и 13:3.

Эпистаз. Вернемся к анализу взаимодействия генов pr и st у дрозофилы. Соотношение фенотипических классов в F_2 можно представить себе и как следствие того, что рецессивная аллель pr в гомозиготе препятствует проявлению доминантной аллели st^+ . Точно так же рецессивная аллель st в гомозиготе препятствует проявлению доминантной аллели pr^+ . Действительно, то, что известно о генетическом контроле синтеза бурого глазного пигмента у дрозофилы, вполне соответствует предложенному здесь объяснению. Такой тип взаимодействия носит название эпистатического, или эпистаза, и условно изображается: $pr > st^+$ и $st > pr^+$. В данном случае рецессивная аллель pr эпистатична по отношению к доминантной аллели st^+ , а st эпистатична по отношению к pr^+ . Данный случай взаимодействия генов называют также *двойным рецессивным эпистазом* (табл. 3.3).

По изменению числа и соотношения классов дигибридного расщепления в F_2 рассматривают несколько типов эпистатических взаимодействий: простой рецессивный эпистаз ($a > B$; $a > b$ или $b > A$; $b > a$), который выражается в расщеплении 9:3:4; простой доминантный эпистаз ($A > B$; $A > b$ или $B > A$; $B > a$) с расщеплением 12:3:1 и т. д.

Один ген, подавляющий действие другого, называют *эпистатическим геном*, *ингибитором* или *супрессором*. Подавляемый ген носит название *гипостатического*.

Как уже показано, констатация того или иного типа взаимодействия генов в дигибридном скрещивании условна. Тем не менее при кажущемся нарушении закона независимого наследования (появлении неожиданных классов в расщеплении или уменьшении числа классов), связанного с взаимодействием двух генов, всегда можно свести наблюдаемые соотношения в F_2 к классическому 9:3:3:1. При этом важно понять, какие классы объединились, и тогда интерпретировать тип взаимодействия (см. табл. 3.3).

Необходимо также отметить, что само словосочетание «взаимодействие генов» условно. В действительности взаимодействуют продукты генов, а не сами гены, так что правильнее было бы говорить о взаимодействии фенов, а не о взаимодействии генов. Отсюда понятно, что судить о том, с каким скрещиванием имеет дело экспериментатор: моногибридным, дигибридным или полигибридным — можно только на основании результатов полного генологического анализа.

Полимерия. Наряду с комплементарным и эпистатическим принято также рассматривать взаимодействие генов по типу полимерии. В этом случае разные гены как бы дублируют действие друг друга, и одной доминантной аллели любого из взаимодействующих генов достаточно для проявления изучаемой фенотипической характеристики. Так, при скрещивании растений пастушьей сумки с треугольными плодами (стручками) и с овальными плодами в F_1 образуются растения с плодами треугольной формы. При их самоопылении в F_2 наблюдается расщепление на растения с треугольными и овальными стручками в соотношении 15:1. Это объясняется тем, что существуют два гена, действующих однозначно. В этих случаях их обозначают одинаково (A_1 и A_2). Тогда все генотипы: A_1A_2 , $A_1a_2a_2$, $a_1a_1A_2$ будут иметь одинаковую фенотипическую характеристику — треугольные стручки, и только растения $a_1a_1a_2a_2$ будут отличаться — образовывать овальные стручки. Это случай так называемый *некумулятивной полимерии*.

Однозначные, или полимерные, гены могут действовать и по типу *кумулятивной полимерии*. Так, шведский генетик Г. Нильсон-Эле в 1908 г. описал серию однозначно действующих генов, которые определяют окраску эндосперма зерен пшеницы. При этом интенсивность окраски зерен оказалась пропорциональной числу доминантных аллелей разных генов в тригибридном скрещивании. Наиболее окрашенными были зерна $A_1A_1A_2A_2A_3A_3$, а зерна $a_1a_1a_2a_2a_3a_3$ не имели пигмента. Между этими крайними типами при расщеплении в F_2 наблюдались промежуточные варианты в соотношении 1:6:15:20:15:6:1.

По типу кумулятивной полимерии наследуются многие количественные признаки, например цвет кожи у человека; молочность, яйценоскость, масса и другие признаки сельскохозяйственных животных; длина колоса у злаков, содержание сахара в корнеплодах сахарной свеклы и др. Изучением наследования таких признаков занимается специальный раздел генетики — генетика количе-

ственных признаков, которая важна прежде всего для селекции и разработки проблем микроэволюции (см. гл. 18, 22).

Гены-модификаторы. Основателем генетики количественных признаков в нашей стране был Ю. А. Филипченко. Он изучал наследование размеров черепа крупного рогатого скота, длины колоса пшеницы и даже умственных способностей у человека. В одной из работ 1928 г. он опубликовал данные о наследовании длины колоса при скрещивании двух форм пшеницы. В F_2 он наблюдал распределение по длине колоса, хорошо согласующееся с гипотезой о моногенном различии по этому признаку. Однако последующий анализ показал, что наряду с «основным» геном, определяющим длину колоса, существует ряд генов-модификаторов этого признака. Подобный тип наследования встречается часто. Таким образом, фенотип, как правило, представляет собой результат сложного взаимодействия генов. Природа генов-модификаторов до сих пор вызывает споры: в частности, не ясно, существуют ли специальные модификаторы, функция которых заключается в изменении действия других — «основных» генов или модифицирующее действие гена — результат его плейотропии.

Плейотропия. Учитывая данные, изложенные в этой главе, следует заключить, что не бывает однозначного соотношения между генотипом и фенотипом. Справедливость этого положения подчеркивает и тот факт, что один и тот же ген может в конечном итоге действовать на различные признаки организма.

Первый пример такого множественного, или плейотропного, действия гена содержится в работе Менделя, а именно: окраска цветков и окраска семенной кожуры зависели в его опытах от одного наследственного задатка. У высших растений гены, обуславливающие красную (антоциановую) окраску цветков, одновременно контролируют красную окраску стебля. У человека известен доминантный ген, определяющий признак «паучьи пальцы» (арахнодактилия или синдром Марфана). Одновременно он определяет аномалии хрусталика глаза и порок сердца. В Западном Пакистане обнаружены люди — носители гена, определяющего отсутствие потовых желез на отдельных участках тела. Это одновременно определяет и отсутствие некоторых зубов.

Признак платиновой окраски шерсти у лисиц контролируется доминантным геном, который существует только в гетерозиготе, поскольку обладает рецессивным летальным действием. При скрещивании платиновых лис наблюдали расщепление на платиновых и серебристо-черных в соотношении 2:1. Такое соотношение может получаться, если платиновые лисицы гетерозиготны (Aa), а черные гомозиготны по рецессивной аллели того же гена (aa). При этом не выживают гомозиготы по доминантной аллели (AA). Такое предположение подтверждается результатами скрещивания платиновых и серебристо-черных лис. Как и следует ожидать, при анализирующем скрещивании получается расщепление на платиновых и серебристо-черных в отношении 1:1 (рис. 3.6). По этой же схеме наследуется наличие (aa) и отсутствие (Aa) чешуи у зер-

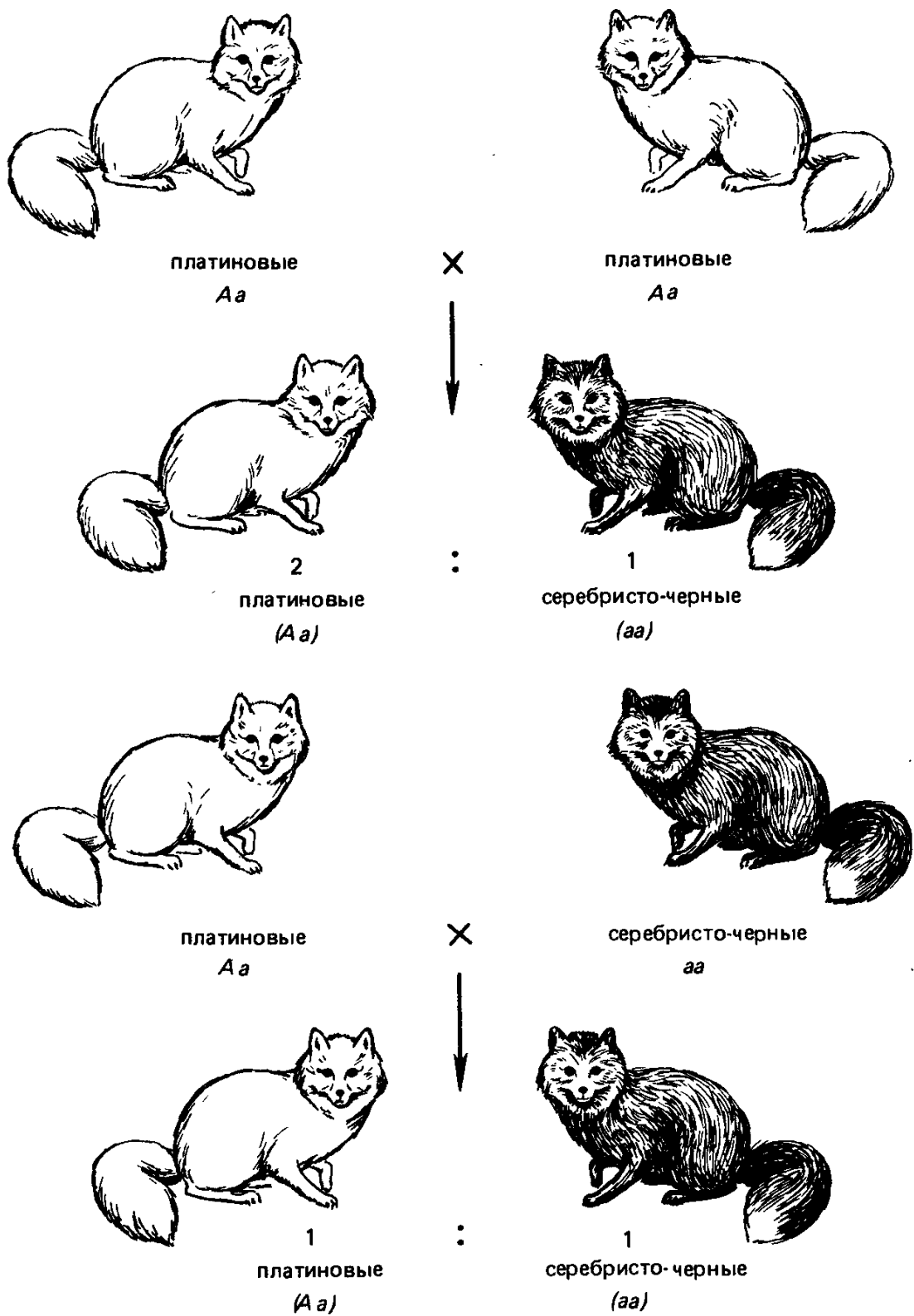


Рис. 3.6. Генетический анализ наследования платиновой окраски лисиц. Ген A — доминантный, с рецессивным летальным действием; I — скрещивание платиновых лис между собой; II — анализирующее скрещивание

кального карпа, серая (*Aa*) и черная (*aa*) окраска каракулевых овец и т. д.

Множественное или плейотропное действие генов связывают с тем, на какой стадии онтогенеза проявляются соответствующие аллели. Чем раньше проявится аллель, тем больше эффект плейотропии.

Учитывая плейотропный эффект многих генов, можно предположить, что часто одни гены выступают в роли модификаторов действия других генов.

3.3. Пенетрантность, экспрессивность, норма реакции

Рассматривая действие гена, его аллелей, необходимо учитывать не только генные взаимодействия и действие генов-модификаторов, но и модифицирующее действие среды, в которой развивается организм. Известно, что у примулы окраска цветка розовая (*P—*) — белая (*pp*) наследуется по моногибридной схеме, если растения развиваются в интервале температур 15—25°C. Если же растения F_2 вырастить при температуре 30—35°C, то все цветки у них оказываются белыми. Наконец, при выращивании растений F_2 в условиях температуры, колеблющейся около 30 °C, можно получить разнообразные соотношения от 3*P—*:1*pp* до 100% растений с белыми цветками. Такое варьирующее соотношение классов при расщеплении в зависимости от условий внешней среды или от условий генотипической среды (так назвал С. С. Четвериков варьирование генотипа по генам-модификаторам) носит название варьирующей *пенетрантности*. Это понятие подразумевает возможность проявления или не проявления признака у организмов, одинаковых по исследуемым генотипическим факторам.

Уже упоминался пример плейотропного действия гена — доминантная платиновая окраска лисиц с рецессивным летальным действием. Как показал Д. К. Беляев с сотрудниками, можно добиться рождения живых щенков, гомозиготных по доминантной аллели платиновой окраски, если варьировать длину дня для беременных самок. Таким образом, пенетрантность проявления летального эффекта может быть снижена (уже не будет 100%-ной).

Пенетрантность выражается долей особей, проявляющих исследуемый признак среди всех особей одинакового генотипа по контролируемому (изучаемому) гену.

От внешней среды и генов-модификаторов может зависеть и степень выраженности признака. Например, дрозофила, гомозиготная по аллели *vg vg* (зачаточные крылья), более контрастно проявляет этот признак при понижении температуры. Другой признак дрозофилы — отсутствие глаз (*eyeu*) варьирует от 0 до 50% от числа фасеток, характерного для мух дикого типа.

Степень проявления варьирующего признака называется экспрессивностью. Экспрессивность обычно выражают количественно в зависимости от отклонения признака от дикого типа.

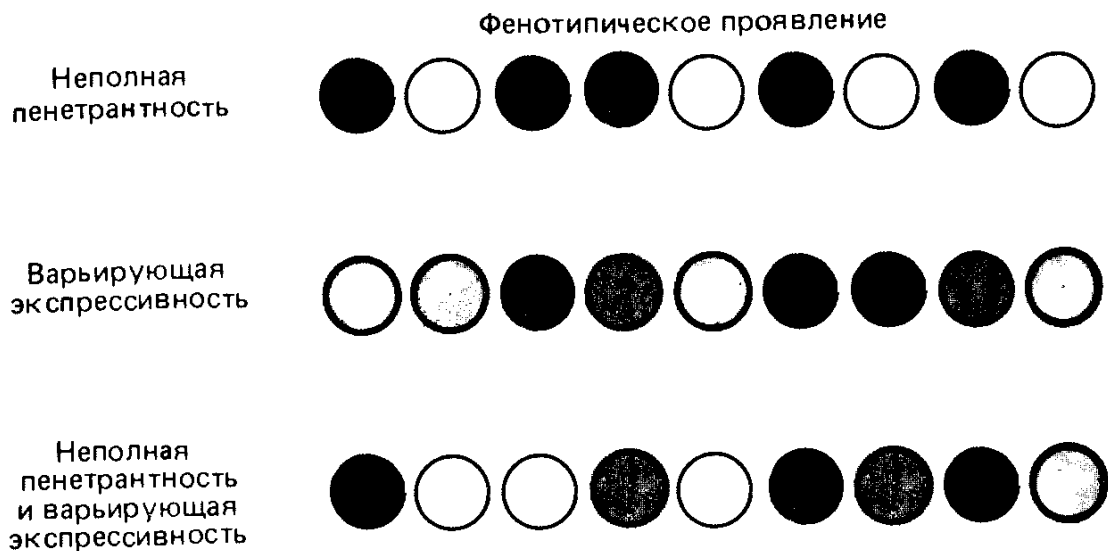


Рис. 3.7. Схема, поясняющая варьирование экспрессивности и пенетрантности признака

Оба понятия — пенетрантность и экспрессивность — были введены в 1925 г. Н. В. Тимофеевым-Ресовским для описания варьирующего проявления генов (рис. 3.7).

Тот факт, что признак может проявиться или не проявиться у особей данного генотипа в зависимости от условий или варьировать в различных условиях среды, убеждает в том, что фенотип — это результат действия (и взаимодействия) генов в конкретных условиях существования организма.

Способность генотипа так или иначе проявляться в различных условиях среды отражает норму его реакции — способность реагировать на варьирующие условия развития. Норму реакции генотипа необходимо учитывать как при экспериментах, так и при выведении новых форм хозяйственно ценных организмов. Отсутствие изменений в проявлении признака указывает на то, что используемое воздействие не влияет на данную норму реакции, а гибель организма — на то, что оно уже за пределами нормы реакции. Селекция высокопродуктивных форм растений, животных и микроорганизмов в значительной степени представляет собой отбор организмов с узкой и специализированной нормой реакции на такие внешние воздействия, как удобрения, обильное кормление, характер выращивания и др.

Искусственное сужение или сдвиг нормы реакции используют для маркирования многих жизненно важных генов. Так, были исследованы гены, контролирующие воспроизведение ДНК и синтез белка у бактерий и дрожжей, гены, контролирующие развитие дрозофилы, и др. При этом получали мутанты, нежизнеспособные при повышенной температуре культивирования, т. е. условно-летальные.

Таким образом, материал, рассмотренный в этой главе, показывает, что генотип представляет собой систему взаимодействующих генов, которые проявляются фенотипически в зависимости от условий генотипической среды и условий существования. Только

благодаря использованию принципов менделевского анализа можно условно разложить эту сложную систему на элементарные признаки — фены и тем самым идентифицировать отдельные, дискретные единицы генотипа — гены.

Вопросы к главе 3

1. При скрещивании растений, имеющих зеленые и гладкие семена, с растениями, имеющими зеленые морщинистые семена, получено 125 зеленых гладких и 117 зеленых морщинистых семян. Каковы генотипы всех форм?
2. Могут ли у родителей с группами крови А и В появиться дети с группой крови О? В каком случае и с какой вероятностью?
3. Выпишите все типы гамет, образуемые особью $AabbCcDdKK$.
4. Какое расщепление по генотипу и фенотипу будет в потомстве от скрещивания растений генотипа: $DdEEAa \times ddEeaa$, если D — высокое растение, d — низкое, E — гладкий корнеплод, e — морщинистый, A — простое соцветие, a — сложное.
5. При анализирующем скрещивании тригетерозиготы расщепление по фенотипу составило 7:1. При каком типе взаимодействия возможно такое соотношение? Напишите схему скрещивания.
6. Доминантная аллель гена B эпистатирует проявление доминантной аллели гена A . Аллели гена B собственного проявления не имеют. Какое расщепление по фенотипу ожидается при скрещивании: $P \varphi AaBb \times \sigma Aabb$?
7. Какое расщепление по фенотипу следует ожидать в F_2 дигибридного скрещивания $AAbb \times aaBB$, если мужские гаметы AB нежизнеспособны (комбинативная гаметическая леталь)?
8. Сколько фенотипических классов (при неполном доминировании по всем генам) можно выявить в F_2 у тригетерозиготы? При неполном доминировании только по одному гену?
9. Окраска цветков определяется комплементарным взаимодействием доминантных аллелей пяти генов: A, B, C, D, E . Проведено скрещивание: $P \varphi AAbbCcDdee \times \sigma aaBbccDdEe$. Какая часть потомства будет иметь окрашенные цветки?
10. Чем отличается явление доминирования от эпистаза?
11. При скрещивании между собой черных мышей всегда получается черное потомство. При скрещивании между собой желтых мышей одна треть потомства оказывается черной, а две трети — желтой. Как это можно объяснить? Как проверить правильность предположения?
12. Самец дрозофилы — двойной гомозиготный рецессив (см. табл. 3.2) скрещен с гомозиготной самкой $sn\ sn$ (см. также рис. 3.3). Определите фенотип особей F_1 и расщепление в F_2 .
13. Какие дальнейшие скрещивания можно предложить для проверки выводов, сделанных на с. 44 на основе анализа расщепления в F_2 от скрещивания мух с ярко-красными и коричневыми глазами?
14. На с. 49 представлено соотношение классов F_2 тригибридного скрещивания при кумулятивной полимерии. Напишите генотипы всех классов.

Цитологические основы наследственности

4.1. Значение цитологического метода

Развитие клеточной теории во второй половине XIX в. создало основную предпосылку для признания законов Менделя. Независимо от гибридологического анализа цитология обосновала роль ядра в наследственности.

Уже в 1855 г. Р. Вирхов (1821—1902) выдвинул фундаментальное положение «*Omnis cellula e cellulae*» — всякая клетка от клетки, выразившее в концентрированной форме представление о самовоспроизведении клетки. Тем самым было положено начало пристальному изучению процесса клеточного деления — *кариокинеза* или *митоза*, как его назвал В. Флемминг, подробно описавший (1879—1882) деление ядра в клетках кожи саламандры. Этой работой Флемминг привлек внимание исследователей к поведению хромосом. Правда, сам термин «хромосома» был введен несколько позже — в 1883 г. В. Вальдейером.

В. Флемминг обнаружил, что при митозе хромосомы «делятся» вдоль, а Е. ван Бенеден (1883) обратил внимание на то, что дочерние хромосомы, распределяющиеся между дочерними клетками, до мельчайших деталей повторяют строение материнской хромосомы. Современники по достоинству оценили это важное открытие. Именно поэтому в 1884 г. Э. Страсбургер выделил такие стадии митоза, как профаза и метафаза, что означает: фаза перед (про) и фаза после (мета) расщепления хромосом¹.

Именно в этот период сформировалась ядерная гипотеза наследственности (В. Ру, 1883; О. Гертвиг, Э. Страсбургер, 1884).

В 1896 г. вышло в свет первое издание сводки Э. Вильсона «Клетка в развитии и наследственности», где *цитогенетика* обособилась как наука. С тех пор цитология претерпела значительную эволюцию и обогатилась многими методами смежных дисциплин.

Для изучения клеток используют постоянные или временные препараты при наблюдении в световом микроскопе. При этом клетки или их структуры окрашивают специальными красителями или изучают неокрашенными.

Для исследования ультраструктуры клеток пользуются электронным микроскопом. При этом клетки фиксируют, окрашивают или

¹ Теперь известно, что наблюдения цитологов того времени были недостаточно точными. В действительности хромосомы входят в профазу уже удвоенными.

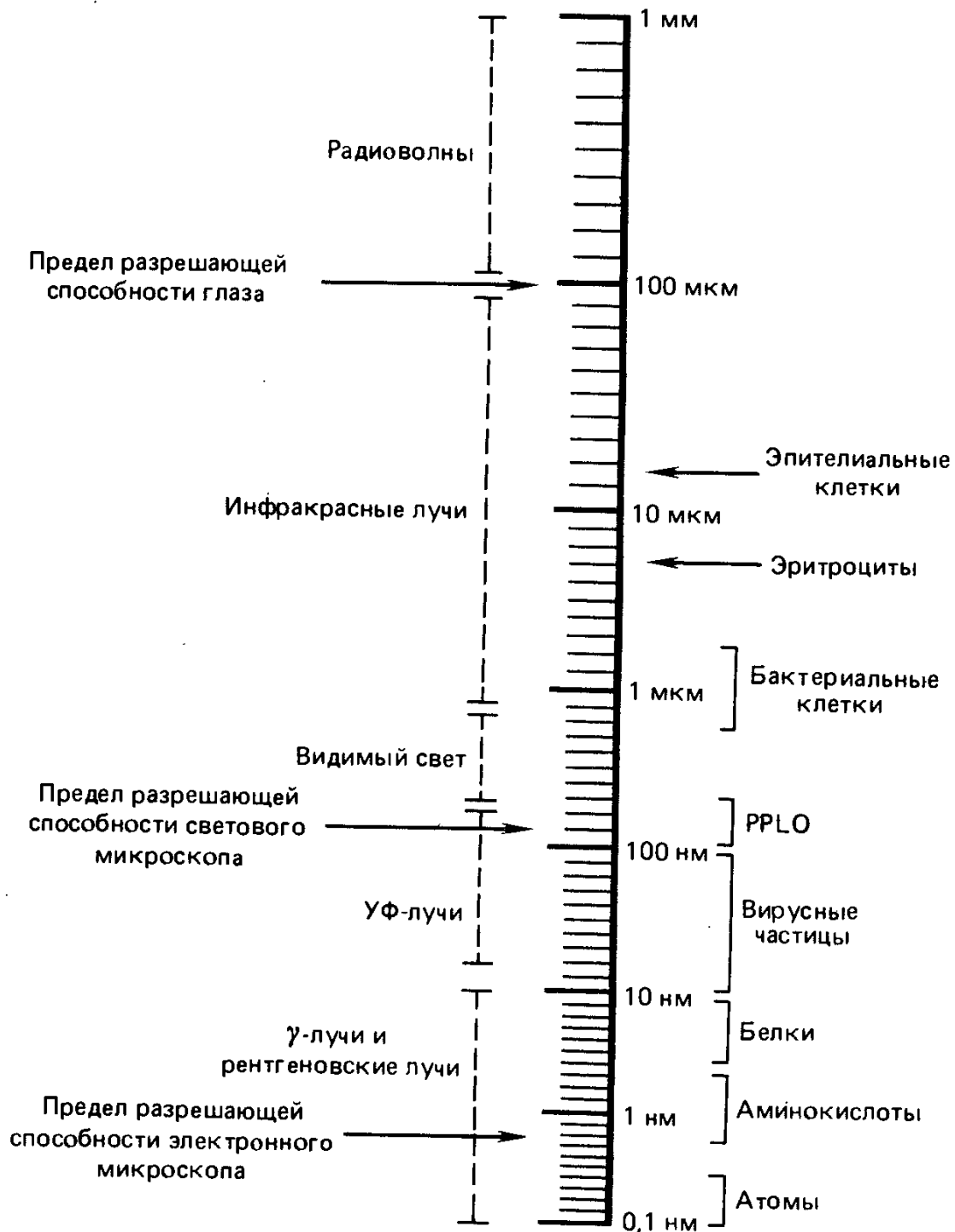


Рис. 4.1. Сопоставление размеров различных молекул и клеток с длинами волн, соответствующими разным типам излучения (логарифмическая шкала). (Из де Робертиса, Новинского и Саэса, 1967)

контрастируют. Ультратонкие срезы рассматривают в проходящем пучке электронов. Применяют также сканирующий электронный микроскоп, позволяющий исследовать препарат в падающем пучке электронов. Этим методом изучают поверхностные структуры фиксированных клеток или их внутренние структуры, применяя метод замораживания — скалывания препарата и др.

Пределы разрешающей способности человеческого глаза, светового и электронного микроскопов в сопоставлении с длинами волн

различных типов излучения, а также размерами некоторых объектов представлены на рис. 4.1.

Цитологический метод (как отмечалось в гл. 1) широко используется в генетике для непосредственного изучения клеточных структур — носителей наследственной информации. Это прежде всего относится к хромосомам ядра и самовоспроизводящимся органеллам цитоплазмы.

4.2. Митоз

Принципиальные черты строения клеток животных, растений, грибов одинаковы (рис. 4.2). Их общая черта — *компарментализация*. Этот термин обозначает подразделение клетки на ядро, содержащее хроматин и одно или несколько ядрышек, и цитоплазму, в которой различают митохондрии, пластиды (у растений) и некоторые другие самовоспроизводящиеся органеллы клетки. Кроме того, в цитоплазме эукариот имеются органоиды, которые постоянно присутствуют в ней, но не обладают способностью к самовоспроизведению. Это аппарат Гольджи, вакуоли, лизосомы.

Клетки бактерий (прокариот) построены по другому типу: они не имеют морфологически оформленных самовоспроизводящихся органелл, за исключением нуклеоида — аналога ядра клеток эукариот (см. гл. 9).

Всякая активно делящаяся клетка претерпевает ряд последо-

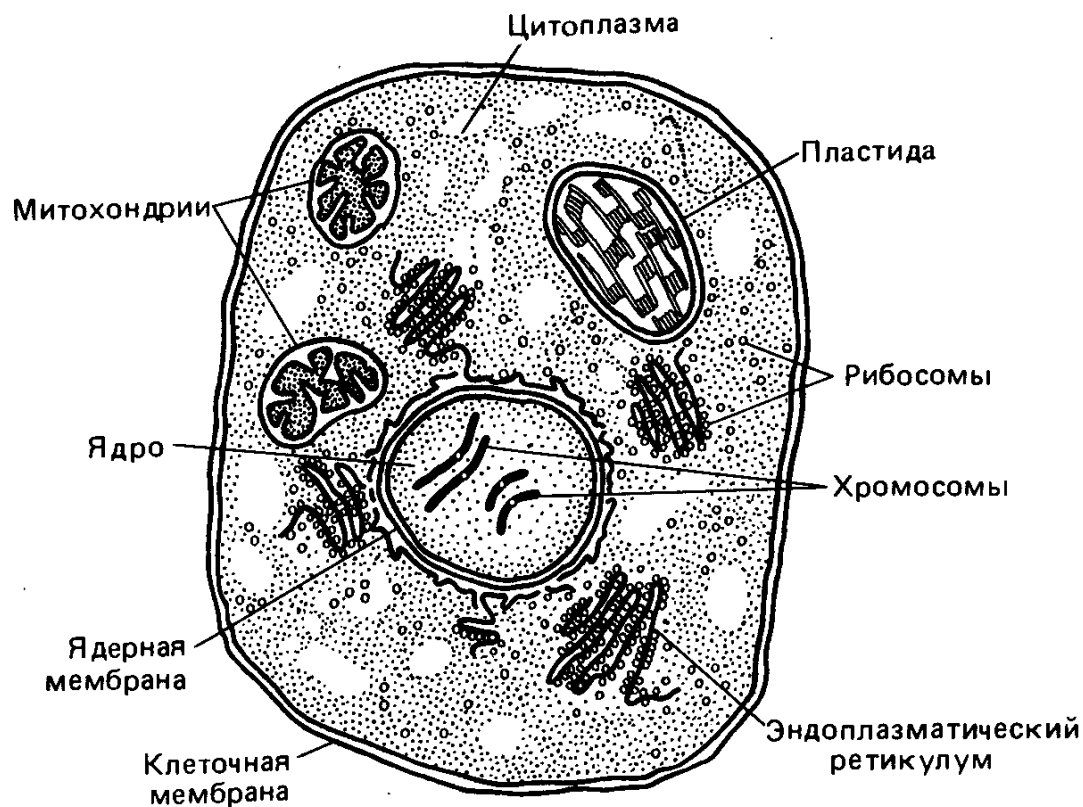


Рис. 4.2. Строение клетки эукариот. Обобщенная схема

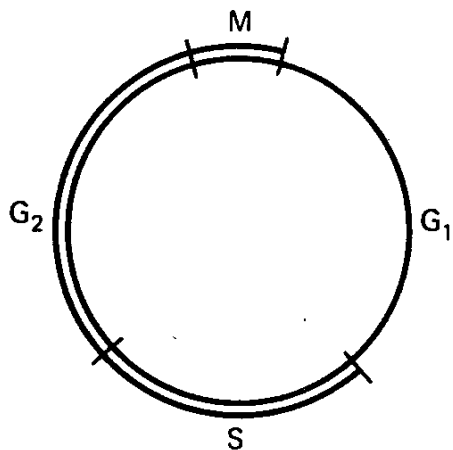


Рис. 4.3. Схема клеточного цикла

вательных изменений, из которых складывается клеточный цикл (рис. 4.3). При оптимальных условиях длительность клеточного цикла у разных организмов неодинакова (табл. 4.1).

Клеточный цикл состоит из четырех периодов: пресинтетического (G₁), периода синтеза ДНК (S), постсинтетического (G₂) и митоза (M). Собственно митоз захватывает не более 1/7—1/10 всего клеточного цикла и таким образом составляет лишь небольшую часть его.

Таблица 4.1. Длительность клеточного цикла у различных объектов

Организм	Длительность клеточного цикла, часы
Кукуруза* — <i>Zea mays</i>	12—29
Бобы — <i>Vicia faba</i>	26—44
Шпинат — <i>Sinapis alba</i>	25—35
Лук — <i>Allium cepa</i>	13—23
Овес — <i>Avena strigosa</i>	10
Хризантема — <i>Chrysanthemum</i>	15
Скерда — <i>Crepis capillaris</i>	11—12
Гаглопаппус — <i>Haploappus gracilis</i>	10—12
Табак — <i>Nicotiana tabacum</i>	10
Горох — <i>Pisum sativum</i>	13—20
Рожь — <i>Secale cereale</i>	10—20
Мышь — <i>Mus musculus</i>	
эпителий	11—38
сперматогонии	26—30
Крыса — <i>Rattus norvegicus</i>	
печень	14—47,5
эпителий	9—10,5
Хомяк (эпителий)	12—17,5
Курица — <i>Gallus domesticus</i> (эпителий)	10—16
Дрожжи — <i>Sacch. cerevisiae</i>	2
Бактерия — <i>E. coli</i>	0,3
Культура клеток:	
Человек — <i>Homo sapiens</i>	
эмбриональные фибробласты	18,5
лейкоциты —	18
HeLa	20—28
кожа	28
почка	21—27
Мышь	11,5—23
Китайский хомячок	13,5—24

Примечание. У растений представлены данные для меристемы корня в условиях выращивания, близких к оптимуму.

В покоящейся клетке на стадии интерфазы различают сферическое ядро, окруженное двухслойной ядерной мембраной с порами диаметром около 40 мкм. Хромосомы на этой стадии находятся в ядре в расправленном, растянутом состоянии и практически неви-

димы в световой микроскоп до начала митоза. Тем не менее уже на первых этапах развития цитологии были получены факты, указывающие на непрерывность существования хромосом во времени. Об этом свидетельствует постоянство формы (сохранение индивидуальности) хромосом. Еще в 1888 г. Т. Бовери показал, что в первых митозах оплодотворенного яйца аскариды хромосомы в профазе появляются в том же месте, где они оказались в телофазе предыдущего митоза. В наши дни это было подтверждено супругами Байер (1957—1958), применившими микрокиносъемку для наблюдения митозов в эндосперме лилейных.

Профаза. Хромосомы спирализуются, укорачиваясь и утолщаясь. Благодаря этому они становятся заметными в световой микроскоп. Уже в ранней профазе видно, что каждая хромосома состоит из двух хроматид. Это результат репликации, произошедшей в интерфазе — на стадии S клеточного цикла. Хроматиды тесно ассоциированы по длине и перекручены. К концу профазы эта ассоциация ослабевает. Исчезают ядрышки, растворяется ядерная мембрана и хромосомы оказываются в цитоплазме. Этот момент обозначает завершение профазы.

В начале профазы хромосомы равномерно распределяются по всему ядру, а к концу профазы приближаются к ядерной мембране. Перед растворением ядерной мембраны хромосомы почти полностью спирализованы. За период профазы они сокращаются до $1/25$ длины по сравнению с ранней профазой.

Прометафаза. После растворения ядерной мембраны хромосомы движутся по направлению к экватору. Прометафаза завершается, когда хромосомы достигают экваториальной плоскости.

Метафаза. Появляются неокрашивающиеся нити ахроматинового веретена. В животных клетках видны звездообразные фигуры у полюсов. Они образуются вокруг центриолей, разошедшихся к полюсам клетки. Хромосомы (каждая из двух хроматид) выстраиваются в плоскости экватора, образуя так называемую метафазную пластинку. Длинные хромосомы, как правило, изогнуты V-образно. При этом острие V указывает на центр метафазной пластинки и на нем видна неокрашенная перетяжка — *центромера*, к которой прикрепляется нить ахроматинового веретена и таким образом обеспечивает движение хромосомы. Центромеры выстраиваются в экваториальной плоскости, а плечи достаточно длинных хромосом как бы свисают к тому или другому полюсу.

Метафазная пластинка — своеобразный паспорт организма. Число и форма хромосом, наблюдаемых в метафазе, характеризуют *кариотип* вида. Отчетливо выявляется парность хромосом. Парные, или *гомологичные*, хромосомы — обычно совершенно одинаковы по длине, расположению центромеры и другим деталям своего строения. Одну из каждой пары гомологичных хромосом вносит в зиготу материнская, другую — отцовская гамета.

Анафаза. Начинается в момент деления центромер, удерживавших до этого вместе обе хроматиды каждой хромосомы. Все центромеры делятся одновременно. Хроматиды, ставшие теперь

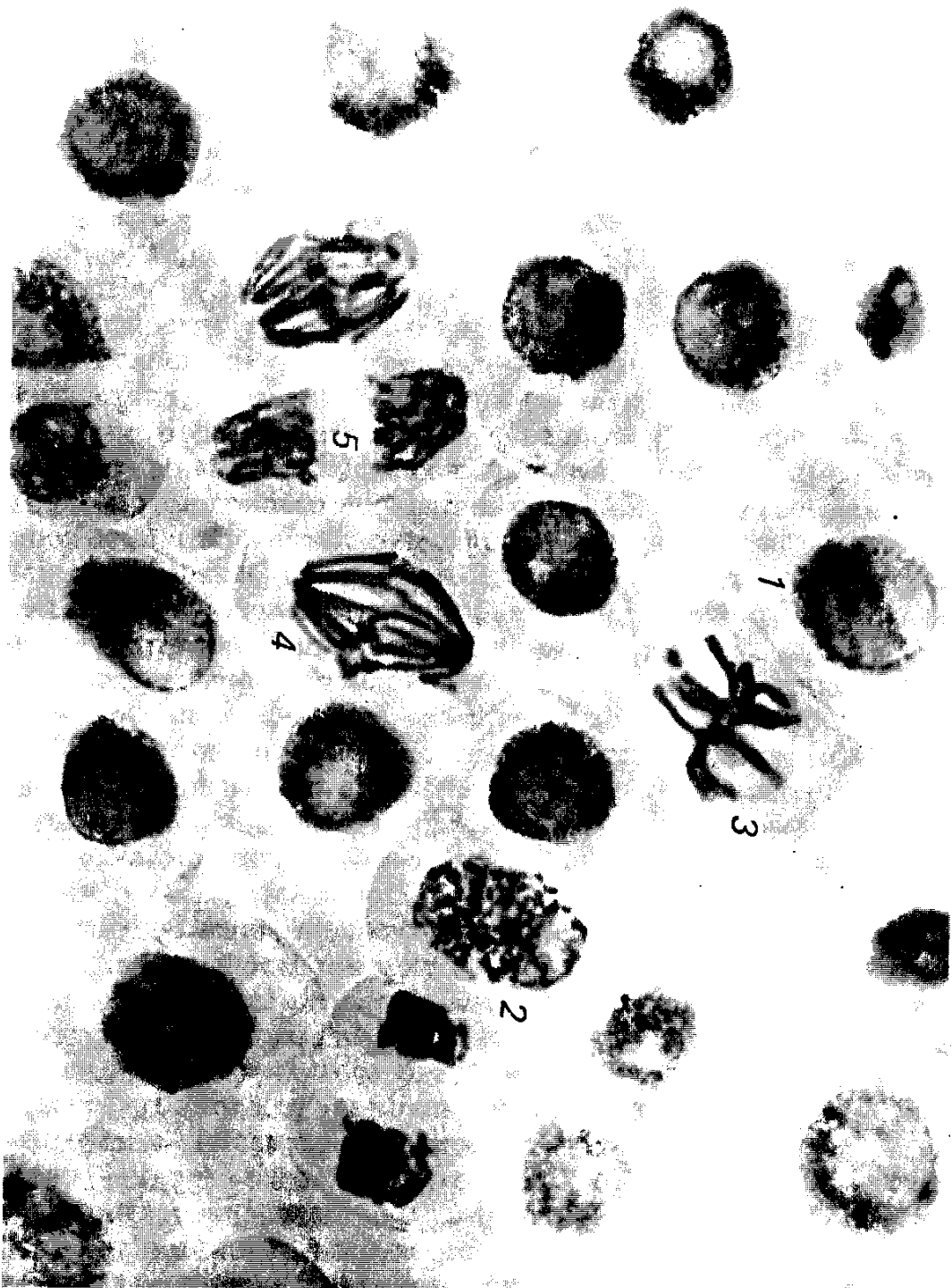


Рис. 4.4. Общий вид митозов в кончике корня лука:
1 — интерфаза, 2 — профаза, 3 — метафаза, 4 — анафаза, 5 — телофаза

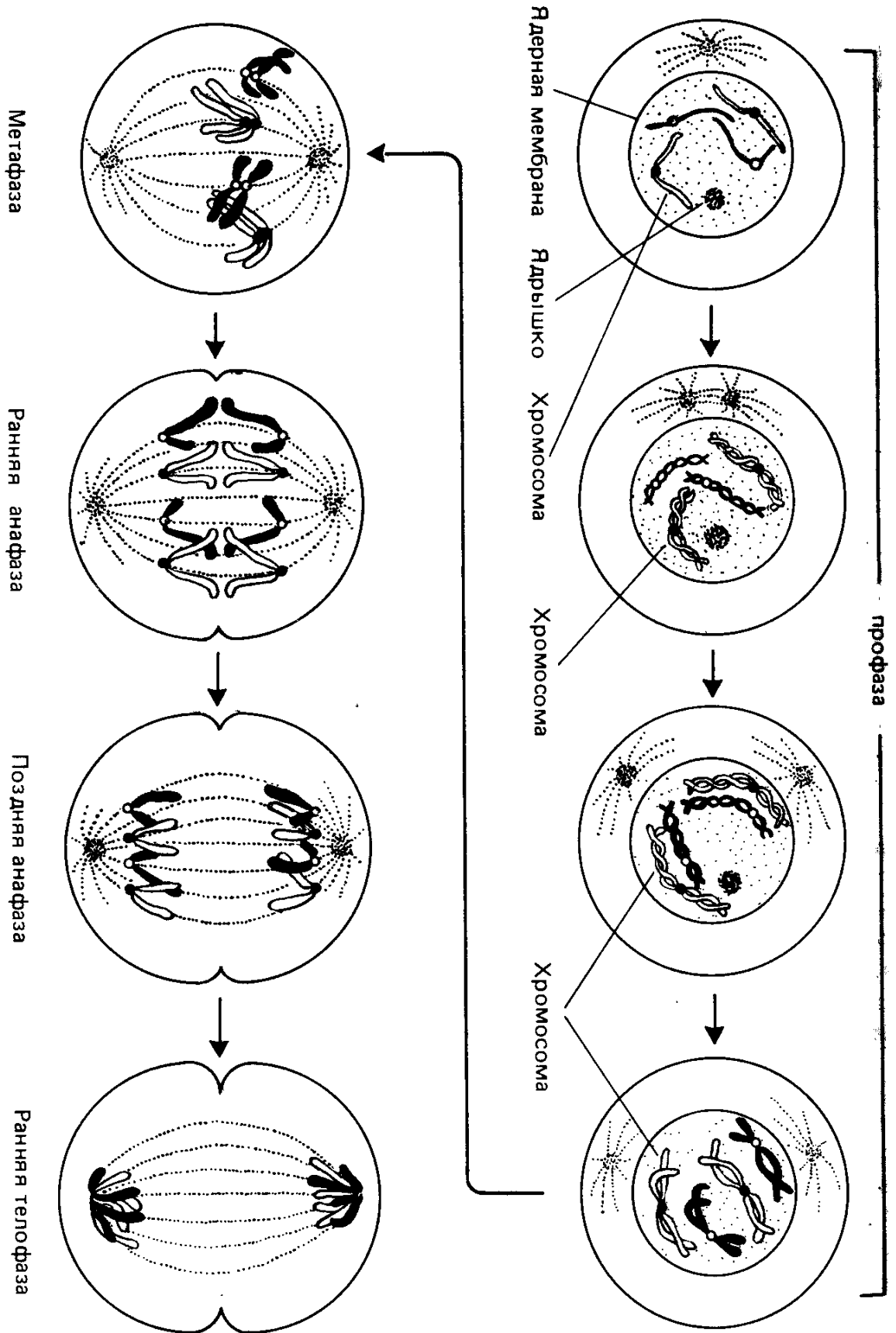


Рис. 4.5. Схематическое изображение стадий митоза

дочерними хромосомами, разъединяются и расходятся к противоположным полюсам по нитям веретена, фиксированным у полюсов митоза.

Телофаза — заключительная стадия митоза — начинается завершением движения хромосом к полюсам. Вслед за этим происходит реконструкция интерфазных ядер, которая как бы повторяет ход профазы в обратном порядке: формируется ядерная мембрана, вновь появляются ядрышки. Хромосомы, которые теперь состоят из одной нити каждая, становятся тоньше и длиннее и становятся невидимыми. В это же время происходит цитокинез — разделение цитоплазмы. В животных клетках образуется перетяжка, постепенно разделяющая клетку на две. У растений деление клетки завершается формированием фрагмопласта — новой клеточной стенки между дочерними ядрами.

Если на митотически делящиеся клетки подействовать *колхицином* — алкалоидом растительного происхождения, блокирующим полимеризацию нитей веретена, то в результате хромосомы теряют способность передвигаться в плоскость веретена в прометафазе и расходятся в анафазе. Удвоенные хромосомы остаются вместе в одной клетке.

Основные стадии митоза представлены на рис. 4.4 и 4.5.

Наиболее характерный процесс, лежащий в основе циклических изменений хромосом, — цикл спирализации-деспирализации хромосомом, или хромосомных нитей. На стадии ранней профазы митоза, когда различимые в световой микроскоп хромосомы максимально деспирализованы, можно видеть, что хромосома неравномерна по длине. Она имеет тонкие и более утолщенные участки, которые называют *хромомерами*. Расположение хромомер для каждой хромосомы относительно постоянно. Хромомеры представляют собой участки более плотной спирализации хромосомом.

Здесь кратко описан общий ход митоза, характерный для клеток животных и растений. Некоторые отличия от этого процесса встречаются, например, у грибов (почкующиеся дрожжи — сахаромицеты), у которых весь митоз проходит внутри ядерной мембраны, сохраняющейся на всех стадиях, а ахроматиновое веретено формируется внутри ядра.

4.3. Генетический контроль клеточного цикла

Все процессы, происходящие в клетке, находятся под генетическим контролем. Не составляют исключения клеточный цикл и митоз. Гены контролируют последовательные стадии репликации ДНК, цитокинез, движение, спирализацию-деспирализацию хромосом и т. д. Мутации этих генов могут прерывать клеточный цикл на различных этапах. Благодаря этому для исследования клеточного цикла и митоза можно применить генетический анализ.

*Мутанты, т. е. организмы или клетки, несущие мутацию, у которых на разных стадиях блокирован клеточный цикл, получены у ряда одноклеточных организмов — дрожжей родов *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*, водоросли *Chlamidomonas*, плесневого гриба*

Aspergillus, простейшего *Tetrahymena*, а также в культуре клеток млекопитающих — китайского хомячка и мыши.

Скорее всего рецессивные мутации генов, контролирующих клеточный цикл, будут летальными. Поэтому соответствующие мутанты выделяют как условные, или условно-летальные, т. е. как мутанты с более узкой нормой реакции (см. гл. 3, раздел 3). Обычно выделяют мутанты, гибнущие при так называемой непермиссивной (обычно повышенной) температуре инкубирования:

Наибольшее число генов (около 50), контролирующих клеточный цикл (*cdc* — от англ. cell division cycle), идентифицировано у дрожжей-сахаромицетов. Эти одноклеточные грибы — удобный объект для изучения клеточного цикла, так как у них стадия почкования может быть сравнительно легко соотнесена с определенным этапом клеточного цикла (рис. 4.6). Изучение мутантов *cdc* у дрожжей позволило выявить в клеточном цикле точку старта, совпадающую со стадией G_1 . Большинство мутантов в непермиссивных условиях гибнет (при температуре 36°).

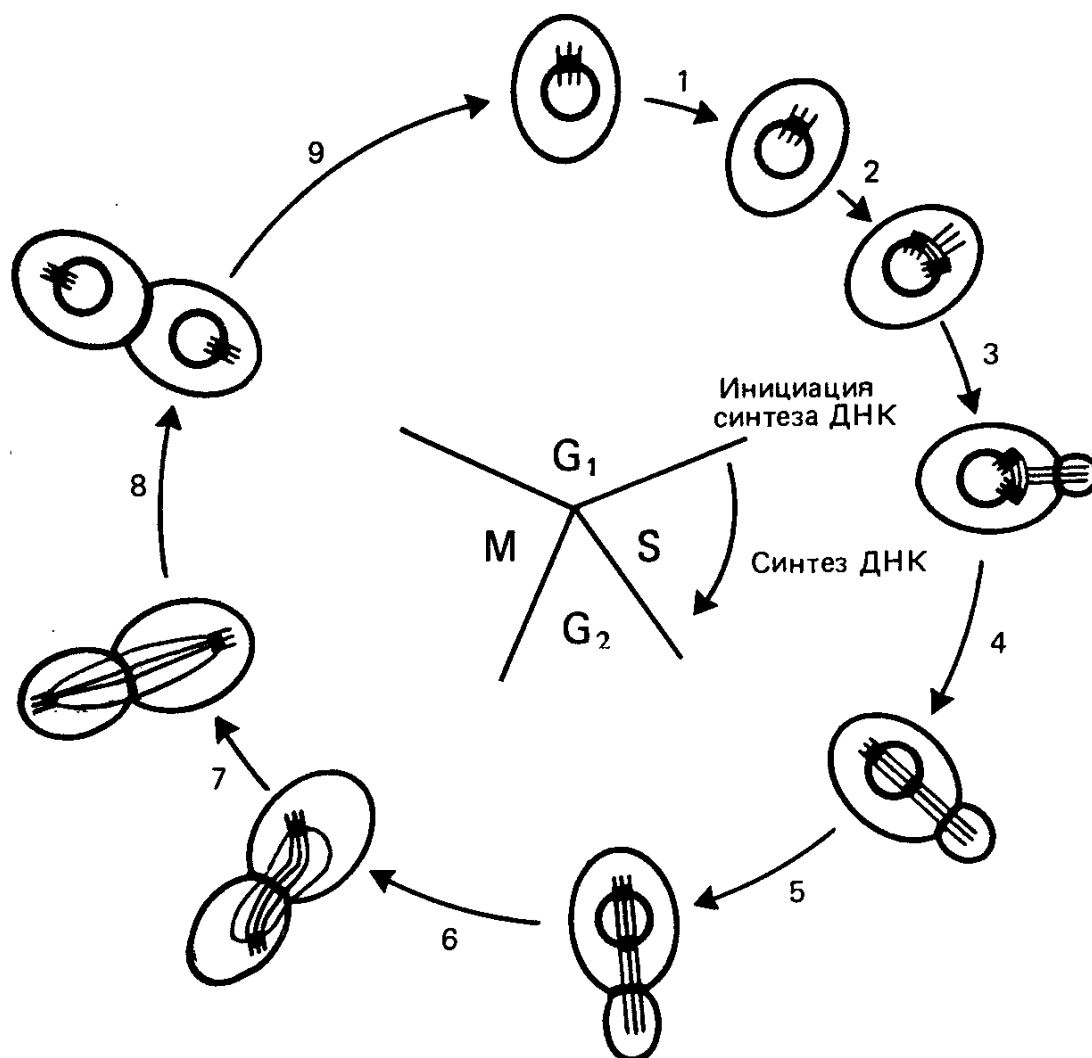


Рис. 4.6. Соотношение стадий почкования и клеточного цикла у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (J. Pringle, a. L. Hartwell, 1981):

1—9 последовательные стадии, выделенные на основе генетического анализа. На ядерной мембране дрожжевой клетки показано полярное тело веретена, которое делится и формирует нити веретена. По ним скользят хромосомы (неразличимые в световом микроскопе)

Исключение составляют мутанты, у которых клеточный цикл блокирован на стадии G_1 — *cdc 28, 35*. Тем самым выявляется фаза клеточного цикла, на которой клетка как бы «принимает решение» о своей дальнейшей судьбе: по достижении старта она может либо вступить в следующий цикл деления, либо перейти к дифференцировке. У гаплоидных дрожжей после стадии G_1 клетка при наличии партнера может вступить в спаривание. У диплоидных дрожжей после стадии G_1 клетка способна перейти к мейозу. При истощении питательной среды клетки по достижении старта останавливаются также на стадии G_1 . Малигнизация клетки (т. е. превращение ее в раковую) многоклеточного организма также происходит после достижения ею точки старта.

Благодаря тому, что мутации каждого гена *cdc* имеют характерное проявление — специфическое нарушение почкования, деления ядра и т. д., можно определить временную последовательность и взаимозависимость событий в клеточном цикле. Зная фенотипическое проявление каждой серии мутаций *cdc*, их объединяют в гаплоидах попарно путем скрещивания. Если какие-либо из этих мутаций обнаруживают эпистатическое взаимодействие, это указывает на то, что эпистатирующая мутация произошла в гене, функционирующем в клеточном цикле раньше, чем тот ген, мутация которого гипостатична.

4.4. Строение хромосом. Кариотип

Морфологию хромосом обычно описывают на стадии метафазы или анафазы, когда они лучше всего видны в клетке. Для некоторых растений морфологию хромосом можно описать в профазе мейоза или митоза. В зависимости от расположения центромеры различают:

- а) *acrocentric*, или палочкообразные, хромосомы, у которых центромера находится на конце или второе плечо настолько мало, что его не различают на цитологических препаратах;
- б) *submetacentric* хромосомы с плечами разной длины;
- в) *metacentric* хромосомы, у которых центромера расположена посередине или почти посередине.

Центромера, или первичная перетяжка, — важнейшая часть хромосомы. Она определяет движение хромосомы и различима в виде более светлой зоны, которая движется в митозе, увлекая за собой несколько отстающие плечи хромосомы. Центромера имеет сложное строение: в ней находится ДНК с характерной последовательностью нуклеотидов, ассоциированная со специальными белками.

Хромосома обычно имеет одну центромеру. Ее потеря, например в результате хромосомной аберрации, вызванной ионизирующим излучением, приводит к нарушению подвижности и потере хромосомы. Известны виды, содержащие *polycentric* хромосомы с так называемой *diffuse centromere*, например растения рода *Lusula* (ожика) или животные: *Ascaris megalocephala*, насекомые

отряда Hemiptera и др. У этих видов даже фрагменты разорванных хромосом благополучно расходятся к полюсам.

Вторичные перетяжки в отличие от первичной перетяжки не служат местом прикрепления нитей веретена и не определяют угла изгиба хромосом при их движении. Некоторые вторичные перетяжки связаны с образованием ядрышек, и тогда их называют ядрышковыми организаторами. В таких вторичных перетяжках локализируются гены, ответственные за синтез рРНК. Синтез и созревание рРНК происходят в ядрышках.

Теломеры, или концевые участки хромосом, в значительной степени ответственны за существование хромосом как индивидуальных образований. Концы разорванных хромосом могут сливаться между собой, но никогда не сливаются с теломерами. Следовательно, именно теломеры препятствуют слипанию хромосом.

В структуре хромосом, видимых в световой микроскоп, различают более темные участки — так называемый *гетерохроматин* и более светлые — *эухроматин*. В гетерохроматине хромосомы сильнее спирализованы, чем в эухроматине. Гетерохроматиновые участки функционально менее активны, чем эухроматиновые, в которых и локализована большая часть известных генов. Характер распределения эу- и гетерохроматиновых участков постоянен для каждой хромосомы на определенной стадии митоза, что служит дополнительным критерием при их идентификации на цитологических препаратах.

Дифференцировка хромосомы по длине может быть выявлена и искусственным путем с применением дифференциальной окраски, которая основана на применении красителей, специфически связывающихся с участками ДНК определенного строения.

У некоторых хромосом есть *спутники* — участки, соединенные с остальной частью хромосомы тонкой нитью хроматина. Форма и величина спутника постоянны для хромосом, которые их имеют.

Постоянные характеристики хромосомного набора — их число и морфологические особенности, перечисленные выше, используют для описания кариотипа.

Кариотипом называется совокупность признаков, по которым можно идентифицировать данный хромосомный набор: число хромосом, их форма, определяемая прежде всего расположением центромер, наличие вторичных перетяжек, спутников, чередование эухроматиновых и гетерохроматиновых районов и т. д. Таким образом, кариотип — это паспорт вида. Кариотип может быть изображен в виде идиограммы — схемы, на которой хромосомы располагают в ряд по мере убывания их длины. На идиограмме принято изображать по одной из каждой пары гомологичных хромосом.

Наименьшее число хромосом среди эукариот имеет нематода *Ascaris megalocephala univalens* ($2n = 2$). Наибольшие числа хромосом встречаются у простейших и папоротников, для которых характерны высокие уровни полиплоидии. У них число хромосом достигает нескольких сот. Обычны диплоидные наборы, содержащие от десятка до нескольких десятков хромосом (табл. 4.1 и 4.2).

Таблица 4.1. Числа хромосом (диплоидный набор) некоторых животных (из Лобашева, 1967, с дополнением)

Организм	2n	Организм	2n
Человек — <i>Homo sapiens</i>	46	Карась — <i>Carassius auratus</i>	94—100
Шимпанзе — <i>Pan troglodytes</i>	48	Комнатная муха — <i>Musca domestica</i>	12
Макака резус — <i>Macacus rhesus</i>	42	Плодовая мушка — <i>Drosophila melanogaster</i>	8
Лошадь — <i>Equus caballus</i>	64	Комар-пискун — <i>Culex pipiens</i>	6
Лошадь Пржевальского — <i>E. przewalskii</i>	66	Пчела — <i>Apis mellifera</i>	
Осёл — <i>E. asinus</i>	62	самка	32
Домашняя свинья — <i>Sus scrofa</i>	38	самец	16
Дикий кабан — <i>S. scrofa</i>	36	Тутовый шелкопряд — <i>Bombyx mori</i>	56
Домашняя овца — <i>Ovis aries</i>	54	Оранжевая (персиковая) тля — <i>Muzus persicae</i>	12
Корова — <i>Bos taurus</i>	60	1 оловная вошь — <i>Pediculus capitis</i>	12
Домашняя коза — <i>Capra hircus</i>	60	Рыжий таракан — <i>Blattella germanica</i>	
Кошка — <i>Felis catus</i>	38	самка	24
Лисица — <i>Vulpes vulpes</i>	38	самец	23
Собака — <i>Canis familiaris</i>	78	Саранча азиатская — <i>Locusta migratoria</i>	23
Мышь домовая — <i>Mus musculus</i>	40	Клещ собачий — <i>Ixodes ricinus</i>	28
Крыса серая — <i>Rattus norvegicus</i>	42	Речной рак — <i>Astacus fluviatilis</i>	ок. 116
Опоссум — <i>Didelphis</i>	22	Краб — <i>Eupagurus ochotensis</i>	ок. 254
Кролик — <i>Oryctolagus cuniculus</i>	44	Лошадиная аскарида — <i>Ascaris megalocephala</i>	2, 4
Норка — <i>Mustella vison</i>	30	Садовая улитка — <i>Helix pomatia</i>	24, 48
Куры домашние — <i>Gallus domesticus</i>	78	Дождевой червь — <i>Lumbricus terrestris</i>	36
Индюк — <i>Melleagris gallopavo</i>	82	Планария — <i>Dugesia gonocephala</i>	16—32
Голубь — <i>Columba livia</i>	80	Гидра пресноводная — <i>Hydra oligactis</i>	32
Утка-кряква — <i>Anus platyrhynchos</i>	80	Малярийный плазмодий — <i>Plasmodium malariae</i>	2
Ящерица прыткая — <i>Lacerta agilis</i>	38		
Лягушка озерная — <i>Rana ridibunda</i>	26		
Жаба — <i>Bufo bufo</i>	24		
Квакша — <i>Hyla arborea</i>	24		
Тритон — <i>Triturus vulgaris</i>	24		
Окунь — <i>Perca fluviatilis</i>	48		
Сазан — <i>Cyprinus carpio</i>	104		

У многих растений, а также животных наряду с постоянными компонентами кариотипа — так называемыми А-хромосомами — в ядрах некоторых особей данного вида содержатся дополнительные, или В-хромосомы. Часто они почти целиком состоят из гетерохроматина. Число их варьирует от одного до нескольких десятков у некоторых видов *Нупеносallis* (растение). Причины их появления и выполняемые ими функции до сих пор не ясны.

Таблица 4.2. Числа хромосом (диплоидный набор) некоторых растений (из Лобашева, 1967, с дополнениями)

Организм	2n	Организм	2n
Пихта — <i>Abies</i>	24	Белая акация — <i>Robinia pseudoacacia</i>	20
Ель — <i>Picea</i>	24	Крыжовник — <i>Ribes grossularia</i>	16
Сосна — <i>Pinus</i>	24	Красная смородина — <i>R. rubrum</i>	16
Лиственница — <i>Larix</i>	24	Малина обыкновенная — <i>Rubus idaeus</i>	14, 21, 28, 35, 42
Дуб обыкновенный — <i>Quercus robur</i>	24	Вишня садовая — <i>Cerasus vulgaris</i>	32
Ясень обыкновенный — <i>Fraxinus excelsior</i>	46	Черешня — <i>Cerasus avium</i>	16
Бук лесной — <i>Fagus sylvatica</i>	24	Слива домашняя — <i>Prunus domestica</i>	48
Липа мелколистная — <i>Tilia cordata</i>	82	Абрикос — <i>P. armeniaca</i>	16
Тополь черный — <i>Populus nigra</i>	38, 57	Персик — <i>P. persica</i>	16
Осина — <i>Populus tremula</i>	38, 57	Груша обыкновенная — <i>Pyrus communis</i>	34, 51
Ива белая — <i>Salix alba</i>	76	Яблоня дикая — <i>Malus silvestris</i>	34, 51
Ива ушастая — <i>S. aurita</i>	38, 76	Шелковица белая — <i>Morus alba</i>	28
Ива Бакко — <i>S. bakko</i>	38, 76	Виноград культурный — <i>Vitis vinifera</i>	76
Ольха клейкая — <i>Alnus glutinosa</i>	28, 56	Мак снотворный — <i>Papaver somniferum</i>	22
Береза бородавчатая — <i>Betula verrucosa</i>	28, 42	Брюква — <i>Brassica napus</i>	38
Лещина обыкновенная — <i>Corylus avellana</i>	22	Капуста огородная — <i>B. oleracea</i>	18
Рябина обыкновенная — <i>Sorbus aucuparia</i>	34, 51, 68	Капуста полевая — <i>B. campestris</i>	20
Грецкий орех — <i>Juglans regia</i>	32	Горчица сарептская — <i>B. juncea</i>	36
Хмель вьющийся — <i>Humulus lupulus</i>	20	Редька огородная — <i>Raphanus sativus</i>	18
Конопля посевная — <i>Cannabis sativa</i>	20	Шпинат огородный — <i>Spinacia oleracea</i>	12
Морковь — <i>Daucus carota</i>	18	Свекла обыкновенная — <i>Beta vulgaris</i>	18
Цикорий обыкновенный — <i>Cichorium intybus</i>	18	Лен обыкновенный — <i>Linum usitatissimum</i>	30
Салат-латук — <i>Lactuca sativa</i>	18	Огурец посевной — <i>Cucumis sativus</i>	14
Картофель — <i>Solanum tuberosum</i>	48	Клевер луговой — <i>Trifolium pratense</i>	14
Томат — <i>Lycopersicon esculentum</i>	24	Люцерна посевная — <i>Medicago sativa</i>	32
Перец однолетний — <i>Capsicum annuum</i>	24	Горох посевной — <i>Pisum sativum</i>	14
Пшеница мягкая — <i>Triticum aestivum</i>	42	Фасоль обыкновенная — <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Рожь посевная — <i>Secale cereale</i>	14+(1—8)В	Душистый горошек — <i>Lathyrus odoratus</i>	14
Ячмень обыкновенный — <i>Hordeum vulgare</i>	14	Хлопчатник — <i>Gossypium hirsutum</i>	52
Овес посевной — <i>Avena sativa</i>	42		
Рис посевной — <i>Oryza sativa</i>	24		
Кукуруза — <i>Zea mays</i>	20+(2—12)В		
Табак настоящий — <i>Nicotiana tabacum</i>	48		
Львиный зев — <i>Antirrhinum malus</i>	16.32		
Лук репчатый — <i>Allium cepa</i>	16		

Примечание. В некоторых случаях указаны несколько значений 2n — варианты, существующие в природе. Обратите внимание на кратность этих вариантов какому-то меньшему числу хромосом. В скобках — пределы варьирования числа В-хромосом (см. гл. 14).

4.5. Гигантские (политенные) хромосомы

В клетках некоторых дифференцированных органов двукрылых находятся так называемые гигантские хромосомы. Впервые эти хромосомы в 1881 г. описал Е. Бальбиани в клетках слюнных желез мотыля (*Chironomus*). В дальнейшем такие гигантские хромосомы были обнаружены у личинок двукрылых в ядрах клеток кишечника, мальпигиевых сосудов, а также у некоторых растений в ядрах синергид (см. гл. 8, раздел 2), например у гороха. Гигантские хромосомы в 100—200 раз длиннее и в 1000 раз толще (содержат до 1000 хромонем), чем хромосомы многих интерфазных соматических и половых клеток.

У личинок *Drosophila melanogaster* общая длина четырех пар хромосом в слюнных железах составляет 2000 мкм, а в обычных соматических клетках аналогичная величина составляет 7,5 мкм. На рис. 4.7 для сравнения представлены обычные соматические и гигантские хромосомы из клеток слюнных желез личинок одного из видов кровососущих мошек — симулид.

Характерные форма и размеры гигантских хромосом достигаются вследствие их максимальной деспирализации и многократного воспроизведения хромосом без последующего расхождения. Этот процесс — крайнее выражение так называемого *эндомитоза*. Благодаря тому, что реплицированные хромонемы не расходятся, все

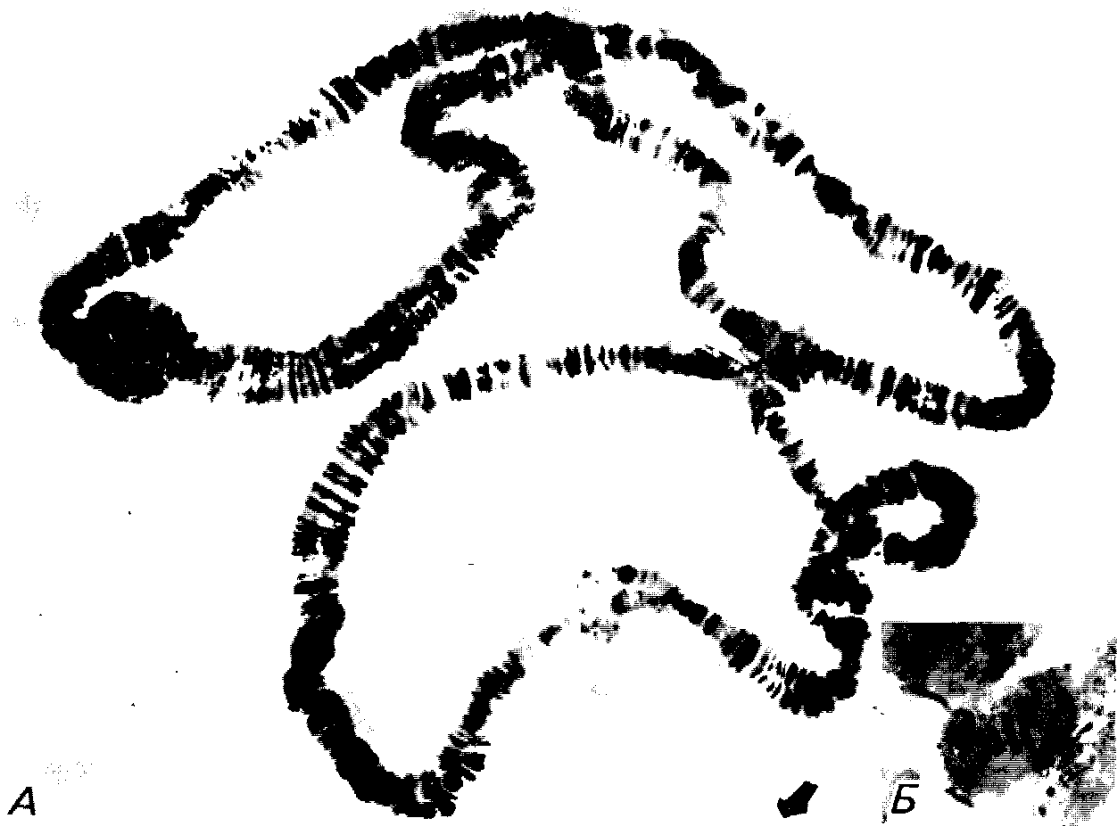


Рис. 4.7. Сравнение гигантских хромосом (А) из слюнных желез и обычных митотических хромосом (Б) из нервных ганглиев симулид *Simulium recurreforme* при одинаковом увеличении (фото В. Д. Симоненко, 1966)

особенности индивидуальной хромонемы и, в частности, ее хромомерный рисунок оказываются более контрастно выраженными. Участки более плотной спирализации хромонем (хромомеры) на гигантских хромосомах представлены в форме поперечной исчерченности — дисков. Такие политенные хромосомы далее не воспроизводятся и находятся в состоянии соматической конъюгации гомологов, достигающей идеальной точности. Диски и междисковые участки гомологов расположены строго параллельно и на большем протяжении хромосом тесно сближены. Такая конъюгация не характерна для хромосом подавляющего большинства соматических клеток. Возможность четко различать детали строения гигантских хромосом в дальнейшем была использована Т. Пайнтером для изучения их перестроек и характера конъюгации хромосом.

4.6. Мейоз

Мейоз — это два следующих друг за другом деления клетки, которые лежат в основе образования гамет, содержащих один набор (n) хромосом, в отличие от соматических клеток, имеющих два набора ($2n$) хромосом.

В полной мере это утверждение справедливо для гаметогенеза животных, так как в результате мейоза у них образуются гаплоидные клетки, дифференцирующиеся и функционирующие как гаметы: *яйцеклетки* и *сперматозоиды*. У высших растений вследствие мейотических делений появляются гаплоидные клетки, дающие начало весьма редуцированным по размеру макро- и микрогаметофиту. (Подробнее об этих различиях в жизненных циклах растений и животных будет рассказано в гл. 8.)

Мейоз протекает сходно почти у всех организмов. Два деления мейоза условно называют мейоз I и мейоз II. В каждом делении мейоза, как и в митозе, различают профазу, метафазу, анафазу и телофазу. Репликация хромосом осуществляется в периоде S-интерфазы, предшествующей мейозу I. На этой стадии делящиеся клетки еще не детерминированы к мейозу и могут вновь делиться митотически, как это показано для дрожжей, у которых простой сменой питательной среды можно индуцировать либо митотические деления, либо мейотические деления. Критической стадией, на которой клетка необратимо вовлекается в мейоз, является профазы мейоза I. Дрожжевые клетки на этой стадии уже не могут вернуться к митотическим делениям и погибают, если прервать нормальное течение профазы мейоза.

Профаза I — сложно организованная стадия. Ее принято подразделять на пять этапов: лептотену, зиготену, пахитену, диплотену и диакинез.

Последовательные стадии мейоза (рис. 4.8) были впервые подробно исследованы Уиниуртером (1900) при изучении яичников кролика, поскольку у этого животного все стадии мейоза при образовании ооцитов очень растянуты.

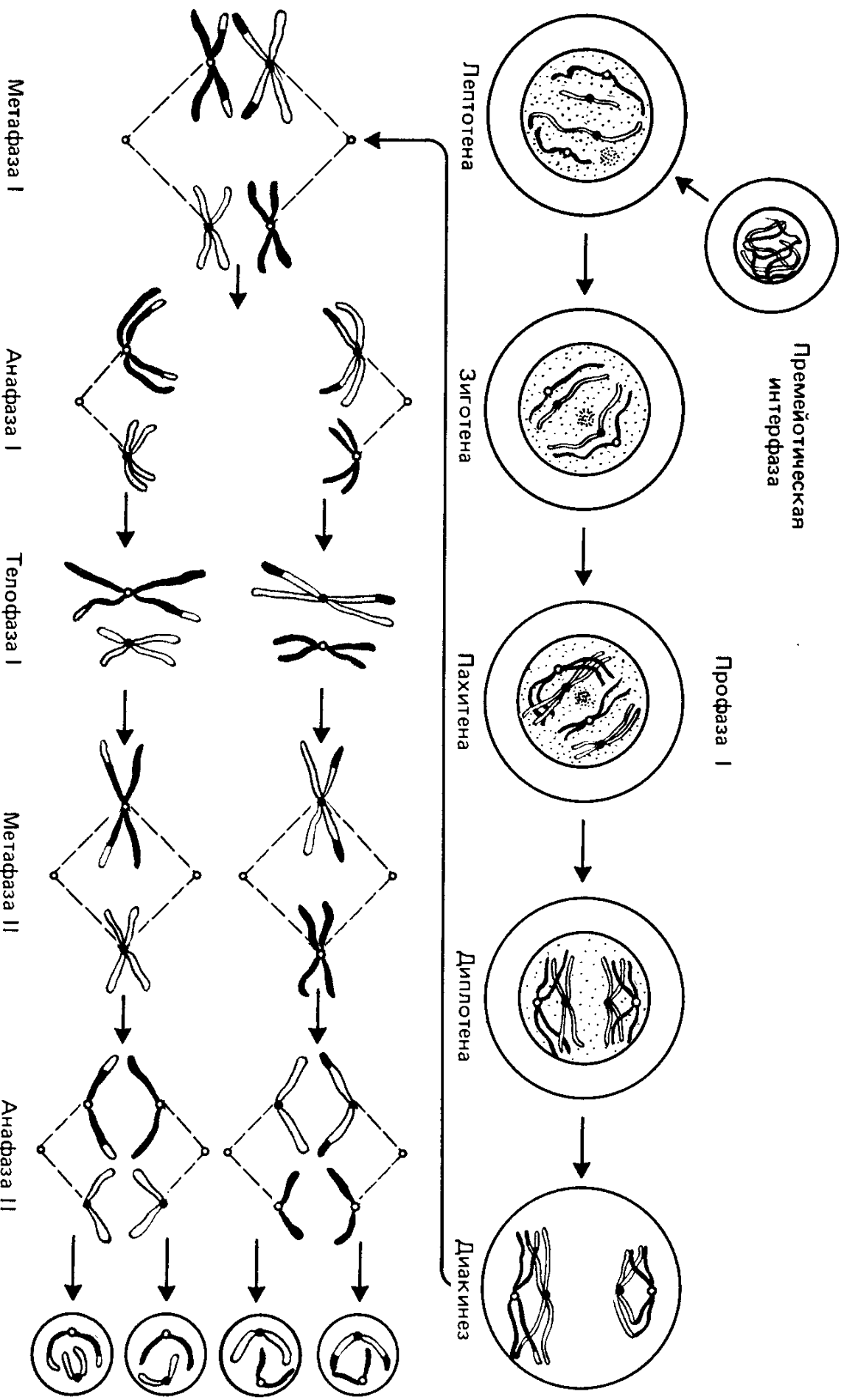


Рис. 4.8. Схематическое изображение последовательных стадий мейоза

Лептотена (стадия тонких нитей) напоминает раннюю профазу митоза. На этой стадии появляются тонкие перекрученные нити хромосом. Иногда выделяют еще стадию пролептотены — период, когда хромосомы уже удвоены, но сестринские хроматиды трудно различимы.

Зиготена знаменуется конъюгацией сначала отдельных участков гомологичных хромосом, которая завершается по всей их длине к концу зиготены. На стадии зиготены у многих животных образуется так называемая фигура букета, а у растений происходит синезис, т. е. сжатие хромосом в клубок. В обоих случаях хромосомы ориентируются теломерными концами к одному из полюсов ядра.

Для этой стадии характерно появление *синаптонемного комплекса* (СК), входящего в состав бивалента — пары конъюгирующих хромосом. В электронном микроскопе СК имеет вид трех или двух электронно-плотных тяжей, располагающихся между конъюгирующими хромосомами. СК — неперенный атрибут конъюгации хромосом в мейозе (рис. 4.9).

Пахитена (стадия толстых нитей) характеризуется гаплоидным числом бивалентов, т. е. фигур, образуемых конъюгирующими хромосомами, каждая из которых состоит из двух хроматид. Число бивалентов таким образом равно гаплоидному числу (n) хромосом. На этой стадии хорошо различим хромомерный рисунок хромосом. В пахитене завершается формирование синаптонемного комплекса. В пахитене и зиготене происходит небольшой дополнительный синтез ДНК — около 0,3 и 0,1% соответственно. Напомним, что репликация ДНК, связанная с воспроизведением хромосом, происходит в периоде S клеточного цикла (в интерфазе).

В **диplotене** наиболее четко видна структура бивалентов и составляющие каждый из них четыре хроматиды. На этой стадии начинается отталкивание гомологов и становятся различимыми фигуры, напоминающие греческую букву χ , так называемые *хиазмы*, которые свидетельствуют об обмене в биваленте гомологичными участками хромосом. В диplotене заметна большая спирализация хромосом, чем на стадии пахитены.

У животных в ядрах созревающих ооцитов на этой стадии наблюдаются характерные образования — хромосомы с отходящими от них боковыми петлями, на которых в свою очередь расположены нити разной длины (рис. 4.10). Это хромосомы типа *ламповых щеток*. Заметны обратно пропорциональные отношения между величиной хромомер и петель, что согласуется с представлением о том, что петли «ламповых щеток» — результат деспирализации определенных хромомер.

На этой стадии образуются многочисленные ядрышки (до 1000 на ядро). Деспирализация хромосом, по-видимому, соответствует проявлению их метаболической активности, поскольку на данной стадии созревания ооцита вырабатываются продукты активности хромосом «про запас». Это необходимо в связи с тем, что последующее развитие оплодотворенного яйца происходит за счет

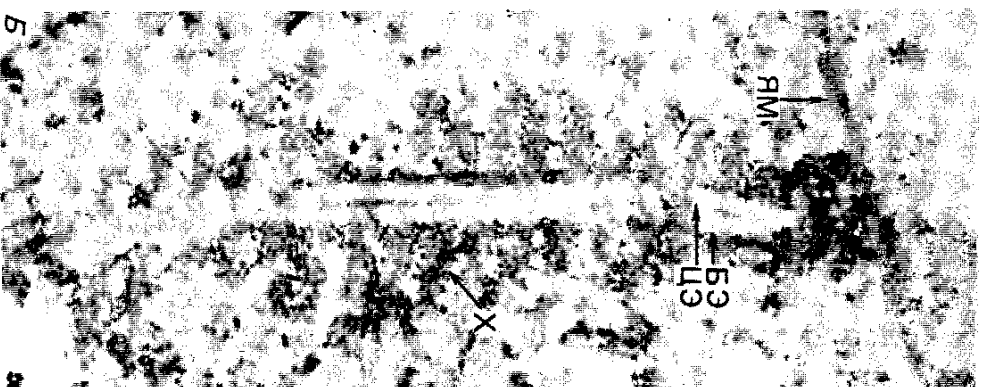
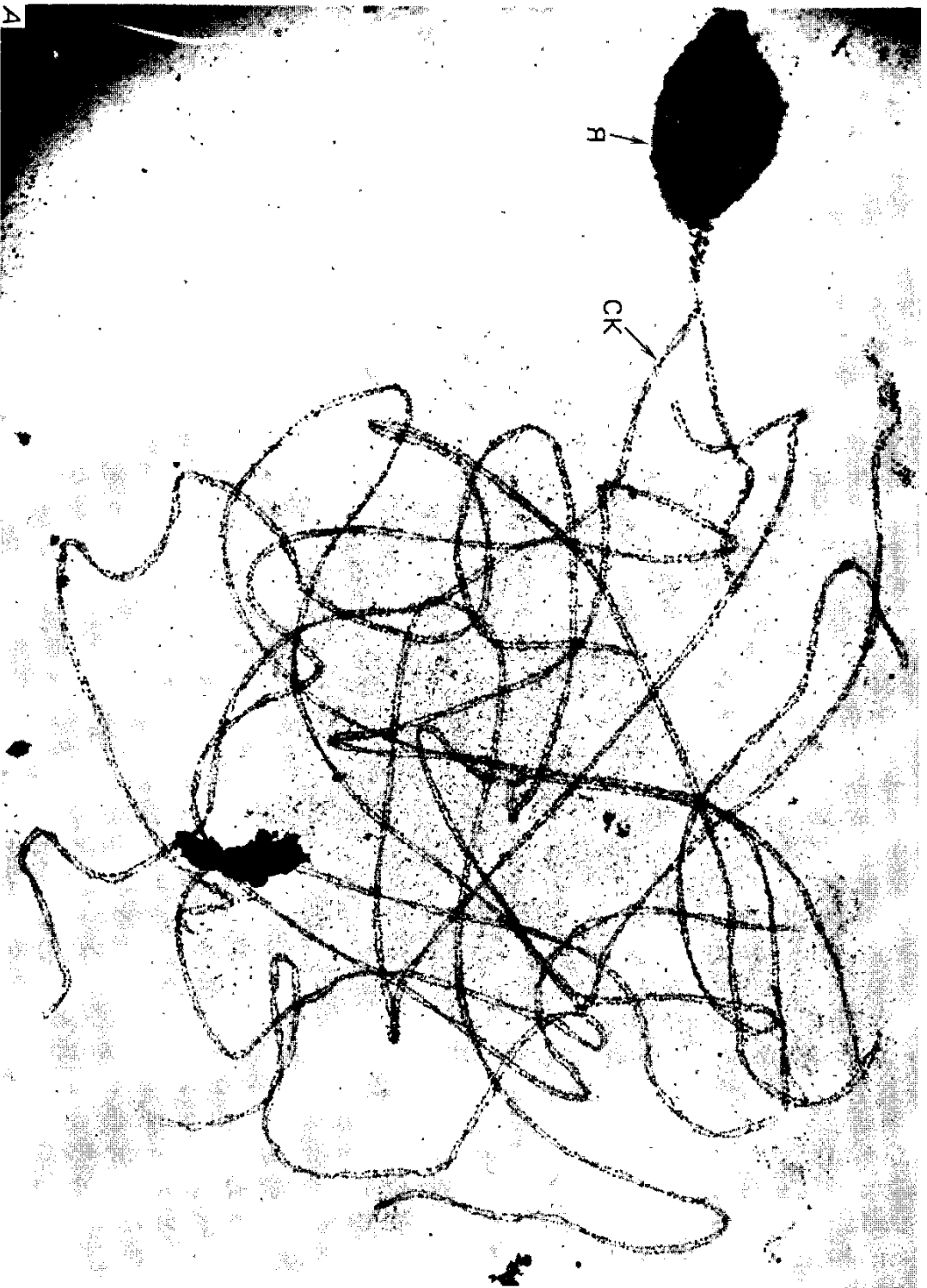


Рис. 4.9. Синаптономный комплекс (электронная микроскопия). А — тотальный препарат синаптономного комплекса ржи: Я — ядрышко, СК — синаптономный комплекс (фото О. Л. Коломиец, Ю. С. Федотовой, Н. Н. Воронцова, 1986; Б — ультраструктура СК лилии: ЯМ — ядерная мембрана, БЭ — боковой элемент, ЦЭ — центральный элемент (фото Ю. Ф. Богданова, 1983)

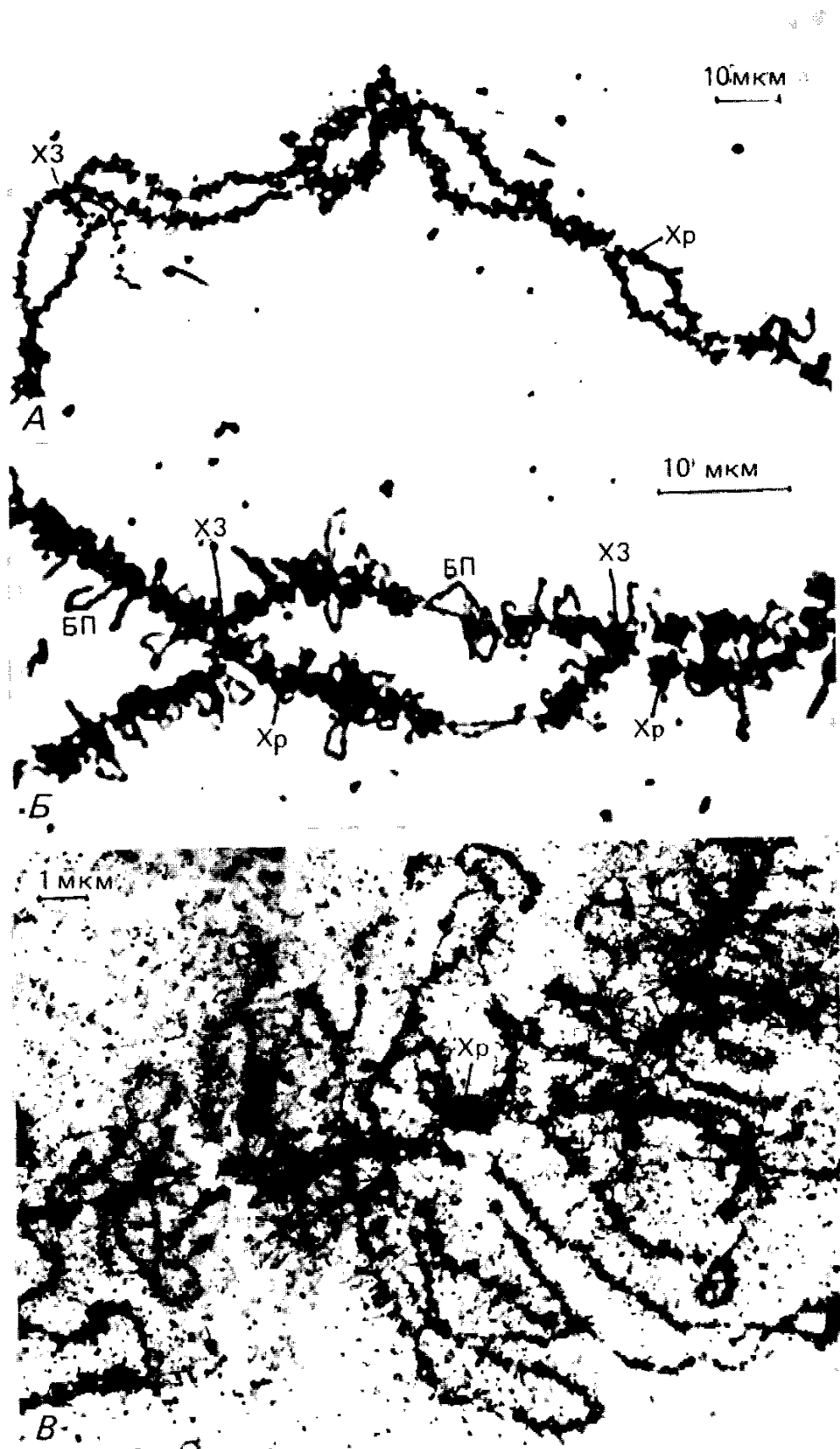


Рис. 4.10. Хромосомы типа ламповых щеток из ооцитов: А — курицы; В — голубя; В — японского перепела (фото Е. Р. Гагинской, Е. В. Кропотовой; А. Г. Цветкова, 1984).

А и Б — световой микроскоп, хорошо видны хиазмы (ХЗ), хромомеры (Хр) с отходящими от них боковыми петлями (БП); В — электронная микрофотография участка «ламповой щетки» с хромомерами (Хр) и боковыми петлями (БП)

цитоплазмы матери. Гены, внесенные сперматозоидом при оплодотворении, часто не функционируют до стадии гаструлы.

В д и а к и н е з е спирализация усиливается, уменьшается число хиазм, биваленты располагаются по периферии ядра.

Метафаза I. Разрушается ядерная мембрана и профазы сменяются метафазой. Исчезают ядрышки. Биваленты располагаются в экваториальной плоскости клетки, образуя метафазную пластинку. Хромосомы при этом сильно спирализованы — утолщены и укорочены. Спирализация хромосом продолжается вплоть до анафазы I, когда хромосомы максимально спирализованы.

В анафазе I хромосомы расходятся к противоположным полюсам. Существенное отличие анафазы I мейоза от анафазы митоза состоит в том, что расходятся хромосомы, состоящие из двух хроматид, прикрепленных к одной центромере. Отцовская и материнская центромеры каждого бивалента расходятся к противоположным полюсам. Центромеры разных бивалентов двигаются независимо друг от друга. Происходит редукция центромер.

Телофаза характеризуется образованием ядерной мембраны и восстановлением структуры ядра.

После непродолжительной **интерфазы**, или **интеркинеза**, наблюдается второе деление мейоза. От обычной интерфазы интеркинез отличается тем, что в нем хромосомы не удваиваются.

В профазе II хромосомы становятся хорошо различимыми. При этом они часто выявляются в виде фигуры креста, потому что сестринские хроматиды, отталкиваясь друг от друга, удерживаются не поделившейся еще центромерой.

Метафаза II осуществляется по митотическому типу. Морфологическое отличие хромосом от митотических на этой стадии — их более четко выраженная двойная структура и большая степень спирализации. В митозе две дочерние хроматиды ассоциированы более тесно.

В анафазе II происходит расхождение удвоенных центромер, в результате чего дочерние хроматиды расходятся к разным полюсам.

В телофазе II образуются четыре гаплоидных ядра.

При рассмотрении двух типов делений клетки не случайно акцентировалось внимание на поведении структур ядра, прежде всего хромосом. В настоящее время только для хромосом, каждая из которых в гаплоидном наборе уникальна, известен механизм точного распределения в митозе и мейозе. Для других клеточных органелл, таких, как митохондрии или пластиды, представленных в клетке во множестве, точный механизм распределения не известен.

4.7. Биологическое значение митоза

Митоз лежит в основе роста и вегетативного размножения всех организмов, имеющих ядро, — эукариот. Основное значение митоза — идентичное воспроизведение клетки, поддержание по-

стоянства числа хромосом, а следовательно, копирование генетической информации. В связи с этим организмы, размножающиеся вегетативно, образуют большое число идентичных особей, или клоны. Клонирование характерно для низших эукариот: грибов, водорослей, простейших, а также для многих растений. Клонирование возможно и у низших животных — беспозвоночных, которые могут восстановить целый организм из части тела: кишечнополостных, червей. Клонирование позвоночных животных встречается значительно реже и возможно только на ранних стадиях эмбриогенеза. Характерный пример — образование *однойцевых близнецов*, в том числе у человека, — внешне неотличимых друг от друга потомков, происходящих из одной оплодотворенной яйцеклетки вследствие ее митотического деления. Для некоторых животных, например броненосцев (*Armadilla*), подобное клонирование является правилом: самка *Dasipus hybridus* приносит до 12 потомков одного пола.

В дальнейшем будет возможность убедиться в том, что даже клонирование не дает полной гарантии идентичности потомства (см. гл. 7, 8).

4.8. Биологическое значение мейоза

Мейоз — способ деления клетки, лежащий в основе редукции числа хромосом: $2n \rightarrow n$. Сходство и различия митоза и мейоза приведены в табл. 4.3. Биологическое значение мейоза впервые оценил А. Вейсман, который отметил, что редукция числа хромосом в мейозе и последующее оплодотворение лежат в основе поддержания постоянства числа хромосом вида из поколения в поколение. Кроме того, мейоз обеспечивает комбинативную изменчивость. Поскольку хромосомы разных бивалентов расходятся в анафазе I независимо друг от друга, это приводит к рекомбинации родительских наборов хромосом. В мейозе происходит также рекомбинация участков гомологичных хромосом, судя по появлению хиазм на стадии диплотены — пахитены (подробнее см. гл. 7).

Сопоставление поведения хромосом в мейозе и при оплодотворении с поведением менделевских факторов (генов) было положено У. Сэттоном (1903) в основу хромосомной теории наследственности. Действительно, гаплоидные гаметы содержат по одной из каждой пары хромосом и соответственно по одному менделевскому фактору, или аллеломорфу.

Слияние гаплоидных гамет приводит к объединению в ядре по одной гомологичной хромосоме от каждого родителя, а если они различались по аллелям одного гена, то и к установлению гетерозиготности (Aa).

При мейозе происходит редукция числа хромосом, при этом гомологи из разных бивалентов расходятся в анафазе I независимо и также независимо ведут себя разные пары менделевских факторов ($AaBb$), образуя в итоге 4 типа гамет: AB, Ab, aB, ab .

Таблица 4.3. Сравнение митоза и мейоза

Стадия	Митоз	Мейоз
Интерфаза	Синтез ДНК. Удвоение хромосом	Синтез ДНК. Удвоение хромосом
Профаза I	Компактизация хромосом	Компактизация хромосом. Конъюгация гомологичных хромосом — образование бивалентов, рекомбинация
Метафаза I	Расположение хромосом в плоскости экватора	Расположение бивалентов в плоскости экватора
Анафаза I	Расхождение сестринских хроматид к полюсам	Расхождение гомологичных хромосом к полюсам. Независимое расхождение хромосом, входящих в разные биваленты
Телофаза I	Формирование в клетке двух идентичных диплоидных ядер	Формирование в клетке двух гаплоидных ядер, которые могут различаться генотипически
Профаза II	—	Компактизация хромосом
Метафаза II	—	Расположение центромеров в плоскости экватора
Анафаза II	—	Расхождение сестринских хроматид к полюсам
Телофаза II	—	Формирование четырех гаплоидных ядер, которые могут различаться генотипически

Эти сопоставления иллюстрирует схема мейоза (рис. 4.11) у организма с условным гаплоидным числом хромосом: $n = 2$. Если гены *A* и *B* поместить в негомологичные хромосомы, то поведение хромосом и генов полностью совпадает.

Важное следствие этого сопоставления — то, что в результате мейоза у гетерозиготного (*Aa*) организма должны образоваться четыре гаплоидных ядра, из которых два несут аллель *A*, а два других — аллель *a*. Тогда расщепление на гаметическом уровне должно быть $2A : 2a$. У высших организмов это расщепление обычно не удается наблюдать. Во-первых, из четырех ядер, образующихся в мейозе при овогенезе, функционирует только одно (см. гл. 8). Во-вторых, четыре сперматозоида животных, образующихся из одного диплоидного сперматоцита, расходятся. Аналогичные проблемы возникают и при микро- и макроспорогенезе у растений. Имея дело с такими объектами, можно только постулировать обязательное равенство по числу гамет *A* и *a*. Следствием этого равенства и равновероятной встречи всех типов гамет при оплодотворении и будет соблюдение числовых соотношений $3A : 1aa$ в F_2 моногибридного скрещивания с теми или иными

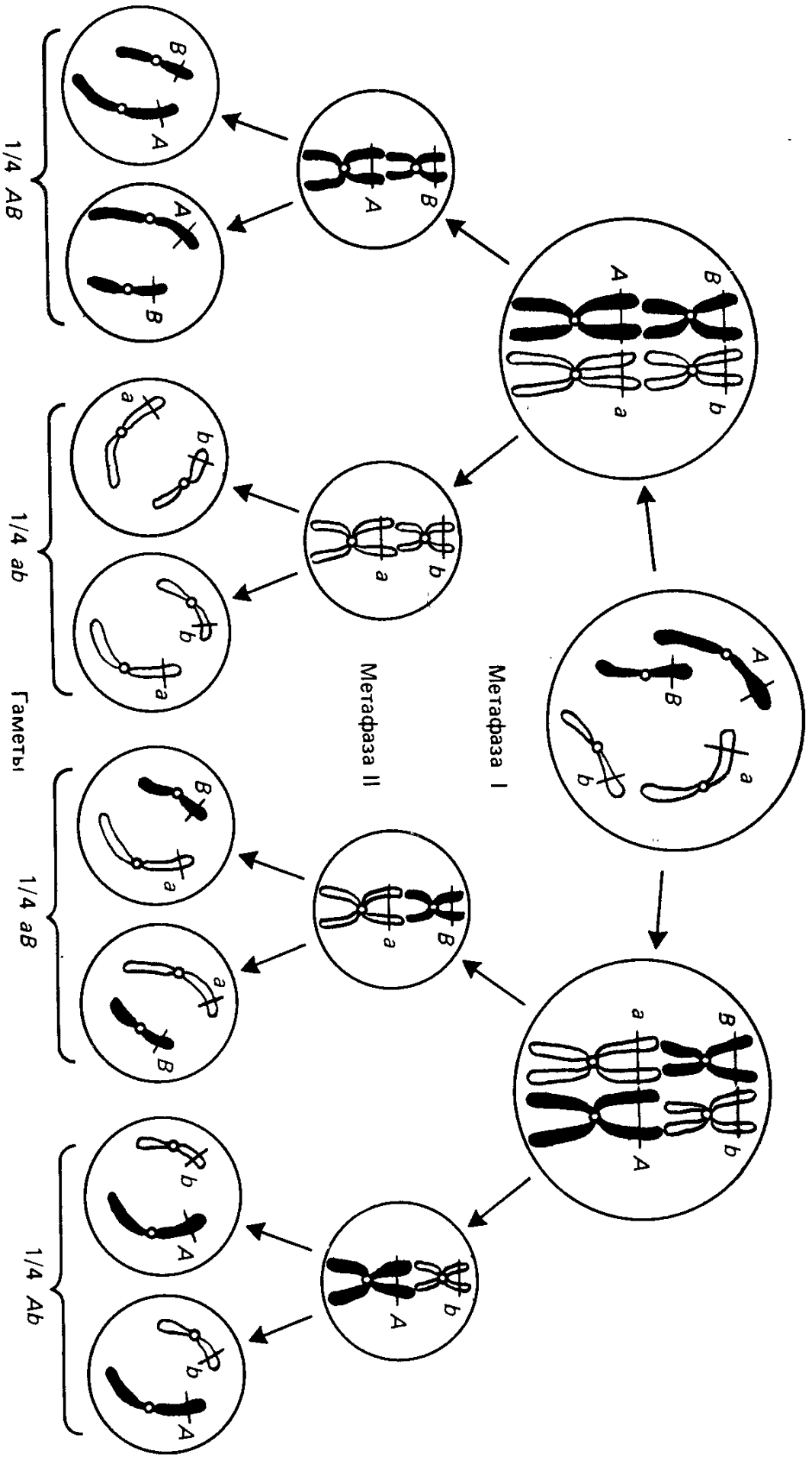


Рис. 4.11. Схема, иллюстрирующая параллелизм в поведении хромосом и менделевских факторов

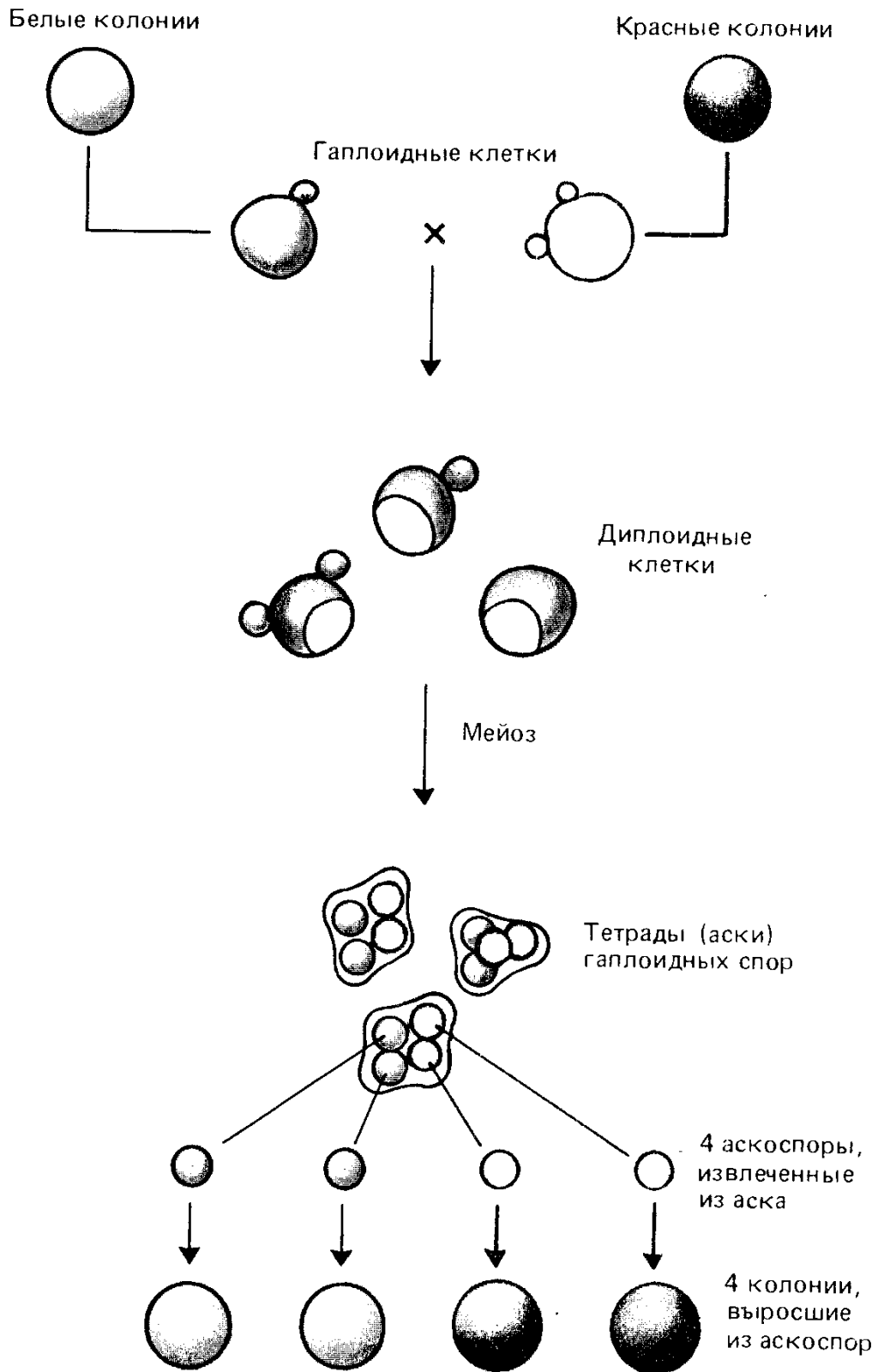


Рис. 4.12. Гаметическое расщепление в мейозе моногетерозиготы *ADE2/ade2* у дрожжей-сахаромицетов

отклонениями от идеального соотношения в силу случайных причин.

Таким образом, непосредственно проверить правило «чистоты гамет», лежащее в основе менделевского расщепления, у таких объектов не удастся. Это можно сделать, лишь обратившись к

организмам, у которых все четыре продукта мейоза остаются вместе и могут далее функционировать как вегетативные клетки. К их числу относятся мхи, грибы (аскомицеты), водоросли и некоторые другие. У них возможен так называемый тетрадный анализ. У аскомицетов, например у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в результате мейоза диплоидных вегетативных клеток образуются сумки, или аски, содержащие по четыре гаплоидные аскоспоры. Аскоспоры можно извлечь из асков и получить вегетативный клон — культуру из каждой из них. Если исходный диплоид был

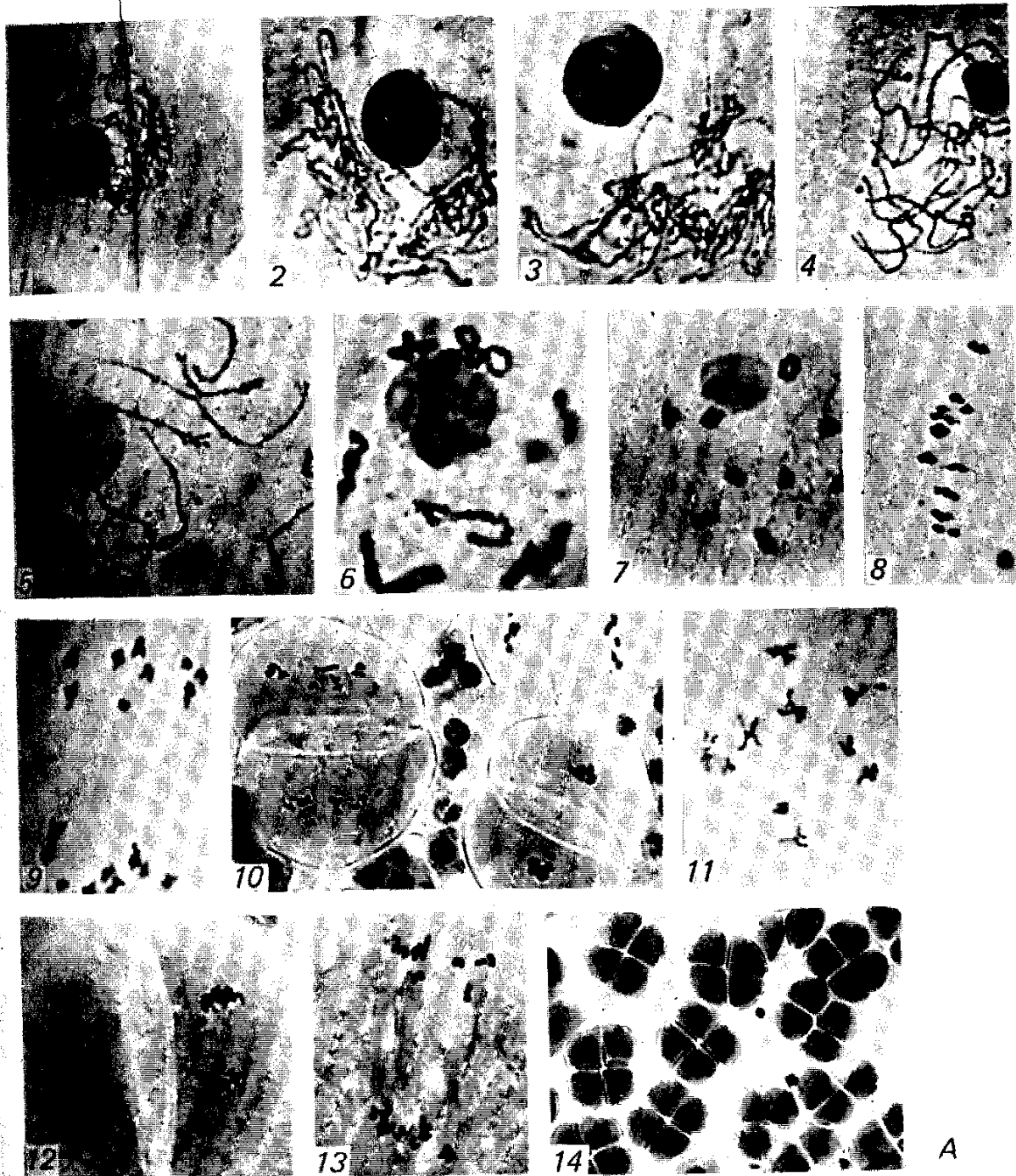


Рис. 4.13. Мейоз при микроспорогенезе у кукурузы: $2n = 20$ (фото И. Н. Голубовской).

А — норма:

1—5 — пахитена, конъюгация гомологов; 6 — диплотена, 7 — диакинез, 8 — метафаза I, 9 — анафаза I, 10, 11 — прометафаза II, 12, 13 — анафаза II, 14 — тетрады микроспор.

гетерозиготен по какому-либо гену, например *ADE 2/ade 2*, то в каждой тетраде две споры обычно образуют белые колонии (*ADE 2*), а две другие — красные (*ade 2*). Напомним, что мутация *ade 2* приводит к накоплению красного пигмента в клетках (см. гл. 2). Это расщепление — общая закономерность, характерная для моногенного наследования. Таким образом, тетрадный анализ доказывает (рис. 4.12), что в основе менделевских соотно-

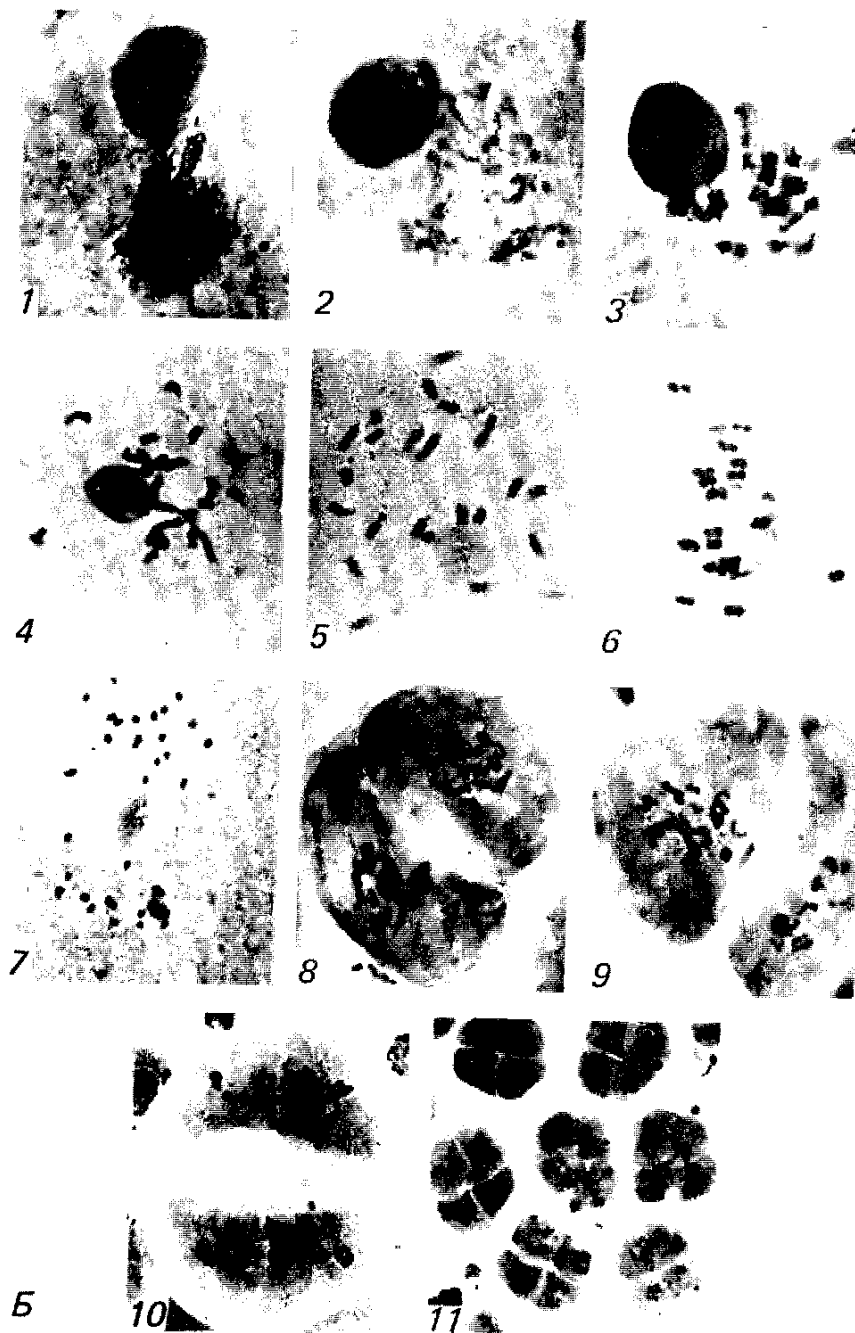


Рис. 4.13. Продолжение

Б — мейоз при микроспорогенезе у рецессивного мутанта кукурузы *afd* (absence of the first division) с нарушениями в первом делении:

1—5 — аномальная профза I: отсутствует конъюгация гомологов, хромосомы представлены исключительно унивалентами; 6 — метафаза I: 20 унивалентов в плоскости веретена; 7 — анафаза I: к полюсам отходят по 20 хроматид, центромеры поделились в I делении мейоза; 8, 9 — профза II; 10 — анафаза II: аномальное расхождение хроматид, поскольку центромеры разделились уже в I делении мейоза; 11 — тетрады: наблюдается много микроядер

шений лежит строгий биологический закон — закон гаметического расщепления $2A:2a$ в каждом мейозе. Следовательно, можно воочию убедиться в справедливости правила чистоты гамет, анализируя расщепление на гаплоидном (гаметическом) уровне в тетрадах — продуктах индивидуального мейоза.

4.9. Генетический контроль мейоза

Различные стадии мейоза — два последовательных деления и поведение хромосом — находятся под генетическим контролем. Об этом свидетельствует неодинаковое протекание мейоза у разных полов, что характерно, например, для рода *Drosophila*. У самцов этих мух отсутствует плотная конъюгация хромосом, не образуются синаптонемный комплекс и хиазмы, а следовательно, не происходит обменов между гомологичными хромосомами, в то время как все эти процессы в норме наблюдаются у самок.

Известны мутации, нарушающие мейоз и расхождение хромосом только у самок *D. melanogaster* или у обоих полов этого объекта. Так, существует несколько десятков генов, мутации в которых нарушают конъюгацию всех хромосом у самок, мутации более 10 генов затрудняют обмены между гомологами и одновременно нарушают нормальное расхождение гомологов в мейозе I. Известны также мутации, нарушающие только расхождение всех хромосом в первом делении или отдельных хромосом во втором делении. Такие мутации приводят к нерасхождению хромосом или к их потерям.

Значительное число мутантов с нарушенным мейозом известно у растений: кукурузы, ржи, пшеницы, томата, гороха и др. У так называемого амеиотического мутанта кукурузы блокирован сам переход материнских клеток микроспор от митотических делений к мейотическим. Мутанты с нарушениями профазы I делятся на две категории: 1) те, у которых нарушена конъюгация хромосом и образуется много унивалентов в профазе I, и 2) те, у которых хромосомы приобретают способность к неспецифическим взаимодействиям — «клейкость» хромосом, в дальнейшем приводящая к образованию «мостов» и разрывов при расхождении хромосом к полюсам в анафазе I. Известны также мутанты, у которых нарушено расхождение отдельных хромосом в анафазе II. На рис. 4.13 показаны различные стадии мейоза у мутанта кукурузы с нарушенной конъюгацией хромосом в профазе I. Плейотропные эффекты этой мутации (*afd*) проявляются как в первом, так и во втором делении мейоза. Действие нескольких мейотических мутаций у ржи показано на рис. 4.14. Все они также имеют плейотропные проявления, но на рис. 4.14 показаны наиболее характерные для каждой мутации нарушения мейоза.

Возможность получения и исследования мутантов по мейозу позволяет расчленить этот сложный процесс на относительно не-

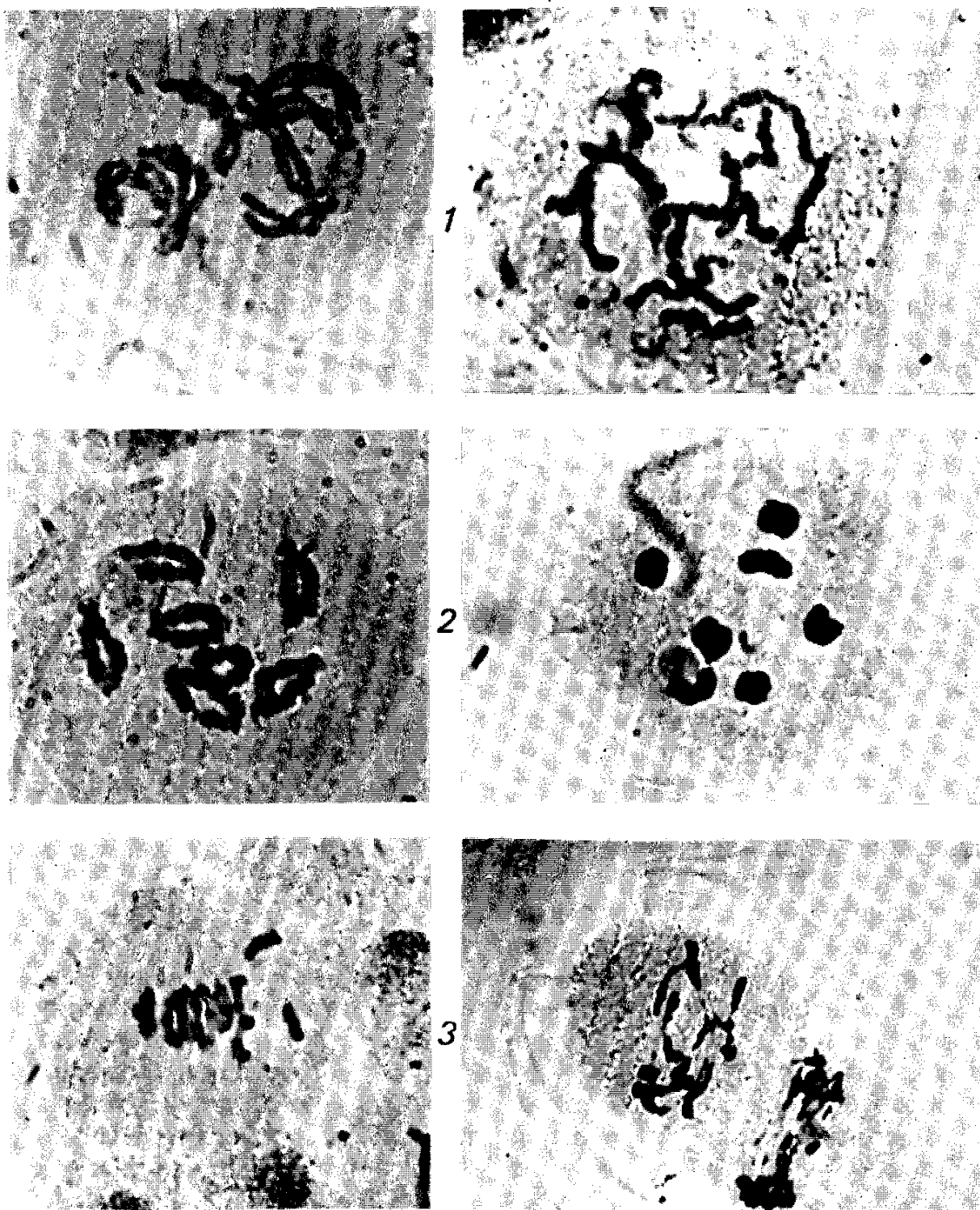
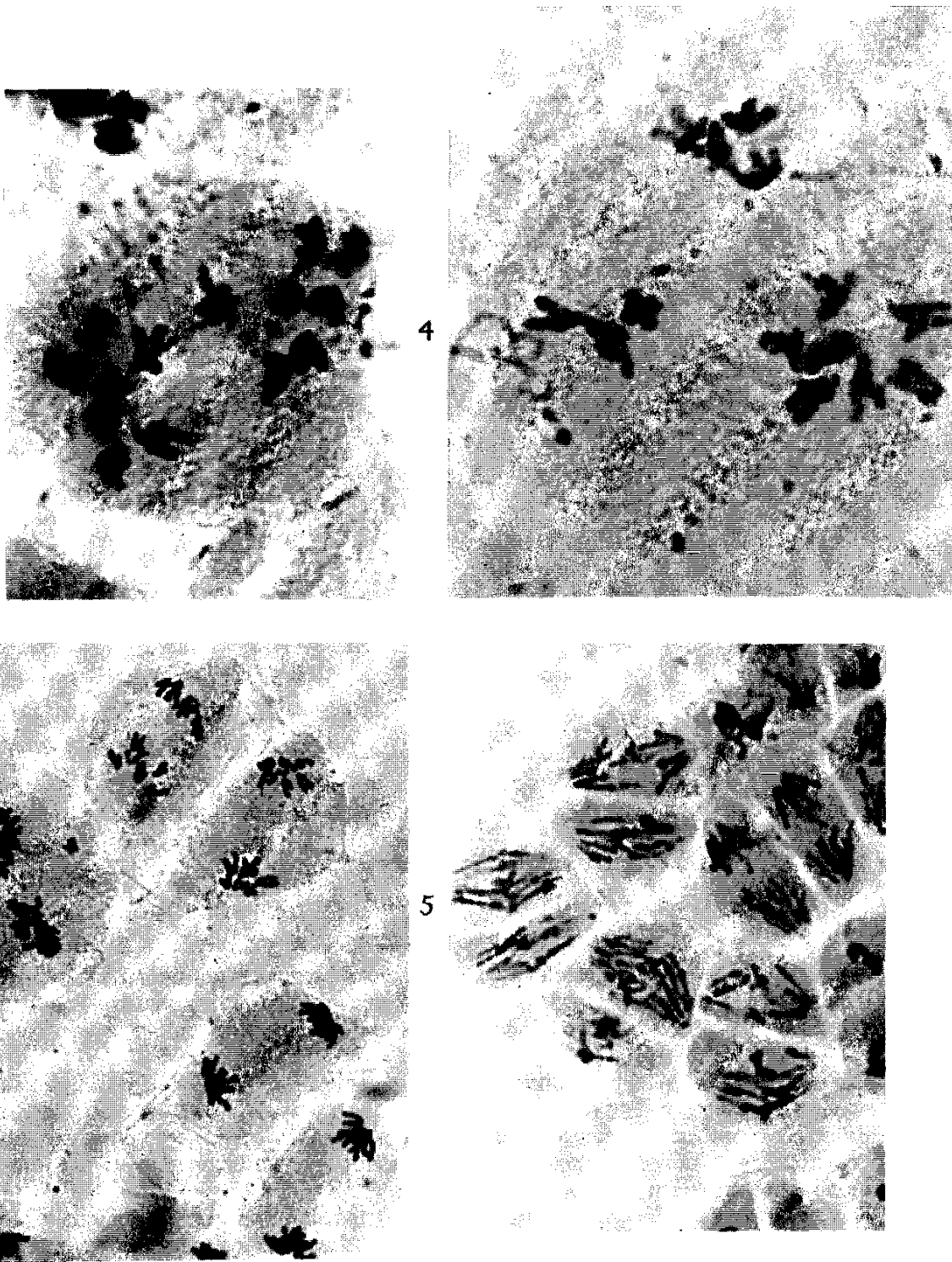
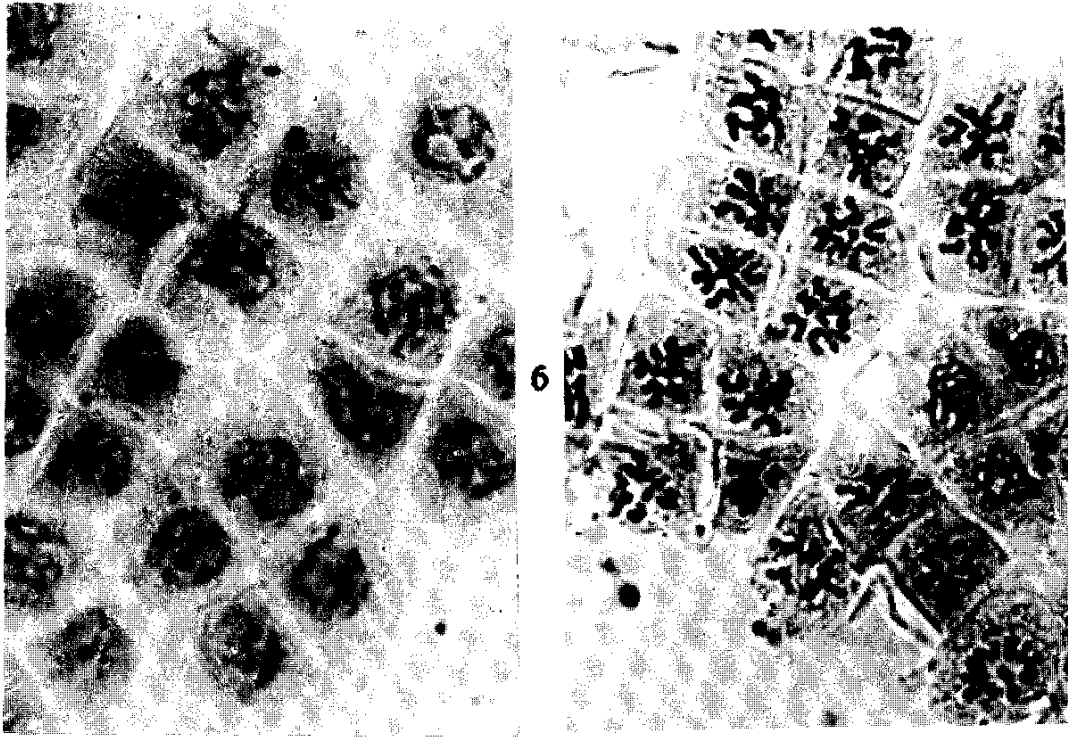


Рис. 4.14. Мейоз при микроспорогенезе у ржи $2n = 14$ (фото С. П. Соснихиной): слева — норма, справа — нарушения, обусловленные рецессивными мутациями: 1 — диплотена: справа асинатический мутант, хромосомы представлены унивалентами (у этого мутанта не формируется синатномный комплекс); 2 — диакинез: справа — мутант с усиленной спирализацией хромосом; 3 — метафаза I: справа — мутант с неравномерной спирализацией хромосом — участки плотной спирализации перемежаются с деспириализованными участками, хромосомы слипаются и фрагментируются; 4 — анафаза I: сверху — мутант с нарушением образования веретена — трехполюсное расхождение хромосом; 5 — анафаза II: у мутанта сверху — слабая спирализация, наблюдается слипание хромосом; 6 — стадия тетрад: в телофазе II в норме (слева) хромосомы деспирилизуются и формируются 4 ядра микроспор. Справа — результат комплементарного действия двух мутаций: хромосомы без репликации переходят к митозу. Микроспоры дегенерируют вследствие аномального расхождения гаплоидных наборов хромосом (с. 84)



Продолжение рис. 4.14

зависимые этапы, выявить отдельные фены и изучить плеiotропные эффекты различных мутаций, а следовательно, сделать заключение о функциях нормальных аллелей соответствующих генов. Таким образом, метод генетического анализа применим к изучению даже таких сложных процессов, как мейоз.



Продолжение рис. 4.14

Вопросы к главе 4

1. Укажите фазы митоза. Назовите типы метафазных хромосом.
2. В результате действия колхицина в течение одного митотического деления получены клетки ржи с 28 хромосомами. Каково гаплоидное число хромосом у ржи?
3. Почему гаплоидные растения томатов обычно не дают семян и размножаются только вегетативно?
4. Если соматическая клетка имеет 28 хромосом, то сколько хроматид идет к каждому полюсу в анафазе эквационного (второго мейотического) деления? Каково число бивалентов в профазе I?
5. Как будет вести себя дицентрическая (имеющая две центромеры) хромосома в анафазе I мейоза? Изобразите на схеме. Каковы последствия этих событий для гамет?
6. Сопоставьте поведение хромосом в анафазе митоза и анафазе I мейоза. Как называются структуры, расходящиеся к полюсам клетки в митозе и мейозе I?
7. Какие хромосомы называются гомологичными? Как установить гомологичность хромосом?
8. Вследствие каких событий в мейозе из одной клетки $2n$ могут возникнуть четыре генетически неидентичные клетки n ?
9. В чем разница между понятиями клеточный цикл и митоз?
10. Что такое точка «старта» в клеточном цикле?
11. Сколько бивалентов наблюдается в диплотеме у опоссума?
12. Как вы можете объяснить наличие нескольких значений хромосомных чисел для некоторых растений в табл. 4.2?
13. В чем заключается биологический смысл мейоза?
14. Какой эксперимент доказывает справедливость правила чистоты гамет?

Хромосомная теория наследственности

Параллелизм в поведении генов и хромосом, отмеченный еще У. Сэттоном и Т. Бовери в 1902—1903 гг., послужил обоснованием хромосомной гипотезы, а в дальнейшем — теории наследственности. Согласно этой теории гены расположены в хромосомах в линейной последовательности и таким образом именно хромосомы представляют собой материальную основу наследственности, т. е. преемственности свойств организмов в ряду поколений.

Основные доказательства хромосомной теории наследственности были получены в экспериментах Т. Х. Моргана и его сотрудников в начале нашего столетия. Тем самым был сделан важный шаг в развитии методологии генетического анализа. Среди прочих объектов своей лаборатории Т. Х. Морган отдавал предпочтение плодовой мушке *Drosophila melanogaster* (рис. 5.1). Она очень удобна для гибридологического анализа благодаря обилию легко учитываемых признаков, различия по которым наследуются согласно моногибридной схеме. Дрозофилу нетрудно разводить в лаборатории на искусственной среде. Одна пара особей в среднем дает около 100 потомков. При 25 °С весь цикл развития мухи составляет 10 дней.

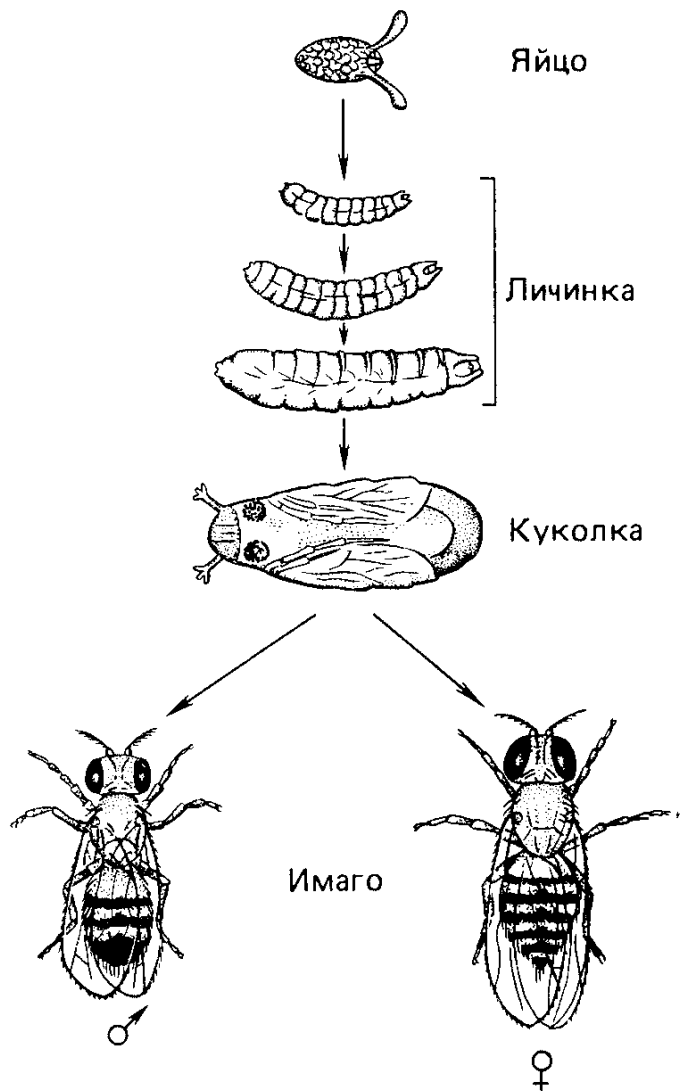


Рис. 5.1. *Drosophila melanogaster* и цикл ее развития

5.1. Сцепление с полом

Среди многих признаков дрозофилы Т. Х. Морган обнаружил и такие, наследование которых отклонялось от менделевской схемы. Например, при скрещивании мух с белыми глазами (w) и мух с обычными темно-красными глазами (w^+) были обнаружены ха-

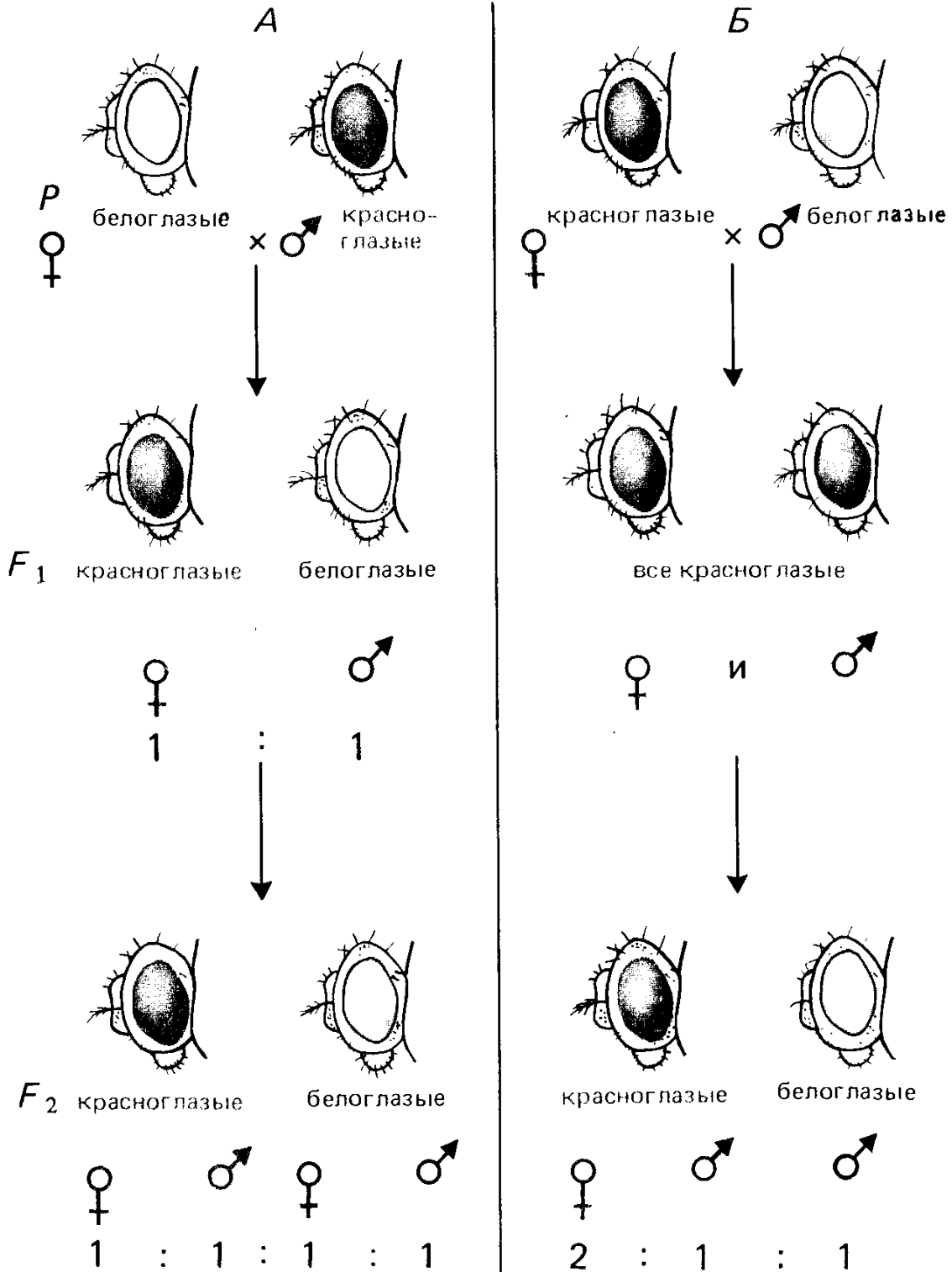


Рис. 5.2. Расщепление по фенотипу при реципрокных скрещиваниях мух white (w) — белые глаза и нормальных мух с темно-красными глазами (w^+). А: ♀ w × ♂ w^+ . Б: ♀ w^+ × ♂ w

рактельные различия результатов реципрокных скрещиваний (рис. 5.2). Два скрещивания, различающиеся по тому, кто из родителей (самец или самка) вносит в зиготу доминантную (или рецессивную) аллель, называются *реципрокными*.

При скрещивании красноглазой самки и белоглазого самца в F_1 все мухи были красноглазыми, а в F_2 происходило расщепление в соотношении 3/4 красноглазых: 1/4 белоглазых. Это показывает, что признак «белые глаза» — рецессивный, а «красные глаза» — доминантный. Необычным было то, что в F_2 белоглазыми были только самцы, а среди красноглазых самки и самцы встречались в соотношении 2 : 1.

Несмотря на то что признак «белые глаза» рецессивный и линия белоглазых мух не расщеплялась при разведении так же, как другая родительская линия с доминантным признаком «красные глаза», в F_1 реципрокного скрещивания наблюдалось расщепление 1 : 1. При этом все самки F_1 были красноглазыми, а все самцы — белоглазыми.

Такое наследование получило название *крисс-кросс* (или крест-накрест) *наследования*: сыновья наследуют признак матери, а дочери — признак отца. При таком скрещивании в F_2 появляются в равном соотношении как красноглазые самки и самцы, так и белоглазые самки и самцы.

Таким образом, закон единообразия гибридов F_1 в одном из реципрокных скрещиваний не соблюдается. Реципрокные скрещивания дают разные результаты. При скрещивании белоглазых самок и красноглазых самцов в F_2 наблюдается расщепление 1 : 1 вместо 3 : 1, как ожидается по классической схеме моногибридного расщепления. Все это, казалось бы, не согласуется с правилами Г. Менделя. Сопоставление этих скрещиваний с данными кариотипа дрозофилы позволило объяснить полученные результаты.

Кариотип дрозофилы представлен на рис. 5.3. Самки и самцы имеют четыре пары хромосом: три пары хромосом одинаковы у самок и самцов, а одна пара у самок представлена одинаковыми X-хромосомами, а у самцов — одной X- и одной Y-хромосомой. Y-хромосома отличается от X-хромосомы по форме, а кроме того, в отличие от X-хромосомы она почти целиком состоит из гетерохроматина.

Итак, самцы дрозофилы несут пару различных хромосом, получивших название *половых* (XY), а самки — пару одинаковых половых хромосом (XX). В таком случае каждое скрещивание является как бы анализирующим по признаку пола: самки образуют только один тип гамет: с X-хромосомой. Это *гомогаметный пол*. Самцы образуют два типа гамет: с X- и с Y-хромосомой. Это *гетерогаметный пол*. Случайное сочетание этих гамет самца и самки и обеспечивает ста-

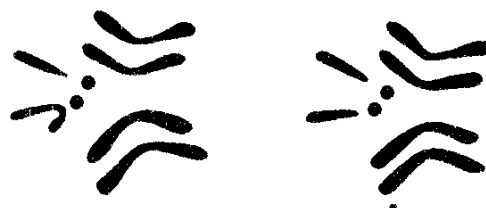


Рис. 5.3. Кариотип *D. melanogaster*

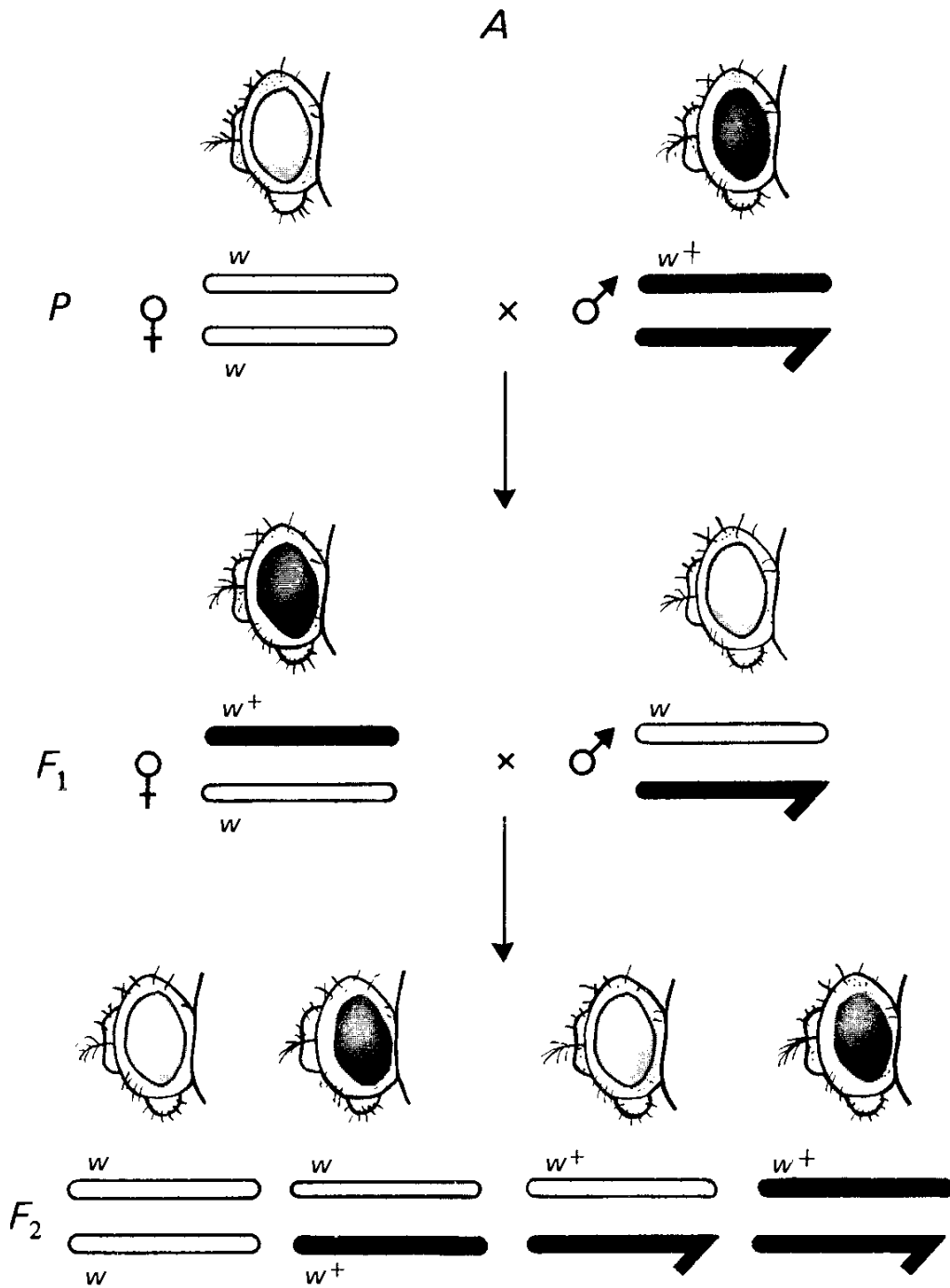
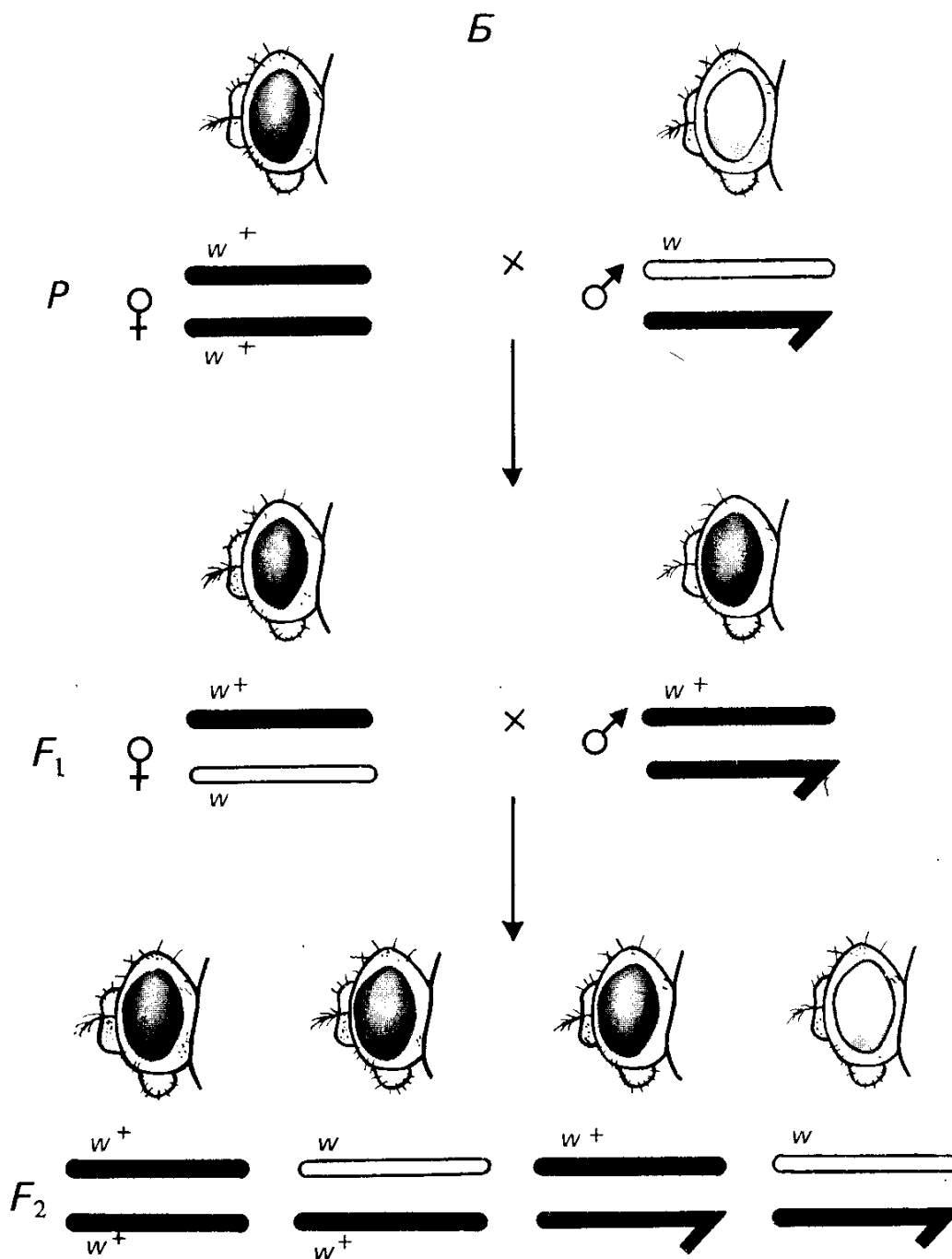


Рис. 5.4. Наследование, сцепленное с полом у дрозофилы при скрещивании самок с белогла

тистически равное число самцов и самок в каждом поколении.

Результаты, полученные при скрещивании красноглазых и белоглазых мух, Морган объяснил, предположив, что ген w находится в X-хромосоме, а Y-хромосома генетически инертна или по крайней мере не содержит гена w^+ . Действительно, такое объяснение вполне соответствует наблюдаемым расщеплениям, как показывает схема на рис. 5.4 (А и Б).

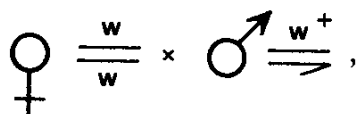


нии белоглазых самок с красноглазыми самцами (А) и красноглазых зыми самцами (Б)

Этот тип наследования получил название наследования, сцепленного с полом, или *сцепления с полом*.

Таким образом, ген w сцеплен с полом, т. е. находится в X-хромосоме. Гетерозиготные самки ww^+ , имеющие две X-хромосомы, оказываются красноглазыми, что свидетельствует о рецессивности аллели w , обуславливающей белоглазие. В то же время самцы, несущие аллель w в своей единственной X-хромосоме, всегда белоглазые, что хорошо согласуется с представлениями

об инертности Y-хромосомы, т. е. об отсутствии в ней нормальной, или доминантной, аллели w^+ . Этим-то и объясняется наследование по схеме крисс-кросс в скрещивании:



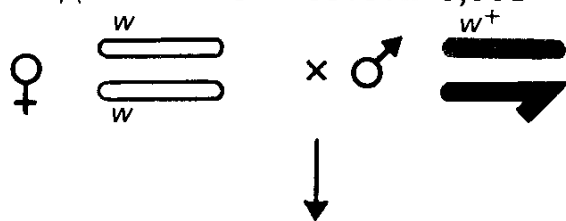
где --- обозначает Y-хромосому.

Присутствие только одной аллели и в единичном числе у диплоидного организма называется *гемизиготным* состоянием или *гемизиготой*.

Таким образом, в этих экспериментах Т. Х. Морганом был получен сильный аргумент в пользу хромосомной теории наследственности.

5.2. Нерасхождение половых хромосом

Молодой сотрудник Т. Х. Моргана К. Бриджес обратил внимание на весьма знаменательное, хотя и редкое, нарушение схемы крисс-кросс наследования. С частотой 0,001—0,1 % в F_1 от скре-



Гаметы		Яйцеклетки		
		w	w w	—
Сперматозоиды	w^+	w w^+ ♀	w w w^+ Обычно гибнут	w^+ ♂
	---	w --- ♂	w w --- ♀	--- Гибнут

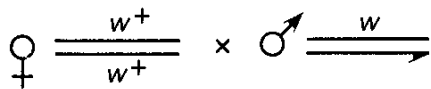
Рис. 5.5. Схема образования исключительных самок (белоглазых) и самцов (красноглазых) в результате нерасхождения X-хромосом (гаметы, образующиеся в результате нерасхождения, обведены рамкой) наряду с обычными красноглазыми самками и белоглазыми самцами

щивания белоглазых самок и красноглазых самцов у дрозофилы появляются белоглазые самки и красноглазые самцы, что противоречит схеме (см. рис. 5.4, А).

К. Бриджес предположил, что такая аномалия наследования связана с нарушением расхождения хромосом в мейозе. У белоглазой гомозиготной самки иногда может образовываться яйцо с двумя X-хромосомами, не разошедшимися в мейозе. В результате оплодотворения такого яйца нормальным сперматозоидом с Y-хромосомой появится исключительная самка с двумя X-хромосомами от матери (w/w) и Y-хромосомой от отца. Красноглазые самцы образуются, если белоглазая самка отложит яйцо, в которое вообще не попадет материнская X-хромосома, но оно будет оплодотворено сперматозоидом с X-хромосомой отца. Тогда красноглазые самцы F_1 должны содержать только одну X-хромосому (w^+) и не иметь Y-хромосомы (рис. 5.5).

Эту гипотезу легко проверить экспериментально. Достаточно исследовать хромосомы таких исключительных мух. К. Бриджес это сделал и убедился в том, что белоглазые самки имеют Y-хромосому наряду с двумя X-хромосомами, а красноглазые самцы — одну X-хромосому. Тем самым было впервые доказано, что определенный ген (w) находится в конкретной хромосоме (X).

Распределение хромосом может нарушаться не только в мейозе, но и в митозе. В F_1 от скрещивания



изредка появляются мухи, у которых один глаз белый, а другой — красный. При более внимательном рассмотрении оказывается, что эти мухи симметрично представлены женской и мужской половинами тела. Таких мух называют *билатеральными гинандроморфами*. При этом белый глаз находится на мужской половине (рис. 5.6). Эти особи возникают в результате потери одной X-хромосомы при первом дроблении зиготы, которая должна дать начало самке. В этом легко убедиться, исследовав хромосомы из левой и правой частей тела такого гинандроморфа. Потери хромосом

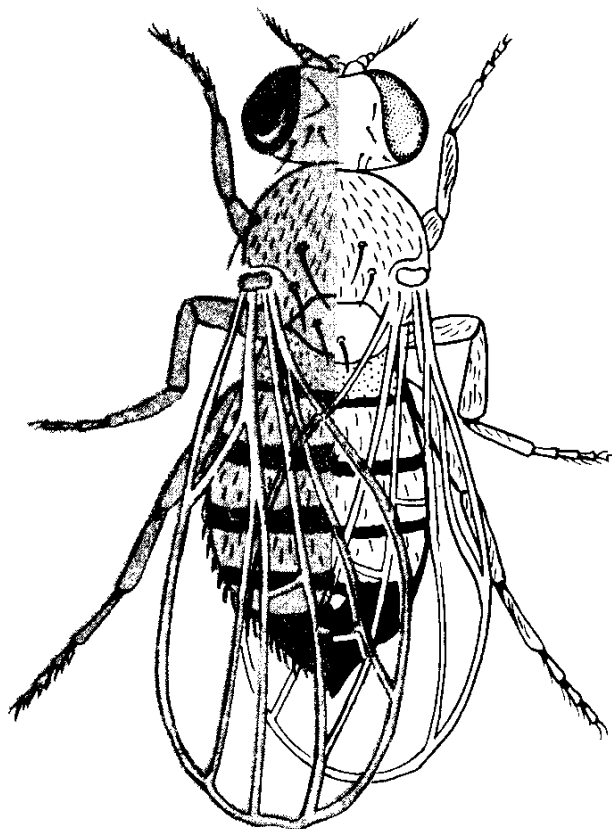
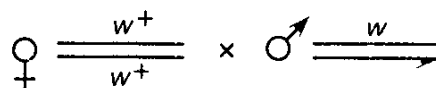


Рис. 5.6. Билатеральный гинандроморф, возникающий в результате потери X-хромосомы на ранней стадии дробления зиготы F_1 ($X^wX^{w^+}$), полученной от скрещивания:



могут происходить и на более поздних стадиях развития. Тогда появляются организмы — *мозаики*, у которых в разных пропорциях представлены участки тела, состоящие из клеток с неодинаковыми числами хромосом.

Вернемся к нерасхождению хромосом в мейозе. Самцы дрозофилы, лишенные Y-хромосомы (XO), стерильны. Исключительные самки (XXY) фертильны. К. Бриджес скрестил таких белоглазых самок с нормальными красноглазыми самцами. В результате от такого скрещивания он получил в F_1 около 4 % самцов с красными глазами среди всех самцов и около 4 % самок с белыми глазами среди всех самок. 96 % самок были красноглазыми, 96 % самцов — белоглазыми. Резко повышенная частота исключительных мух в потомстве этого скрещивания наблюдалась благодаря так называемому *вторичному нерасхождению хромосом* (рис. 5.7), как его назвал К. Бриджес, в отличие от *первичного нерасхождения*, в результате которого и появились исключительные самцы и самки при скрещивании белоглазых (w) и красноглазых (w^+) мух. Цитологический контроль и в этом случае подтвердил справедливость предложенного объяснения.

Вторичное нерасхождение хромосом может достигать и 100 %, если неразшедшиеся хромосомы окажутся физически связанными, как это показала Л. В. Морган в 1922 г. Рecessивная аллель гена у (желтая окраска тела дрозофилы) наследуется

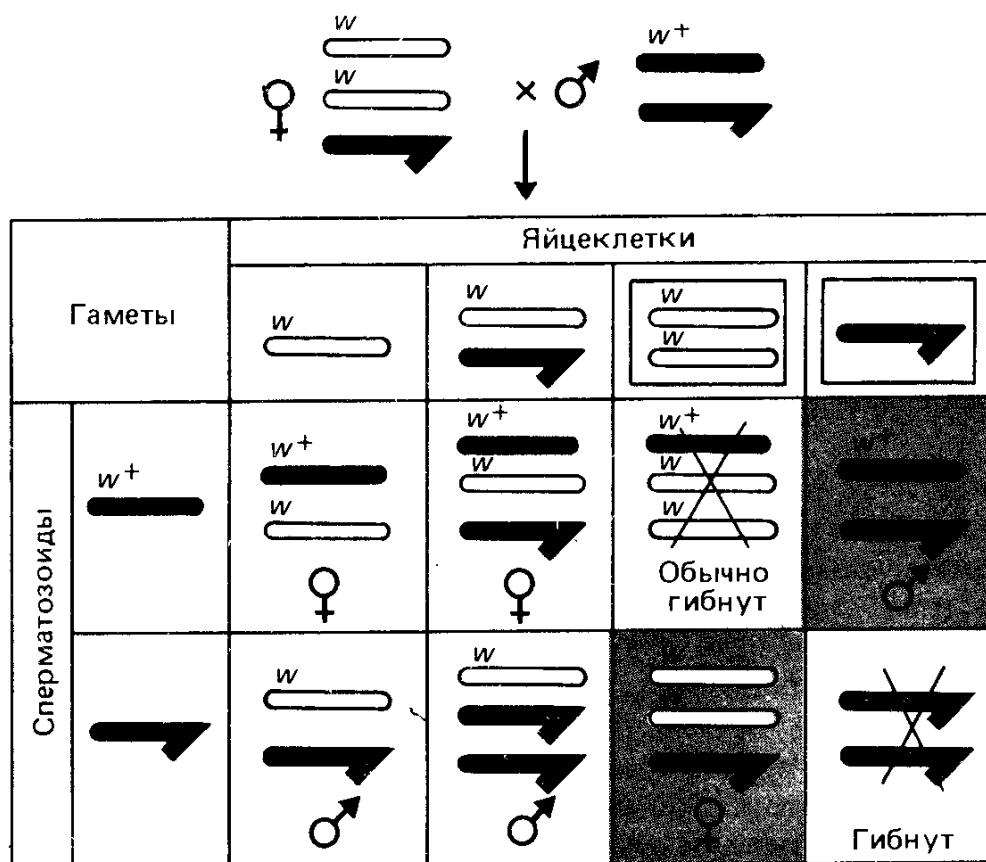


Рис. 5.7. Схема вторичного нерасхождения хромосом (образующиеся при этом гаметы обведены рамкой) при скрещивании исключительной самки (см. рис. 5.5) и нормального самца

сцепленно с полом. Следовательно, ген y , так же как и w , находится в X-хромосоме. Л. В. Морган нашла исключительную — желтую самку в F_1 от скрещивания: $\text{♀} yu \times \text{♂} y^+$. При скрещивании этой самки с нормальными самцами (y^+), имевшими серую окраску тела, все самцы-потомки получили нормальную окраску тела, а все самки были желтыми. Таким образом, крисс-кросс наследования вообще не было. Цитологический контроль показал, что у этих желтых самок-потомков исключительной мухи X-хромосомы сцеплены в районе центромеры (в X-хромосоме она на конце), а также имеется дополнительная Y-хромосома (рис. 5.8). Линия, несущая сцепленные X-хромосомы и гомозиготная по гену y , была названа *double yellow* (двойная желтая). В ней самки получают две свои X-хромосомы непосредственно от матери, а самцы свою единственную X-хромосому — от отца.

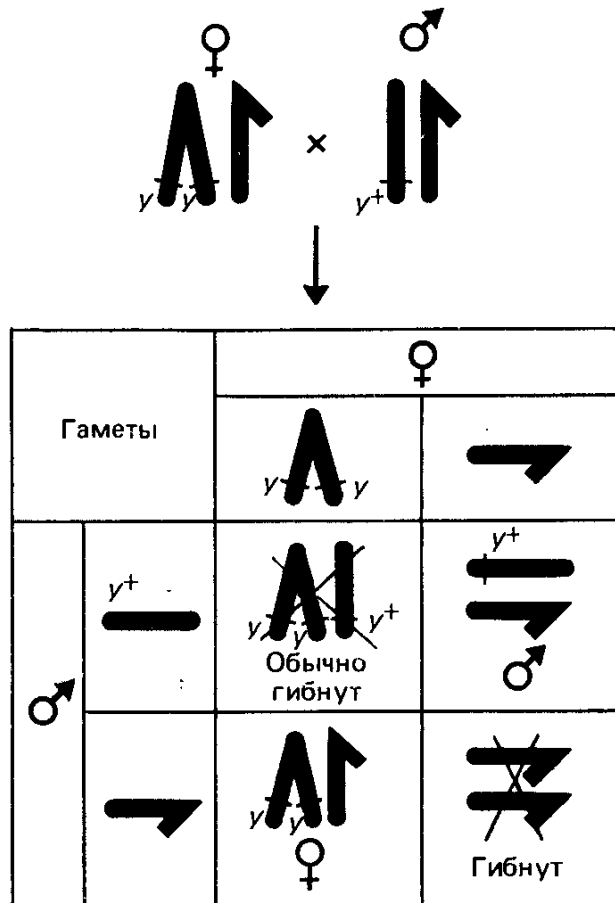


Рис. 5.8. Схема наследования желтой (y) и нормальной окраски (y^+) тела в случае сцепления X-хромосом в линии *double yellow*

5.3. Хромосомное определение пола

В предыдущих разделах было показано, что особи дрозофилы, имеющие структуру по половым хромосомам XO, — самцы, а по половым хромосомам XXU — самки. Однако было бы неправильно считать, что пол у плодовой мушки определяется числом X-хромосом. Как показал К. Бриджес (1922), пол у дрозофилы зависит от соотношения половых (X) хромосом и наборов всех остальных — так называемых *аутосом* (A).

Он обнаружил самок, которые имели по три набора всех хромосом: $3X + 3A$, т. е. были триплоидными. Некоторые из них оказались плодовитыми при скрещивании с нормальными диплоидными самцами ($XU + 2A$). В потомстве от таких скрещиваний были получены мухи с различным числом X-хромосом и аутосом. Исследуя их, К. Бриджес и пришел к заключению, что пол дрозофилы определяется соотношением числа X-хромосом и наборов аутосом. Если это соотношение в зиготе равно 1 ($2X:2A$), из нее развивается самка, если оно равно 0,5 ($1X:2A$), — самец. При этом

Таблица 5.1. Типы хромосомного определения пола у животных

♀	♂	Объект
XX	XY	Человек, дрозофила
XX	XO	Кузнечик
ZW	ZZ	Птицы, бабочки
ZO	ZZ	Моль (<i>Pitheca</i>)

чаются *метасамки*, или *сверхсамки*, которые очень слабы и рано погибают. Если же соотношение $X:A < 0,5$ ($1X:3A = 0,33$), образуются *метасамцы*, или *сверхсамцы*, тоже слабые и рано погибающие.

Хромосомный механизм определения пола животных широко распространен в природе. Различают несколько типов хромосомного определения пола в зависимости от того, какой пол гетерогаметный, а какой — гомогаметный (табл. 5.1). Как было показано, у дрозофилы гомогаметный пол — самки, а гетерогаметный — самцы. Y-хромосома хотя и не определяет пола, но в ней находятся гены фертильности самцов. Самцы XO (где O — отсутствие Y-хромосомы) стерильны.

У человека гомогаметен также женский пол (XX), а гетерогаметен — мужской (XY), однако в этом случае Y-хромосома несет функцию, определяющую пол. В отсутствие Y-хромосомы у человека не развиваются признаки мужского пола (подробнее см. гл. 21).

У птиц и бабочек гомогаметен мужской пол. В этом случае половые хромосомы обозначают ZZ. Гетерогаметный пол — женский (ZW). Гены, находящиеся в X- или Z-хромосомах, обнаруживают характерное, сцепленное с полом наследование, которое было рассмотрено ранее на примере генов *w* и *y* для *D. melanogaster*.

В X-хромосоме дрозофилы известно более 500 генов. Подавляющее большинство из них не имеет аллелей в Y-хромосоме. Известное исключение — ген *bobbed* (*bb*), кодирующий рРНК; аллели этого гена присутствуют в X- и в Y-хромосомах. Существуют также гены, находящиеся только в Y-хромосоме и отсутствующие в X-хромосоме. Это гены фертильности самцов у дрозофилы. Они наследуются *голандрически*, т. е. передаются с Y-хромосомой непосредственно от отца к сыну.

Первые сведения о гетерогаметности мужского и гомогаметности женского пола у растений получены К. Корренсом (1906) для *Bryonia dioica*. Скрещивая женские и мужские растения этого двудомного вида, он получил в F_1 мужское и женское потомство приблизительно в равном соотношении. При опылении обоеполого (однодомного) растения *B. alba* пыльцой *B. dioica* также наблюдалось расщепление по полу 1:1, а в реципрокном скрещивании ($\text{♀} B. dioica \times \text{♂} B. alba$) в F_1 все потомство было представлено женскими растениями. Из этих опытов следует, что мужские рас-

Y-хромосома в определении пола не играет роли. При промежуточном соотношении ($2X:3A = 0,67$) развиваются *интерсексы* — мухи, имеющие промежуточный фенотип — нечто среднее между самцами и самками. При соотношении $X:A > 1$ ($3X:2A = 1,5$) полу-

тения *B. dioica* гетерогаметны, а женские — гомогаметны так же, как однодомные растения *B. alba*. Кроме того, у *B. alba* существует генный контроль однодомности, который здесь обсуждаться не будет.

Хромосомный механизм определения пола у растений был впервые показан для мха *Sphaerocarpus*. Мужские особи этого гаплоидного организма имеют 7 аутосом и одну мелкую Y-хромосому, а женские — 7 аутосом и одну крупную X-хромосому. Диплоидный спорофит *Sphaerocarpus* имеет кариотип $14A + XY$. В результате мейоза образуются тетрады спор, в которых наблюдается расщепление: $2\sigma (7A + Y)$ ($2\text{♀} (7A + X)$).

Хромосомный механизм определения пола у растений подразделяется на два типа: 1) активную роль в определении пола играет Y-хромосома (мужской пол), например у *Rumex acetosella*, *Melandrium alba*; 2) пол определяется балансом аутосом и X-хромосом, при этом Y-хромосома практически инертна, как у *Rumex acetosa*.

В первом случае на примере *M. alba* показано, что женские растения имеют $22A + XX$, а мужские — $22A + XY$. Активную роль Y-хромосомы в определении пола демонстрирует фенотип растений с разным соотношением X- и Y-хромосом. Так, у тетраплоидов $XXXY$ и $XXYY$ пол мужской и только при наличии четырех X-хромосом ($XXXXY$) образуются гермафродитные растения.

X- и Y-хромосомы *Melandrium* имеют общие и различающиеся участки (рис. 5.9), которые условно обозначены римскими цифрами I — V. Y-хромосома состоит из четырех сегментов. При нехватке сегмента I растения образуют гермафродитные цветки, следовательно, этот участок Y-хромосомы подавляет развитие пестика. Если теряются сегменты III — IV, возникает мужская стерильность — пыльца дегенерирует, следовательно, эти участки отвечают за развитие пыльцевых зерен. Участок II, по-видимому, контролирует развитие пыльников. Участок V, находящийся в X-хромосоме, содержит детерминанты женского пола.

У некоторых растений особи YY жизнеспособны, например у *Asparagus*. В этом случае существуют два типа мужских растений: XY и YY. У других растений у особей YY снижена фертильность, например у *Mercurialis annua*, а у некоторых видов показано, что особи YY нежизнеспособны, как, например, у *Carica papaya*.

Таким образом, обычно у растений

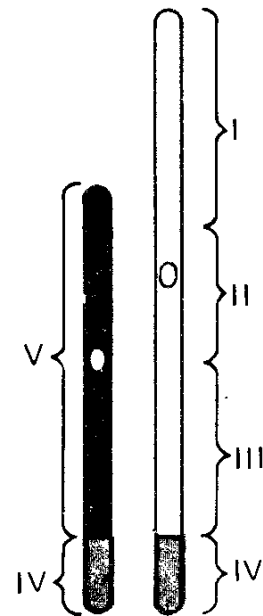


Рис. 5.9. Схематическое изображение X (слева) и Y (справа) хромосом *Melandrium alba* (по М. Westergaard, 1948). Гомологичные сегменты показаны одинаковым цветом. I — V — условные обозначения участков хромосом. Пояснения в тексте

гетерогаметен мужской пол — по типу XY, механизм XO у них не описан. Женский пол, как правило, гомогаметен (XX), за исключением земляники (*Fragaria*) и некоторых других видов.

У части животных (пчел, муравьев, ос) существует особый тип определения пола, названный гапло-диплоидным. У этих животных нет половых хромосом. Самки развиваются из оплодотворенных яиц и диплоидны, а самцы — из неоплодотворенных яиц и гаплоидны. При сперматогенезе число хромосом не редуцируется.

Существуют и другие способы определения пола в зависимости от условий развития оплодотворенных яиц, не связанные с хромосомными механизмами (подробнее см. гл. 17).

5.4. Нарушение закона независимого наследования признаков

Согласно хромосомной гипотезе наследственности закон независимого наследования признаков Г. Менделя отражает независимость расхождения негомологичных хромосом в анафазе I мейоза. Однако в начале XX в. У. Сэттон обратил внимание на то, что число признаков, различия по которым обнаруживают моногибридное наследование, может значительно превосходить число хромосом гаплоидного набора у исследуемого объекта. Особенно показательно это для видов с небольшим числом хромосом. Например, у гороха $n = 7$, у ржи — также 7, у растения гаплопаппус $n = 2$, у дрозофилы — 4, у аскариды — 1 и т. д.

У. Сэттон полагал, что в таком случае каждая хромосома должна быть детерминантом не одного, а нескольких элементарных признаков. Если такое предположение справедливо, то должны встречаться случаи, когда разные менделевские факторы (или аллели разных генов) будут наследоваться совместно. При этом невозможна их рекомбинация в мейозе.

Действительно, пример нарушения закона независимого комбинирования признаков был вскоре (1906) обнаружен У. Бэтсоном и Р. Пеннетом в работе с душистым горошком — *Lathyrus odoratus*. Эти авторы изучали наследование следующих признаков: окраску цветка — пурпурная (P) или красная (p) и форму пыльцевых зерен — удлинённая (L) или круглая (l). При скрещивании растений с пурпурными цветками и удлинённой пылью ($PPLL$) и растений с красными цветками и круглой пылью ($ppll$) в F_1 были получены растения с пурпурными цветками и удлинённой пылью ($PpLl$).

Эти гибриды F_1 в результате самоопыления дали следующее расщепление в F_2 :

пурпурные цветки, удлинённая пыль ($P— L—$) — 4831 (69,5 %);

пурпурные цветки, круглая пыль ($P— ll$) — 390 (5,6 %);

красные цветки, удлинённая пыль ($ppL—$) — 393 (5,6 %);

красные цветки, круглая пыль ($ppll$) — 1338 (19,3 %).

Как видно, при расщеплении получены все четыре ожидаемых фенотипических класса, но вовсе не в соотношении 9:3:3:1, характерном для дигибридного скрещивания при независимом наследовании признаков.

В 1919 г. Дж. Холдэйн подсчитал, что такое расщепление может получиться, если четыре типа гамет у гибридов F_1 будут образовываться не с одинаковой частотой, а в следующем соотношении: $0,44PL:0,06Pl:0,06pL:0,44pl$.

Следовательно, родительские сочетания аллелей исследованных генов PL и pl предпочтительно попадают в одни и те же гаметы, в то время как их новые рекомбинантные сочетания (pL и PL) встречаются гораздо реже. Это явление в дальнейшем получило название *сцепления генов*. Однако в отличие от того, что предсказывал У. Сэттон, сцепление оказалось не полным, а частичным.

5.5. Сцепление и кроссинговер

В дальнейшем Т. Х. Морган и его сотрудники в экспериментах с *D. melanogaster* обнаружили большое число примеров сцепления генов и показали, что это сцепление, как правило, неполное.

Рассмотрим один из первых экспериментов Т. Х. Моргана по изучению сцепленного наследования.

У дрозофилы известны мутантные формы, отличающиеся от мух дикого типа черной окраской тела. Это признак рецессивный по отношению к признаку нормальной серой окраски. Ген, контролирующий черную окраску тела, называется *black* и обозначается b . Его доминантная аллель — b^+ .

Существует также рецессивный ген *vestigial* (vg), который в гомозиготном состоянии приводит к недоразвитию крыльев (зачаточные крылья). Его доминантная аллель (vg^+) контролирует нормальное развитие крыльев.

При скрещивании мух $b b vg vg \times b^+ b^+ vg^+ vg^+$ в F_1 были получены особи, дигетерозиготные по этим генам. Все они были нормальными по обоим признакам в соответствии с правилом доминирования и законом единообразия F_1 . Далее были проведены два типа анализирующих скрещиваний. В первом из них брали самцов F_1 и скрещивали с гомозиготными самками $b b vg vg$, а во втором — девственных самок, отобранных в F_1 , скрещивали с самцами $b b vg vg$. Результаты этих анализирующих скрещиваний оказались неодинаковыми (рис. 5.10, А). В F_2 (потомство от анализирующего скрещивания) в первом случае были получены мухи только двух типов независимо от пола: 50 % мух имели черное тело и зачаточные крылья и 50 % были нормальными по обоим признакам. Учитывая, что расщепление в анализирующем скрещивании отражает соотношение типов гамет, продуцируемых особями F_1 , следует заключить, что самцы F_1 , использованные при первом скрещивании, формировали гаметы только двух типов — с родительскими сочетаниями аллелей $b vg$ и $b^+ vg^+$ (рис. 5.10, А). Следова-

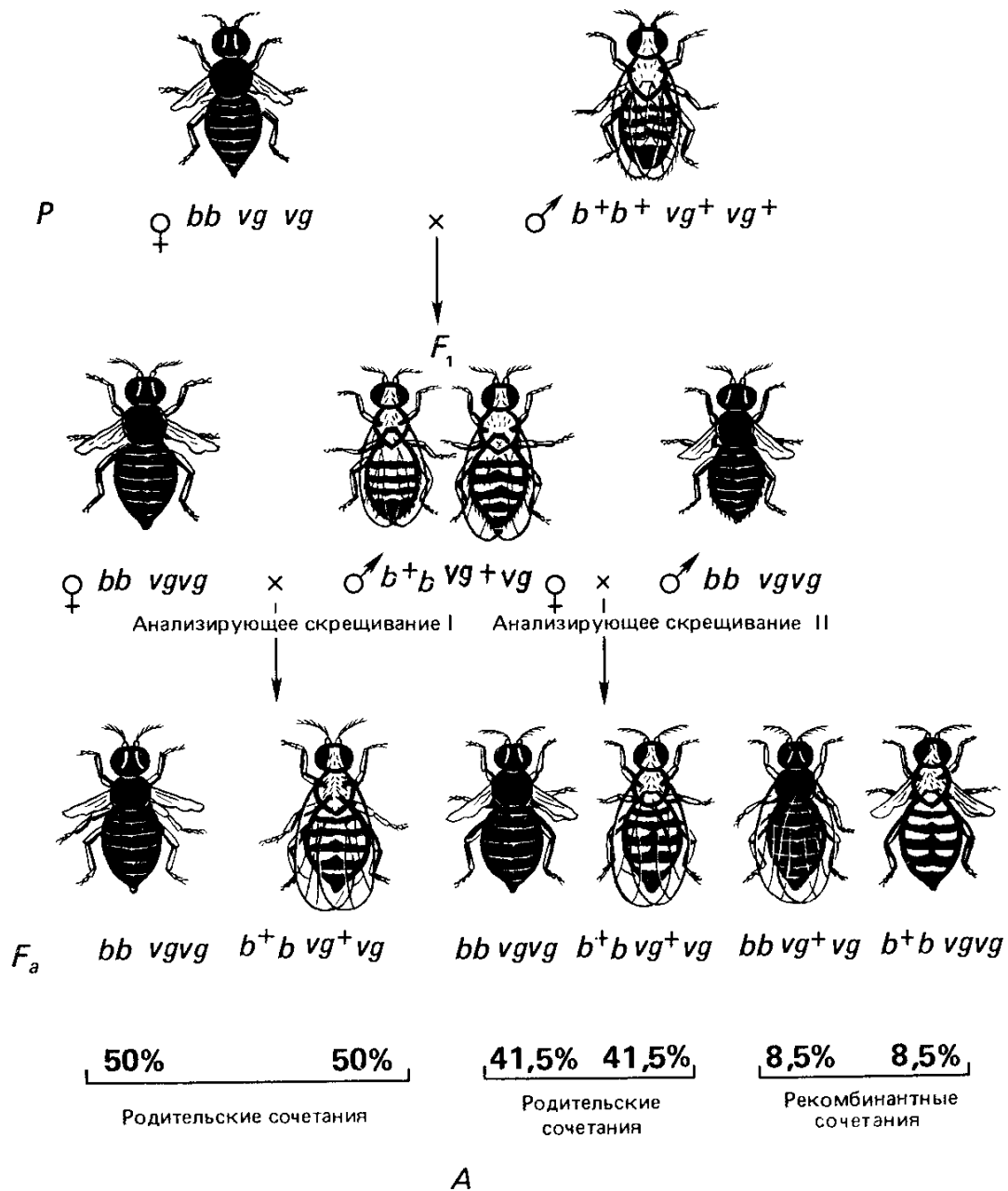
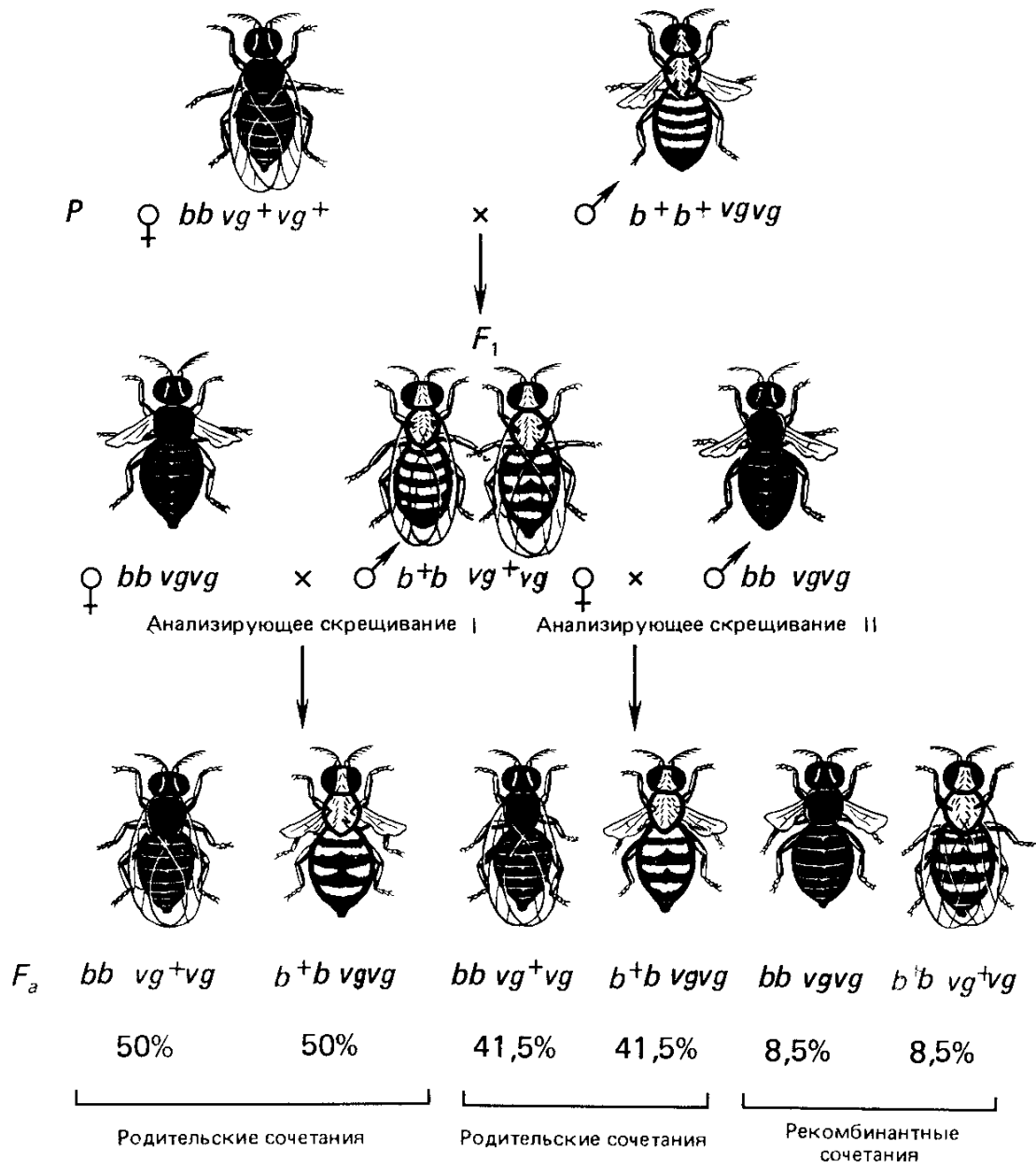


Рис. 5.10. Появление родительских и рекомбинантных сочетаний генов (и и развитию крыльев. А — доминантные аллели обоих генов у одного родителя; аллели дру

тельно, в 100 % случаев образовывались гаметы только с родительскими сочетаниями исследованных генов.

При втором скрещивании в F_2 появились все возможные четыре типа потомков, а следовательно, самки F_1 давали четыре типа гамет: $b vg$, $b^+ vg$, $b vg^+$ и $b^+ vg^+$. Однако, как явствовало из расщепления в F_2 от этого скрещивания, четыре типа гамет образовались не равновероятно. Независимо от пола мухи распределились следующим образом: 41,5 % черных с зачаточными крыльями; 41,5 % нормальных по окраске и с нормальными крыльями; 8,5 % черных с нормальными крыльями; 8,5 % нормальных по окраске с зачаточными крыльями. Таким образом, *родительские сочетания* $b vg$ и $b^+ vg^+$ образовались в 83 % случаев, а новые



Б

признаков) при скрещивании дрозофил, различающихся по окраске тела
 Б — каждый из родителей имеет доминантные аллели одного и рецессивные
 того гена

комбинации — рекомбинантные сочетания $b\ vg^+$ и $b^+\ vg$ (рис. 5.10, А) — в 17 % случаев.

В другом эксперименте в качестве родителей были использованы мухи, обладающие теми же признаками, но в другом сочетании: мух с черным телом и нормальными крыльями скрещивали с мухами с нормальной окраской тела и с зачаточными крыльями. Затем вновь провели два типа анализирующих скрещиваний. В первом использовали самцов F_1 , во втором — самок F_1 . В обоих случаях их скрещивали с двойным гомозиготным рецессивом $bb\ vgvg$. И вновь были получены такие же результаты в отношении родительских и рекомбинантных сочетаний признаков в F_2 (рис. 5.10, Б). Если из F_1 брали самцов, то наблюдали только

родительские комбинации признаков, а если из F_1 брали самок, то появлялись родительские (83 %) и рекомбинантные (17 %) сочетания признаков в тех же соотношениях, что и в первом эксперименте, результаты которого представлены на рис. 5.10, А.

В обоих экспериментах наблюдается полное сцепление генов b и vg , если для анализирующего скрещивания берутся самцы F_1 . Если же для анализирующего скрещивания использовали самок F_1 , то сцепление было частичным.

Т. Х. Морган дал следующее объяснение этим результатам. В первом эксперименте гены b и vg находятся в одной хромосоме, т. е. дигетерозиготные особи F_1 несут в одном гомологе аллели b и vg , а в другом гомологе — b^+ и vg^+ (рис. 5.10, А); во втором эксперименте b и vg^+ в одном, а b^+ и vg в другом гомологе (рис. 5.10, Б).

У самцов дрозофилы кроссинговер вообще не происходит, поэтому гены, локализованные в одной хромосоме (или, говоря более строго, в одной паре хромосом), обнаруживают абсолютное сцепление, если при скрещивании используют дигетерозиготных самцов. В мейозе у дигетерозиготных самок дрозофилы F_1 возможен обмен гомологичными участками гомологичных хромосом между локусами, в которых находятся гены b и vg . Такие обмены, или *кроссинговер* (от англ. *crossingover* — перекрест), приводят к новому рекомбинантному сочетанию аллелей генов b и vg в гомологичных хромосомах, которые затем расходятся к разным полюсам. Эти обмены происходят с вероятностью 17 % и в итоге дают два класса реципрокных рекомбинантных сочетаний, или рекомбинантов с равной вероятностью — по 8,5 % (рис. 5.11).

Сходным образом объясняется и результат, полученный ранее У. Бэтсоном и Р. Пеннетом: гены, контролирующие окраску цветков (p) и форму пыльцевого зерна (l) у душистого горошка, локализованы в одной паре гомологичных хромосом, и между ними возможен кроссинговер.

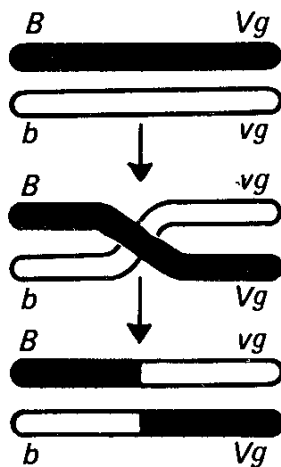


Рис. 5.11. Упрощенная схема обмена между гомологичными хромосомами, различающимися по аллелям генов b и vg

Сотрудник Т. Х. Моргана А. Стертевант предположил, что частота кроссинговера на участке между генами, локализованными в одной хромосоме, может служить мерой расстояния, на котором они находятся друг от друга. Тогда можно использовать частоту кроссинговера для того, чтобы определять взаимное расположение генов и расстояние между ними.

В качестве подтверждения справедливости этого положения можно в общем виде рассмотреть результаты тригибридного скрещивания, в котором родительские формы дрозофилы различаются по уже известным нам генам b и vg , а также дополнительно по гену pr , проявляющему

сцепление с *b* и *vg*. Рецессивная аллель *pr* (purple — пурпурный) в гомозиготном состоянии обуславливает ярко-красную окраску глаз, нормальная доминантная аллель *pr*⁺ — темно-красный цвет глаз.

При анализирующем скрещивании потомки расщепляются на 8 классов (рис. 5.12): 2 класса нерекомбинантных (I и II) и 6 классов потомков, рекомбинантных по всем генам (III — VIII).

Далее необходимо определить частоту кроссинговера между всеми тремя генами попарно. Для этого суммируют всех мух, рекомбинантных по генам *b* и *pr*: классы III, IV, VII, VIII (рис. 5.12). Полученное число делят на общее число исследованных потомков в *F*₂. Аналогично определяют частоту рекомбинации (кроссинговера) между *pr* и *vg* (при этом суммируют классы V, VI, VII, VIII) и частоту рекомбинации между *b* и *vg* (суммируют классы III, IV, V, VI).

Экспериментально установленные частоты рекомбинации между тремя генами попарно можно представить следующим образом: *b* — *pr* — 6 %; *pr* — *vg* — 12 %; *b* — *vg* — 17 %.

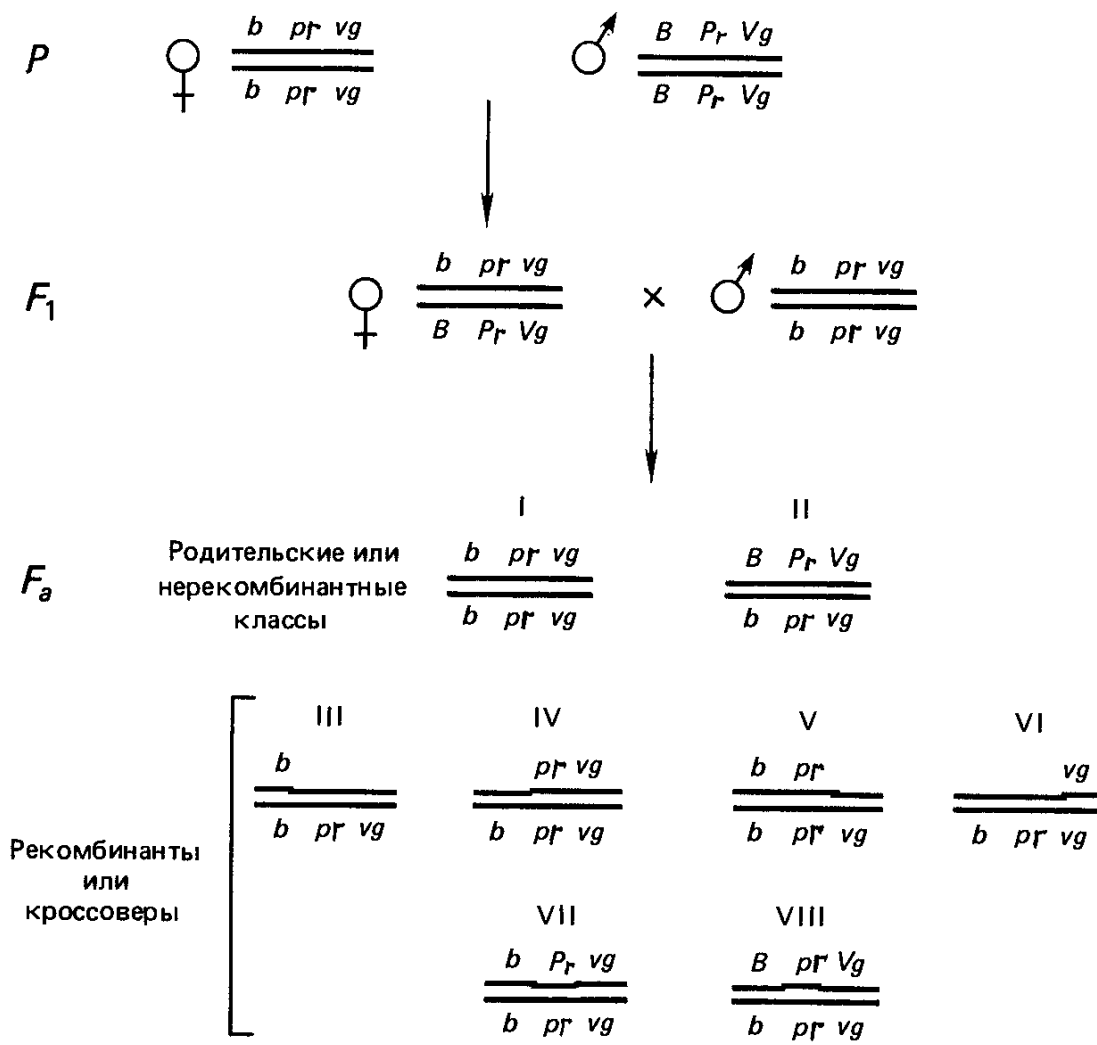


Рис. 5.12. Схема тригибридного скрещивания и образование рекомбинантных и нерекомбинантных классов потомства при анализирующем скрещивании у *D. melanogaster*. I — VIII — классы потомства в расщеплении, соответствующие типам гамет, образуемых самками *F*₁

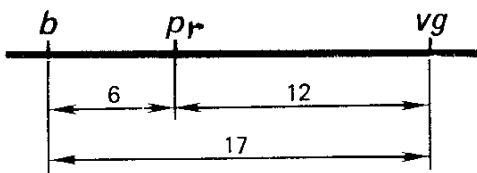


Рис. 5.13. Линейное расположение генов *b*, *pr*, *vg* на основании частот рекомбинации (кроссинговера)

На основе этих данных, пользуясь *правилом аддитивности*, можно расположить три гена в линейной последовательности. Наиболее удалены друг от друга гены *b* и *vg*, а между ними локализован ген *pr*. Сумма частот его рекомбинации с генами *b* и *vg* приблизительно равна частоте рекомбинации между *b* и *vg*. Таким

образом, строится простейшая карта группы сцепления (рис. 5.13).

В строгом смысле *группой сцепления называют группу генов, проявляющих сцепленное наследование*. Поскольку известно, что такое наследование отражает локализацию генов в одной хромосоме, обычно *под группой сцепления понимают группу генов, расположенных в одной хромосоме*.

Далее будет показано, что даже гены, расположенные в одной хромосоме, не всегда обнаруживают сцепление. Генетическое расстояние, на котором кроссинговер происходит с вероятностью 1 %, представляет собой сантиморган (сМ) — единицу измерения, названную в честь Т. Х. Моргана.

5.6. Интерференция

Так же, как в рассмотренном случае, сумма меньших частот рекомбинации (генетических расстояний) чаще всего превышает частоту рекомбинации между наиболее удаленными друг от друга маркерами. Это объясняется тем, что между любыми двумя сцепленными генами возможен не только одиночный, но и *двойной* (а также множественный) *кроссинговер*, что приводит к сокращению регистрируемой частоты кроссинговера. Действительно, если бы в рассмотренном примере (рис. 5.12) между генами *b* и *vg* не было бы маркера *pr*, то *b (pr⁺) vg* и *b⁺ (pr) vg⁺* воспринимались бы как некроссоверные состояния *b vg* и *b⁺ vg⁺*. Таким образом, двойные обмены сокращают регистрируемое расстояние между генами.

Вместе с тем между обменами на соседних участках хромосом существует взаимовлияние, названное *интерференцией*. Такое взаимовлияние можно выразить количественно. Для этого сопоставляют реально наблюдаемую частоту двойных обменов с частотой, теоретически ожидаемой на основе предположения о том, что обмены на соседних участках происходят независимо друг от друга. Степень и характер интерференции измеряется величиной коинциденции (С). Коинциденцию оценивают как частное от деления реально наблюдаемой частоты двойных кроссоверов на теоретически ожидаемую частоту двойных кроссоверов. Последнюю величину получают, перемножая частоты кроссинговера на соседних участках.

Вычислим коинциденцию на конкретном примере, пользуясь данными Т. Х. Моргана и А. Стертаванта, которые при тригибридном скрещивании изучали рекомбинацию между генами *у*, *w* и *т*,

локализованными в X-хромосоме *D. melanogaster*. Фенотипическое проявление генов *u* и *w* уже описывалось. Рецессивная аллель гена *m* приводит к уменьшению размера крыльев. Частота рекомбинации между *u* и *w* 1,3 %, а между *w* и *m* 32,6 %. Двойные рекомбинанты по *u — w — m* наблюдались с частотой 0,045 %. На основе этих данных величина коинциденции

$$C = \frac{0,00045}{0,013 \times 0,326} = \frac{0,00045}{0,00424} \leq 1.$$

Величину интерференции (*I*) определяют по формуле

$$I = 1 - C.$$

Если $C < 1$, то *интерференция положительная*, т. е. одиночный обмен препятствует обмену на соседнем участке хромосомы. Если $C > 1$, то *интерференция отрицательная*, т. е. один обмен как бы стимулирует дополнительные обмены на соседних участках. В действительности существует только положительная интерференция при реципрокной рекомбинации — кроссинговере, а кажущееся неслучайным совпадение двух и более обменов, характерное для очень коротких расстояний, — результат нереципрокных событий при рекомбинации (см. гл. 7).

Таким образом, при картировании генов в группах сцепления на основе изучения частот рекомбинации необходимо учитывать две противоположные тенденции. Двойные обмены «сокращают» расстояния между генами, а интерференция препятствует множественным обменам, вероятность которых увеличивается с расстоянием. Как показал для дрозофилы Г. Меллер, на больших расстояниях (около 35 % рекомбинации) интерференция исчезает. Следовательно, наиболее точные данные о частоте кроссинговера можно получить только на достаточно коротких расстояниях — приблизительно до 10 сМ.

В обобщенном виде зависимость частоты рекомбинации от реального расстояния с учетом множественных обменов описывает функция Дж. Холдэйна:

$$rf(d) = \frac{1}{2}(1 - e^{-2d}),$$

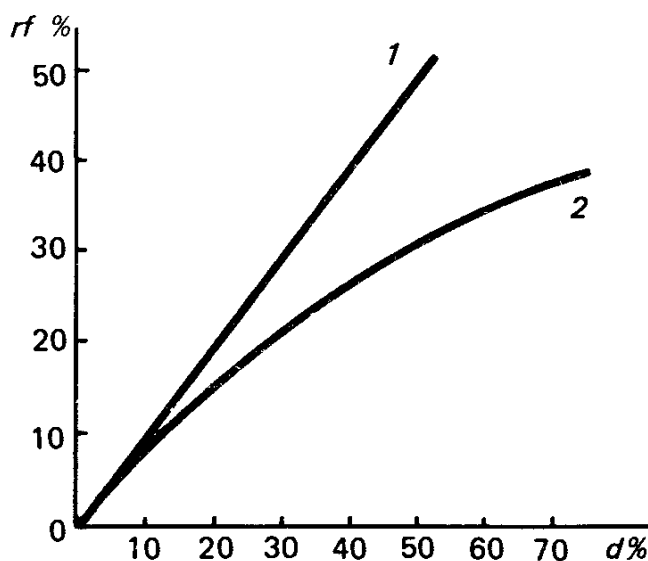


Рис. 5.14. Картирующие функции (по В. В. Кушеву, 1971):

1 — линия, описываемая функцией А. Стертеванта ($rf = d$), 2 — кривая, описываемая функцией

Дж. Холдэйна [$rf = \frac{1}{2}(1 - e^{-2d})$]

где rf — картирующая функция (в нашем случае — это частота учитываемых кроссинговеров), d — реальное расстояние, на котором происходят обмены, e — основание натурального логарифма.

Кривая, описываемая функцией Холдэйна, показана на рис. 5.14 в сопоставлении с прямой зависимостью частоты регистрируемых обменов от расстояния (как это рассматривал А. Стертевант). Функция Холдэйна показывает, что с увеличением рас-

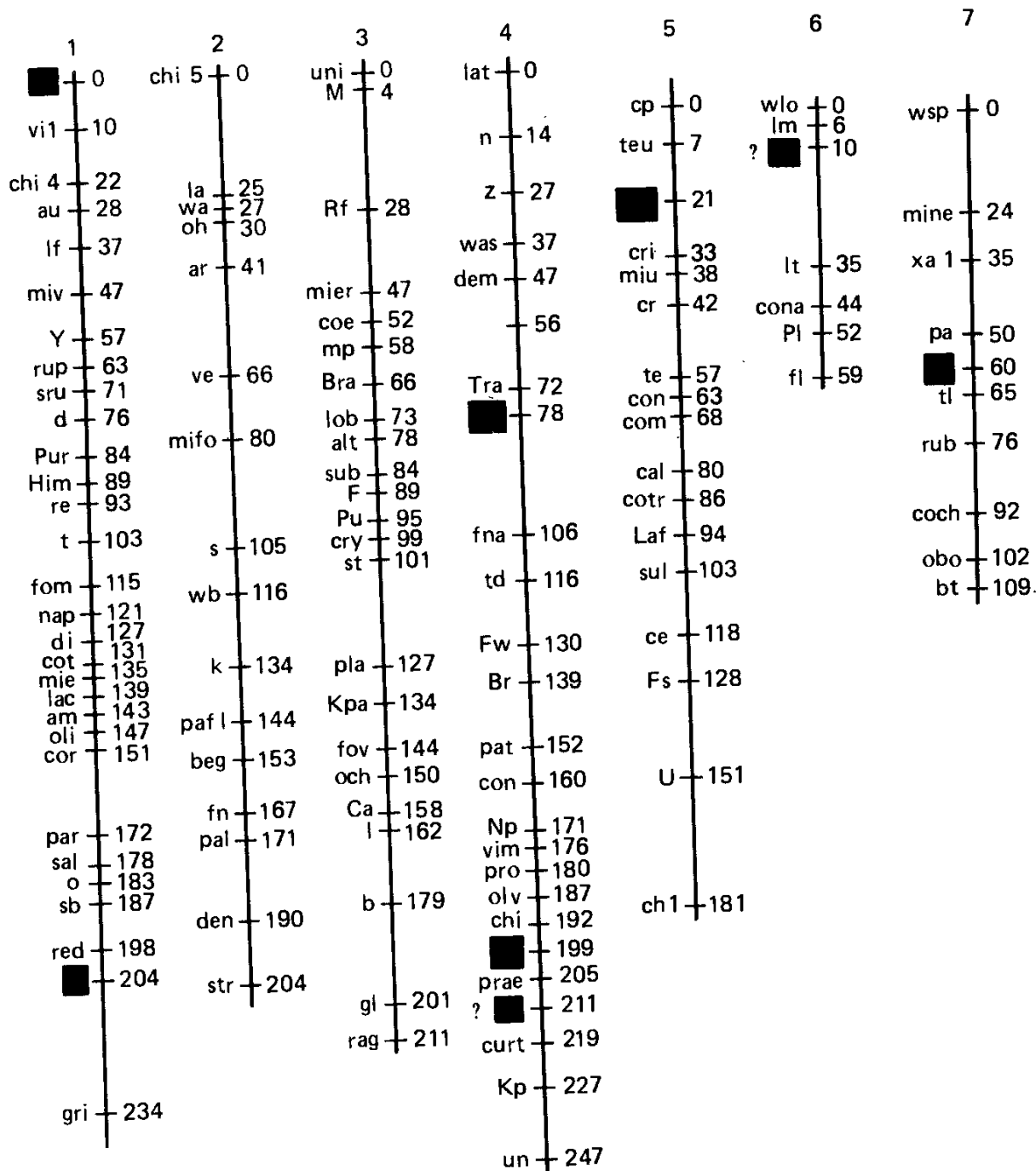


Рис. 5.15. Карты групп сцепления гороха (*Pisum sativum*) (по И. А. Захарову, «Генетические карты высших организмов», 1979. Там же см. расшифровку генетических символов).

Отмечены гены, различия по которым изучал в своей работе Г. Мендель (см. табл. 2.1). Вопрос означает, что признак сахарного боба контролируют два полимерных гена: p и v . С каким из них работал Г. Мендель, неизвестно, поскольку он исследовал не все возможные комбинации признаков. Цифры — расстояния генов от конца хромосомы

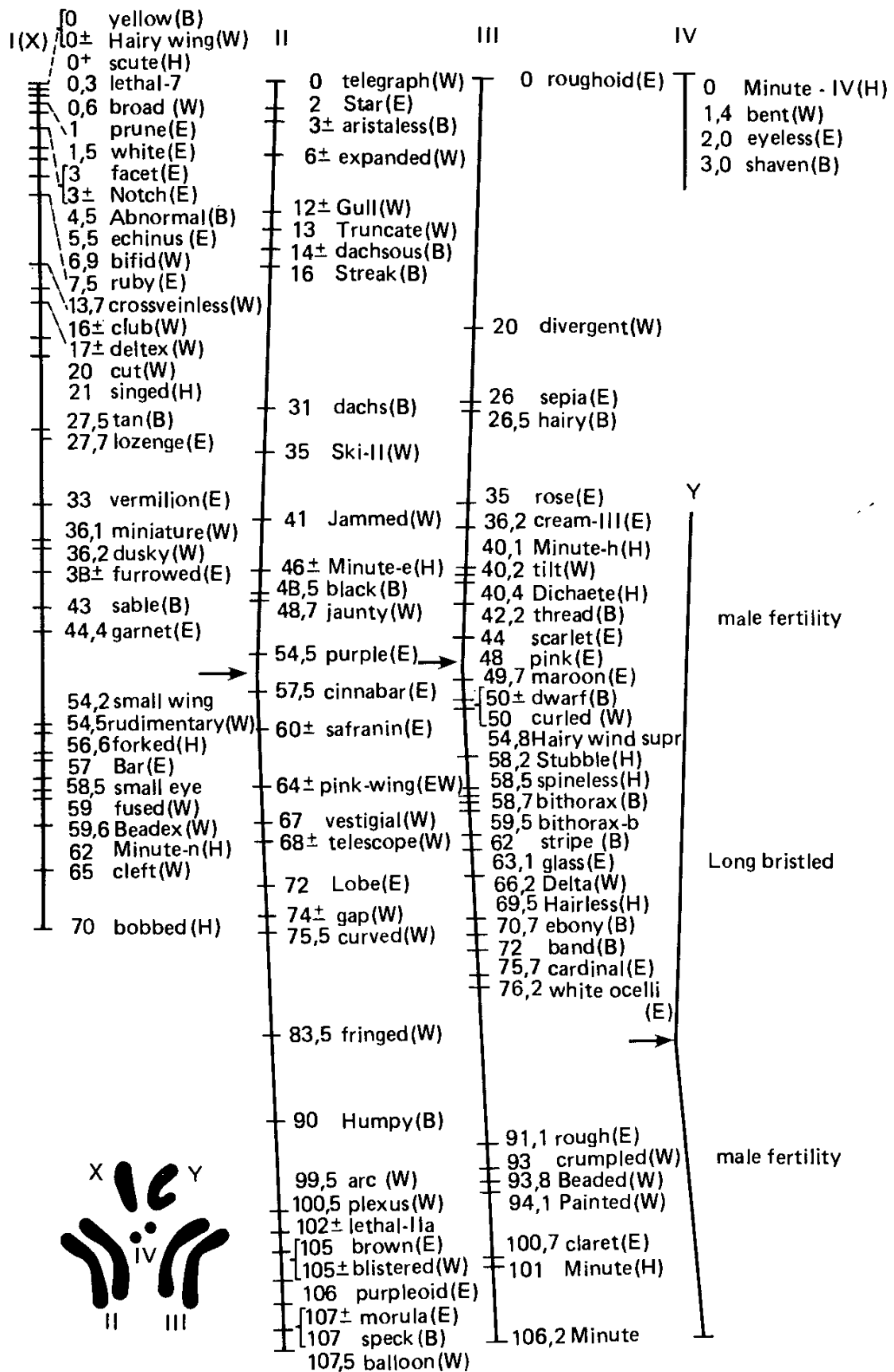


Рис. 5.16. Карты групп сцепления *D. melanogaster*

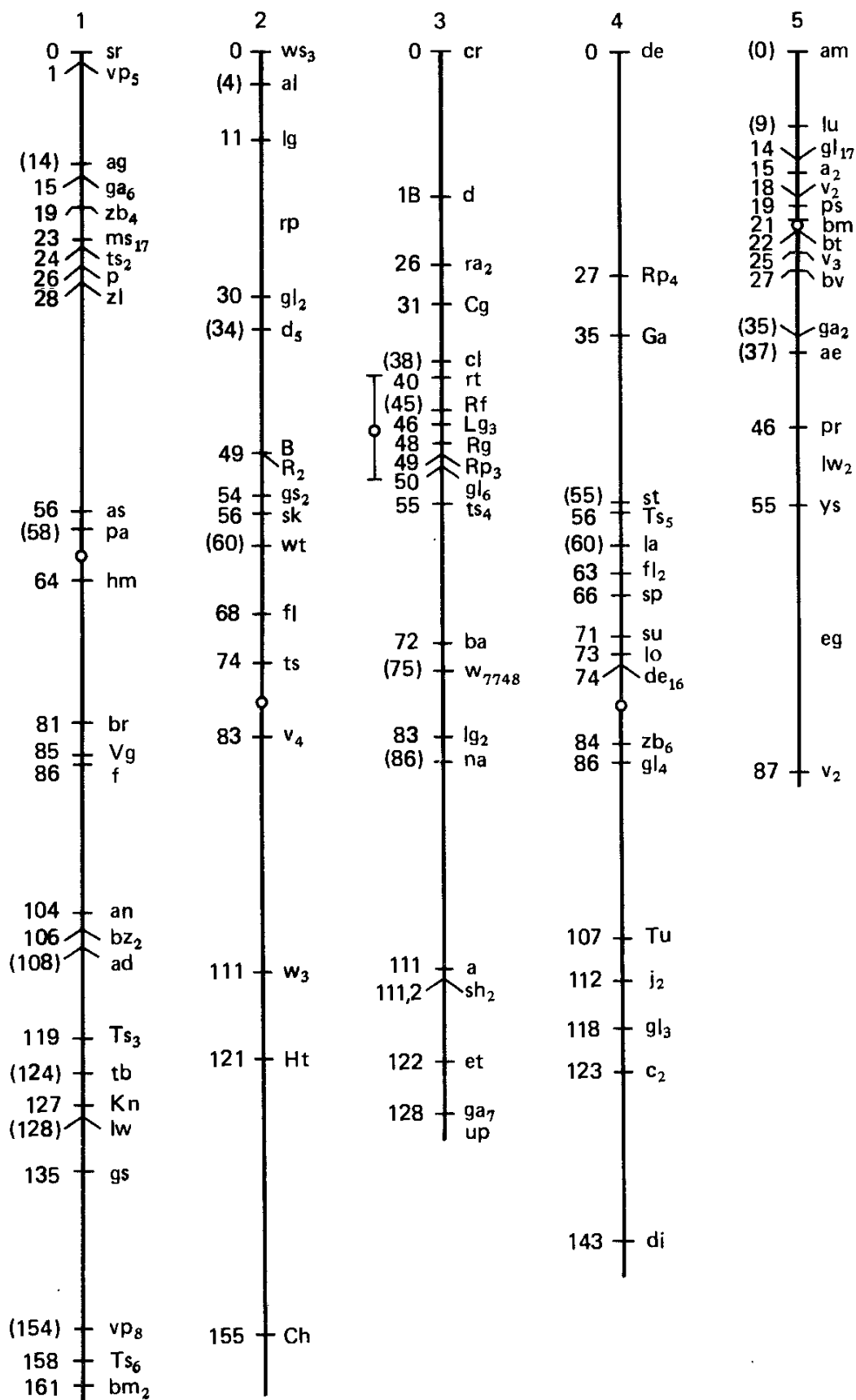
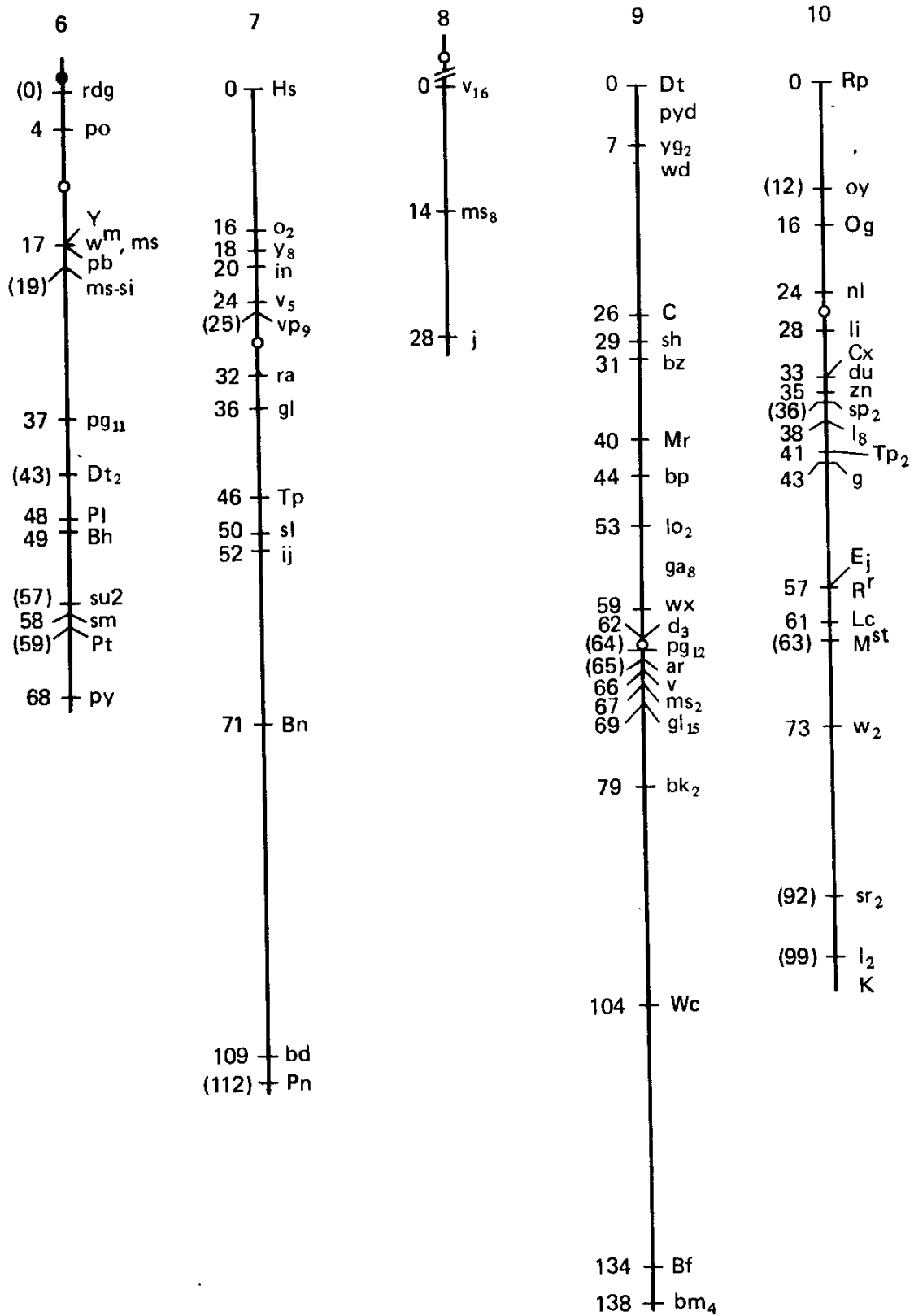


Рис. 5.17. Карты групп сцепления кукурузы (*Zea mays*) (по И. А. Захарову «Генетические карты высших организмов», 1979. Там же см. расшифровку генетических символов):

1—10 — номера хромосом. Вертикальный ряд цифр — расстояния генов от конца хромосомы. Светлые кружки — центромеры, темный — ядрышковый организатор



Продолжение рис. 5.17

стояния rf приближается к 0,5. Реально это означает, что между генами, расположенными далеко друг от друга, выявляется около 50 единиц рекомбинации. Такую же частоту рекомбинации демонстрируют и гены, находящиеся в разных хромосомах. Таким образом, практически невозможно уловить сцепления между столь удаленными друг от друга генами. Эти гены, хотя и сцеплены физически, находясь в одной хромосоме, будут наследоваться независимо.

Как теперь хорошо известно, некоторые гены, контролирующие 7 признаков гороха, исследованные Г. Менделем, сцеплены, однако расположены на большом расстоянии друг от друга. В частности, гены a (окраска цветков и семенной кожуры) и i (окраска семян) принадлежат к одной и той же группе сцепления, но расстояние между ними около 200 сМ (рис. 5.15). В опытах Менделя эти гены наследовались независимо. При скрещивании: $AAII \times aaii$ в F_2 было получено расщепление $357 A - I - : 132 A - ii : 116 aaI - : 34 aaii$, которое хорошо соответствует теоретически ожидаемому при независимом наследовании ($360 : 120 : 120 : 40$; $\chi^2 = 2,258$; $p > 0,05$) (см. гл. 2.2).

5.7. Хромосомы и группы сцепления

Линейное расположение генов в группах сцепления послужило еще одним аргументом в пользу хромосомной теории наследственности. Хромосомы — тоже линейные структуры. В настоящее время карты групп сцепления построены для многих генетических объектов: насекомых (несколько видов дрозофилы, комнатная муха, комар, шелкопряд, таракан и др.); млекопитающих (человек, мышь, крыса, кролик); птиц (курица), многих растений (кукуруза, пшеница, ячмень, рис, томаты, горох, хлопчатник и др.), а также для микроорганизмов: грибов (дрожжи, аспергилл, нейроспора и др.), водорослей (хламидомонада), бактерий (кишечная палочка, сальмонелла и др.), для многих вирусов эукариот и бактериофагов.

Карты групп сцепления некоторых организмов представлены на рис. 5.15—5.17. У объектов, хорошо изученных в цитологическом и генетическом отношении, число групп сцепления и гаплоидное число хромосом совпадают.

Особенно наглядно это показано для *D. melanogaster*. У плодовой мушки кариотип составляют три пары крупных хромосом: X- или 1, 2 и 3 и пара микрохромосом 4 (см. рис. 5.3). В соответствии с этим и группы сцепления представлены тремя длинными: 72 (1); 108 (2); 106 (3) сМ и одной короткой — около 3 сМ (4).

Несмотря на то что между сцепленными генами регистрируемая частота кроссинговера не может быть больше 50 %, длина групп сцепления может превышать и 50 и даже 100 %, как у *D. melanogaster*. В этом нет ничего удивительного, поскольку

общая длина групп сцепления составляется благодаря суммированию коротких расстояний, непосредственно определяемых в опыте.

Таким образом, сравнение числа групп сцепления и числа хромосом в гаплоидном наборе также подтверждает хромосомную теорию.

«Даже если бы хромосомы никогда нельзя было видеть, генетическое сцепление потребовало бы их изобрести. Линейное расположение генов в хромосомных группах и явления кроссинговера и структурных изменений — все это может быть выведено логическим путем», — писал в 1955 г. известный английский генетик К. Мазер. У многих объектов хромосомы хорошо различимы в световой микроскоп, и сопоставление цитологических и генетических карт, или карт групп сцепления, еще раз подтвердило хромосомную теорию. Такое сопоставление удобнее всего для объектов, у которых наиболее четко различима продольная дифференцировка хромосом по хромомерному строению, как это видно в пахитене у кукурузы. Очень удобны для этой цели гигантские хромосомы дрозофилы (см. стр. 68), на которых очень хорошо различимы диски гетерохроматина и междисковые участки — эухроматин.

У дрозофилы известно большое число хромосомных перестроек, например делеций, приводящих к физической утрате целых участков хромосом, а с ними и доминантных аллелей тех генов, которые в них локализованы. Концы делеций можно локализовать на цитологической карте гигантских хромосом. При объединении в гетерозиготе какой-либо рецессивной аллели в одной из гомологичных хромосом и делеции — в другой получится гемизиготное состояние, в котором проявится рецессивная аллель. Проведя серию таких скрещиваний, можно достаточно точно локализовать соответствующий ген на цитологической карте. Для тех же целей используют и транслокации — перенос фрагмента одной хромосомы на другую, например с X- на Y-хромосому. Определяя цитологически точку разрыва при транслокации и наблюдая изменение характера наследования генов, можно локализовать их на цитологической карте.

Работа по сопоставлению генетических и цитологических карт дрозофилы, предпринятая в 30-х годах в лаборатории Т. Х. Морганна Ф. Г. Добжанским, показала, что те и другие карты колинеарны, т. е. их элементы параллельно чередуются: определенные диски гигантских хромосом и гены в группах сцепления. Большинство генов располагается в участках эухроматина. Y-хромосома, как известно, бедная генами, почти целиком состоит из гетерохроматина.

Цитологическая и генетическая карты для X-хромосомы *D. melanogaster* сопоставлены на рис. 5.18. Общее соотношение генетических и цитологических расстояний для трех больших хромосом дрозофилы показано на рис. 5.19. Из этого сопоставления видно, что частота кроссинговера на разных участках хромосом неодинакова на единицу физической длины. Обычно кроссинговер

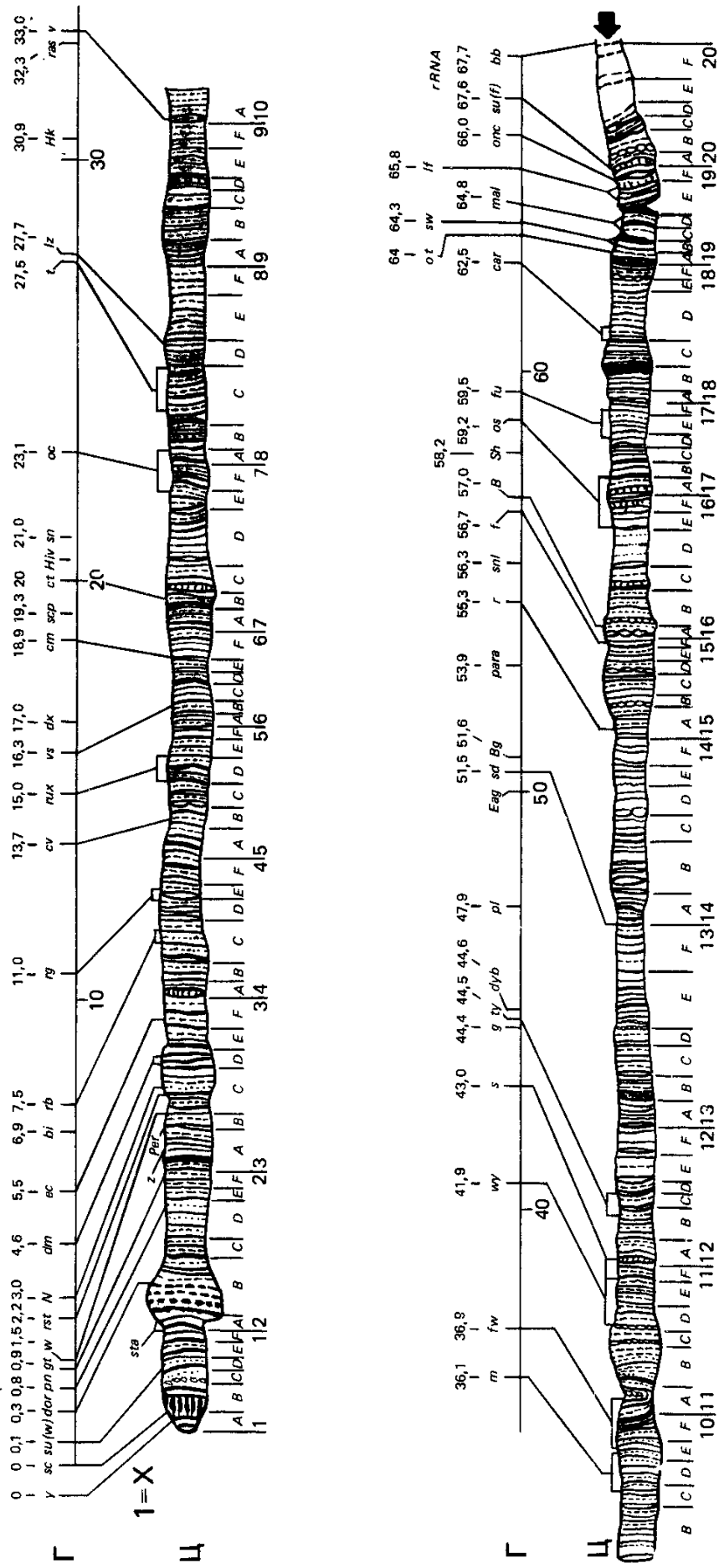


Рис. 5.18. Составление цитологической и генетической карт для X-хромосомы *D. melanogaster* (по И. А. Захарову. «Генетические карты высших организмов», 1979).

Г — генетическая карта: обозначены символы генов, над ними — расстояния (в cM) от конца группы сцепления. Ц — цитологическая карта, под которой — стандартные обозначения участков. Стрелка указывает на центромеру

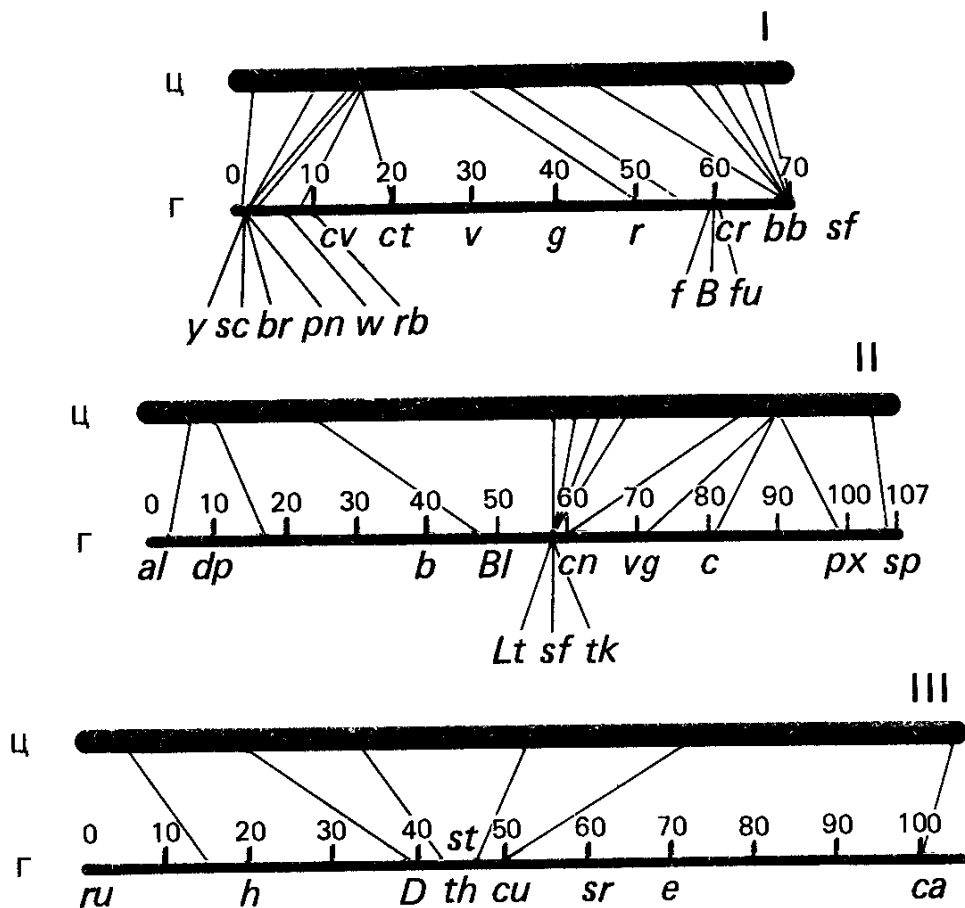


Рис. 5.19. Сравнение относительных размеров соответствующих друг другу участков цитологических (Ц) и генетических (Г) карт больших хромосом (I, II, III) *D. melanogaster* (из М. Е. Лобашева, 1967)

затруднен в гетерохроматиновых районах, например около центромер. Поэтому на таких участках наблюдается «сужение» генетической карты.

В настоящей главе изложены основные факты, создавшие фундамент хромосомной теории наследственности. Они были установлены при исследовании таких проблем, как хромосомный механизм определения пола, наследование признаков, сцепленных с полом, сцепление генов и кроссинговер, на основе построения генетических карт и сопоставления генетических карт (карт групп сцепления) с цитологическими картами хромосом. В итоге были получены исчерпывающие доказательства локализации конкретных генов в конкретных участках отдельных хромосом у многих растений, животных и микроорганизмов. Все развитие генетики опирается на хромосомную теорию, и все последующие достижения генетики развивают эту теорию.

Вопросы к главе 5

1. Что такое группа сцепления?
2. Какие факты, полученные при изучении сцепления и кроссинговера между генами, подтверждают хромосомную теорию наследственности?

3. Какой пол будет у дрозофил, имеющих следующие наборы хромосом: $3X + 3A$, $3X + 2A$, $2X + 3A$, $2X + 2A$, $XXY + 2A$, $XO + 2A$? Выводы объясните.

4. Какой пол будет у дрозофилы и человека с набором половых хромосом XXY ? Почему?

5. Если у самца дрозофилы гены A и Z сцеплены в аутосомах и находятся в гетерозиготном состоянии, а ген F локализован в X -хромосоме, то какие типы гамет может образовать этот самец?

6. У кур известен сцепленный с полом рецессивный ген с летальным эффектом без видимого проявления. Каково будет соотношение полов в потомстве гетерозиготного по этому гену петуха и нормальной курицы?

7. Какое потомство можно ожидать в браке между женщиной — гетерозиготной носительницей дальтонизма и мужчиной с нормальным зрением? Признак сцеплен с полом.

8. Полосатость окраски кур определяется сцепленным с полом доминантным геном B , а отсутствие полосатости — его рецессивной аллелью b . Каковы возможные генотипы и фенотипы потомков в F_1 и в F_2 от скрещивания полосатой курицы с белым петухом?

9. От пары дрозофил получено 420 потомков, из них только 141 самец. Как это объяснить?

10. Изобразите положение генов в хромосомах и выпишите гаметы у зиготы $LlDdAaBb$, если между генами L и D наблюдается полное сцепление, а между генами A и B , расположенными в другой хромосоме, идет кроссинговер.

11. При анализирующем скрещивании тригетерозиготы получено следующее расщепление по фенотипу: $A-B-C- - 126$, $A-bbC- - 120$, $aaB-C- - 128$, $aabbC- - 136$, $A-B-cc - 114$, $A-bbcc - 122$, $aaB-cc - 112$, $aa bb cc - 126$. Что можно сказать о локализации генов?

12. При анализирующем скрещивании тригетерозиготы в F_2 установлено следующее расщепление:

$ABCabc - 150$	$Abcabc - 37$
$abcabc - 143$	$aBCabc - 42$
$ABcabc - 70$	$AbCabc - 8$
$abCabc - 65$	$aBcabc - 6$

Определите порядок расположения генов и расстояния между ними.

13. Гены E, D, L, M, N находятся соответственно на 17,2; 18,9; 30,1; 35; 39,8 сМ генетической карты. С какой частотой происходит кроссинговер между генами M и D ?

14. Основываясь на расчетах Холдэйна, по данным Бэтсона и Пеннета (5.4), предложите способ определения частоты кроссинговера, использующий результаты расщепления в F_2 .

15. Какова величина кроссинговера, если доля некроссоверных особей $aabb$ в F_2 составляет 12,25 %?

16. Какие механизмы приводят к появлению организмов — мозаиков по признаку, детерминанты которого находятся в X -хромосоме у дрозофилы?

Глава 6

Молекулярные основы наследственности

Хромосомы с заключенными в них генами составляют непрерывный ряд воспроизведения. Первая схема воспроизведения хромосом была предложена Н. К. Кольцовым, который в 1928 г. выдвинул постулат: «*Omnis molecula e*

moleculae» (каждая молекула от молекулы). Согласно этому постулату макромолекулы клетки, к которым относятся белки и нуклеиновые кислоты, должны воспроизводиться по матричному принципу. Хромосома представляет собой сложное надмолекулярное образование. В ее состав входят белки — прежде всего гистоны, а также белки негистонового типа. В хромосомах находят также липиды, катионы двухвалентных металлов и т. д.

Что же обеспечивает свойства хромосом как носителей наследственной информации?

Генетические функции хромосом, такие, как способность определять развитие тех или иных признаков, способность к самовоспроизведению до начала 40-х годов XX в., большинство исследователей связывали с белками. Трудно было признать, как писал Н. К. Кольцов, за «такой простенькой молекулой», как ДНК, столь сложные функции. Тем не менее именно ДНК была в дальнейшем идентифицирована как генетический материал у всех растений, животных, микроорганизмов и большинства вирусов.

6.1. Генетическая роль ДНК

Рассмотрим основные доказательства того, что ДНК играет роль молекулярного носителя наследственности.

Трансформация бактерий. Первым прямым доказательством генетической роли ДНК послужила ее способность переносить наследственные свойства у пневмококков. Трансформацию пневмококков — *Diplococcus pneumoniae*, открыл бактериолог Ф. Гриффитс в 1928 г.

У пневмококков известны два типа штаммов, различающихся по характеру роста на плотных средах и одновременно по свойству патогенности по отношению к подопытным животным — мышам. S-форма пневмококка образует на агаре гладкие блестящие колонии благодаря тому, что клетки заключены в полисахаридную капсулу. S-форма патогенна для мышей, так как полисахаридная капсула предохраняет бактериальные клетки от иммунной системы зараженного животного. Мыши, которым вводили живые клетки S-формы пневмококка, погибали. По антигенным свойствам капсулы различают несколько типов S-форм: IS, IIS, IIIS и т. д.

Другая форма пневмококка — R-форма не имеет капсулы, образует шероховатые колонии и непатогенна для мышей. Известны редкие мутационные взаимопревращения S- и R-форм. При этом мутации $R \rightleftharpoons S$ всегда строго специфичны: $IS \rightleftharpoons IR$, $IIS \rightleftharpoons IIR$, $IIIS \rightleftharpoons IIIR$ и т. д.

Ф. Гриффитс обнаружил, что если мышам ввести убитые нагреванием до 65°C клетки формы IIIS и одновременно живые клетки формы IIR, то мыши погибают, а из их трупов выделяются клетки формы IIIS. В контрольных экспериментах мыши, зараженные только убитой формой IIIS или только живой формой IIR, не заболели. Следовательно, живые клетки IIR трансформируются

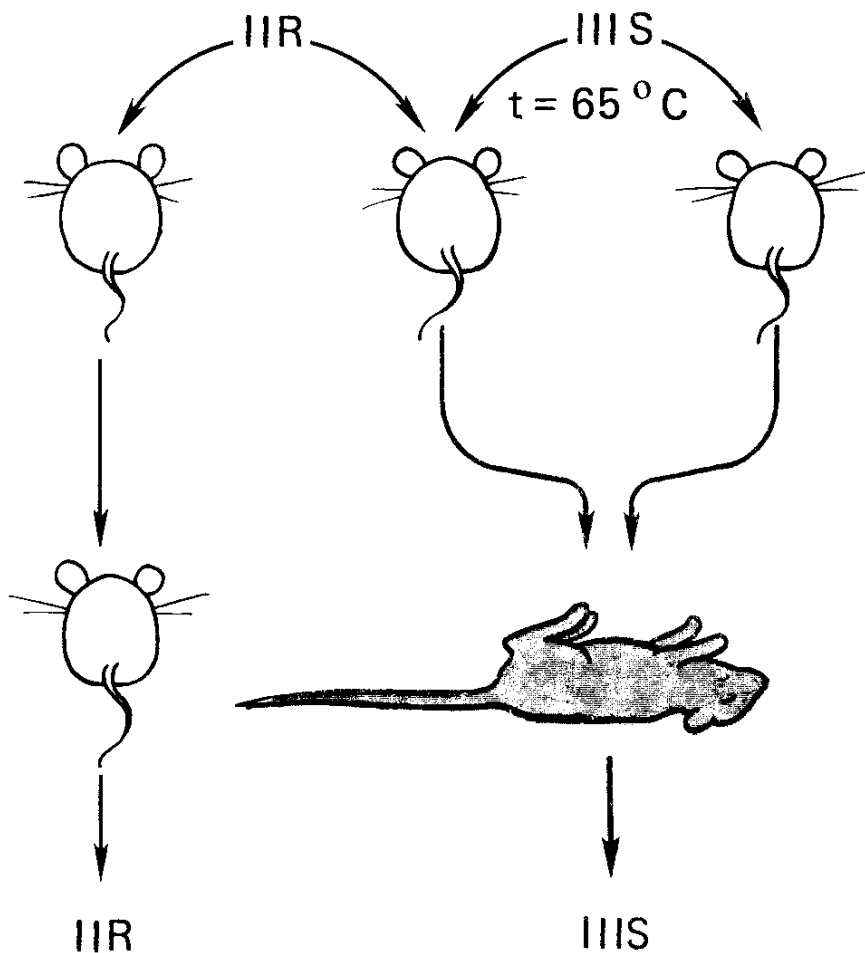


Рис. 6.1. Схема эксперимента Ф. Гриффитса по трансформации пневмококков. Объяснение в тексте

в присутствии убитых нагреванием клеток IIIS, тем самым приобретая свойства патогенности (рис. 6.1).

В дальнейшем другие экспериментаторы показали, что такое же превращение — трансформация типов *D. pneumoniae* — может происходить *in vitro*, т. е. в пробирке. Используя этот подход, О. Эвери, К. МакЛеод и М. МакКарти в 1944 г. идентифицировали трансформирующий агент как ДНК. ДНК, выделенная из клеток типа IIIS и добавленная в культуру клеток IIR, трансформировала часть клеток в форму IIIS, и они приобретали способность стойко передавать это свойство при дальнейшем размножении. Добавление дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) — фермента, специфически разрушающего ДНК, препятствовало трансформации.

Таким образом, было получено первое прямое доказательство генетической роли ДНК у бактерий. В дальнейшем предпринимались многочисленные попытки трансформации низших эукариот — дрожжей, водорослей, а также многоклеточных животных и растений. Эти попытки оставались безуспешными до конца 70-х годов XX в., когда стала развиваться технология генной инженерии и были разработаны методы так называемой векторной трансформации (см. гл. 11). В настоящее время проблема трансформации эукариот решена и роль ДНК как универсального носителя генетической информации не вызывает сомнения.

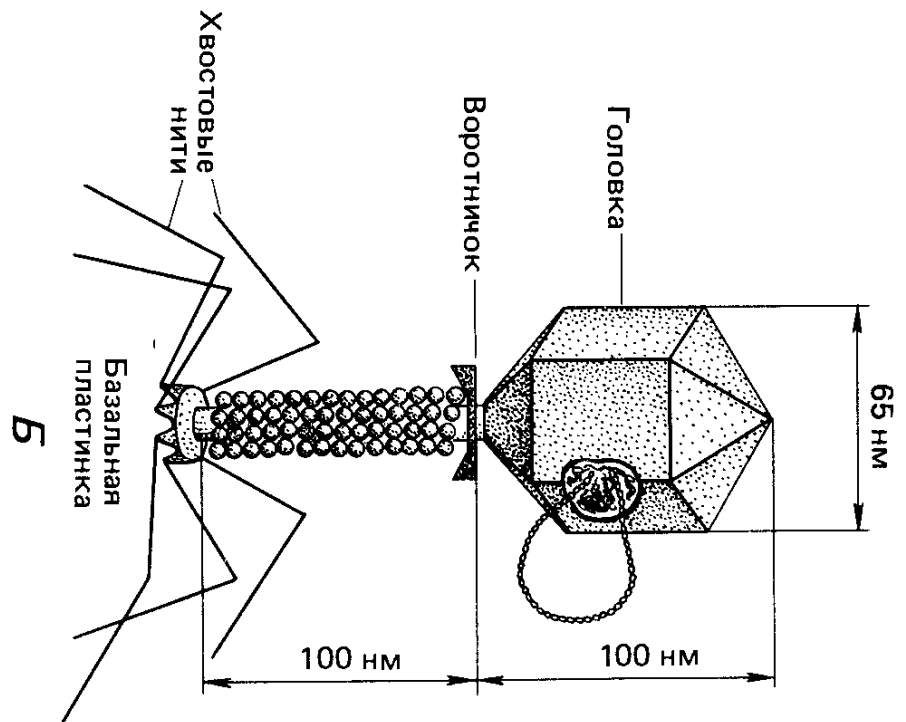
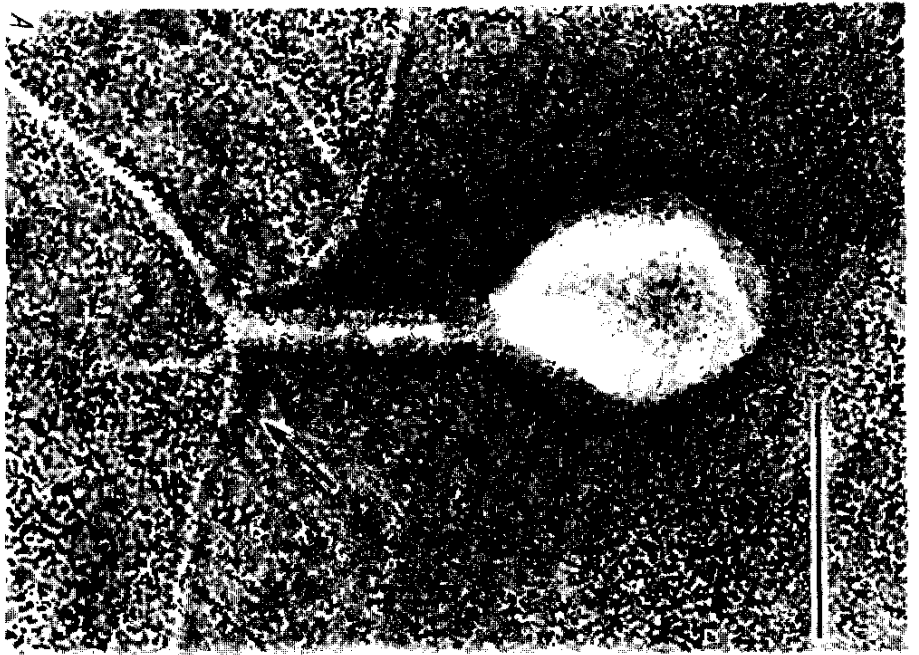


Рис. 6.2. Строение Т-четного бактериофага (Т4): А — электронная микрофотография. Длина отрезка — 1000 нм (L. Simon, T. Anderson, 1967) Б — схема строения частицы бактериофага

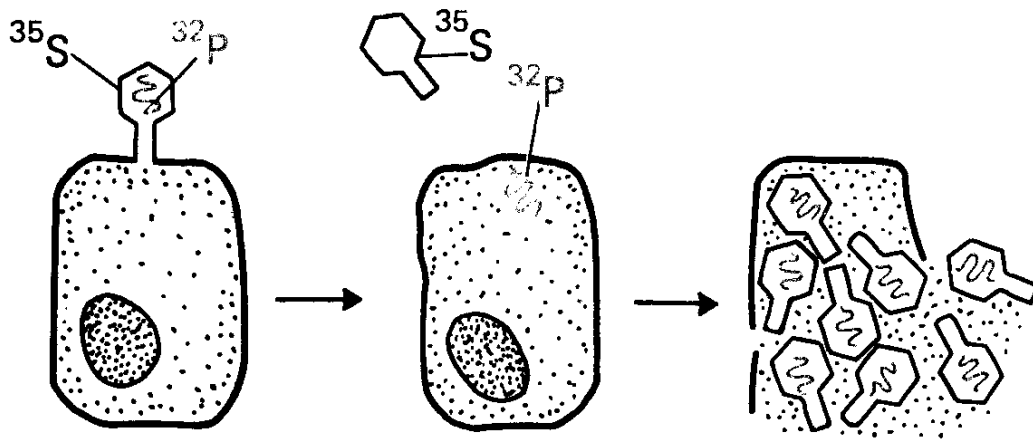


Рис. 6.3. Схема эксперимента А. Херши и М. Чейз, которые доказали роль ДНК в размножении бактериофага Т2. Объяснения в тексте

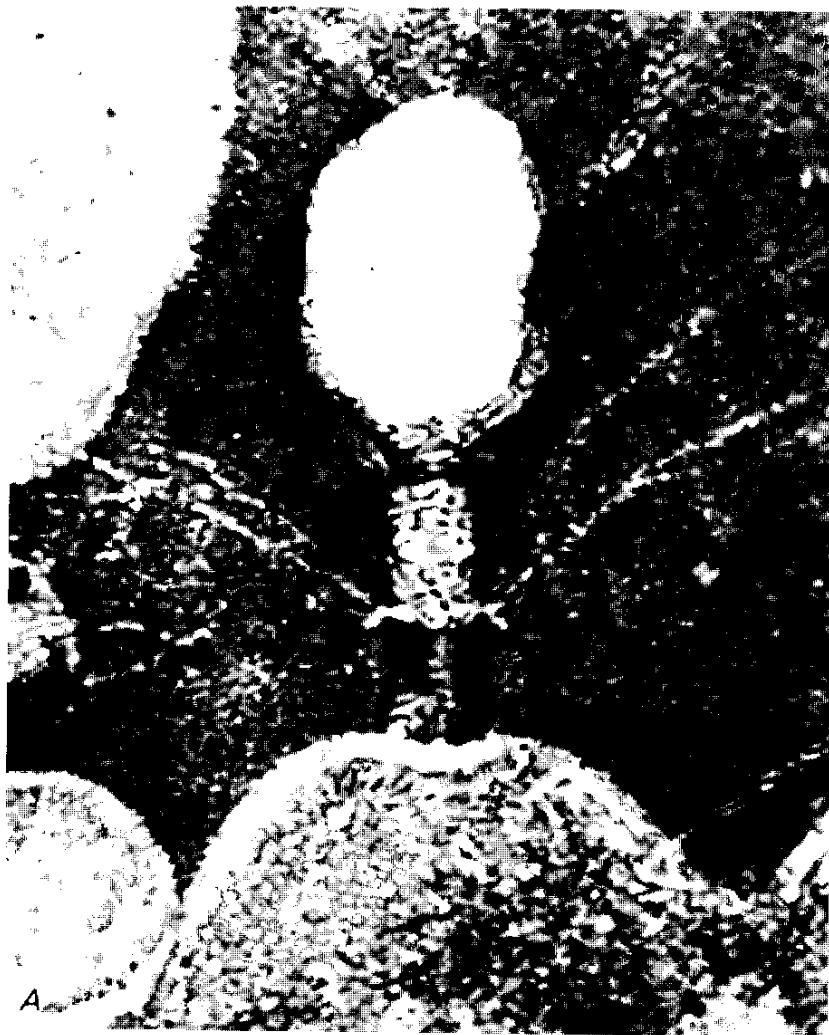


Рис. 6.4. Впрыскивание ДНК бактериофага Т4 в клетку (L. Simon, T. Andreson, 1967]:

А — адсорбция фага на оболочке клетки *E. coli*, сопровождаемая сокращением хвостового чехла. Виден осевой канал или игла, через которую впрыскивается ДНК бактериофага в клетку; Б — тонкий срез, показывающий проникновение иглы осевого канала (стрелка) через оболочку и впрыскивание ДНК (фрагмент при большом увеличении — вверху).

Длина отрезка 1000 нм

Размножение бактериофагов. Второе прямое доказательство роли ДНК в наследственности было получено при изучении размножения бактериофага T2, инфицирующего кишечную палочку — *Escherichia coli*. Строение близкого к нему бактериофага T4 схематически представлено на рис. 6.2. Бактериофаги — это вирусы бактерий. Частица бактериофага заражает клетку *E. coli*. Внутри клетки образуются новые частицы бактериофага. Через 20 мин при 37 °С клетка лизируется и около 100 дочерних частиц выходят



Рис. 6.4. Продолжение.

наружу. Бактериофаг состоит только из двух макромолекулярных компонентов — белка и ДНК, заключенной в головке бактериофага. В 1952 г. А. Херши и М. Чейз выяснили, какой из этих двух компонентов отвечает за размножение бактериофага (рис. 6.3). В этих экспериментах белок бактериофага метили радиоактивным изотопом серы ^{35}S , поскольку серу содержат только аминокислоты метионин и цистеин, входящие в белок. ДНК метили радиоактивным изотопом фосфора ^{32}P . Около 99 % фосфора бактериофага Т2 заключено в его ДНК. Для того чтобы ввести эти радиоактивные метки в бактериофаг, им заражали бактерии, выращенные в среде, содержащей соответствующие изотопы в компонентах питательной среды.

Мечеными бактериофагами заражали клетки *E. coli*, не содержащие ^{35}S и ^{32}P . После начального периода адсорбции бактериофага на клетках последние тщательно отмывали, освобождая их от так называемых «теней» бактериофага — их пустых оболочек, оставшихся на поверхности бактериальных клеток. Оказалось, что при такой процедуре из культуры бактерий удаляется не менее 80 % ^{35}S , и это никак не влияет на дальнейшее размножение бактериофага. В то же время основная масса ^{32}P не может быть удалена, поскольку проникает внутрь бактерий (рис. 6.4.), и в дальнейшем при размножении бактериофага ^{32}P передается потомству. Таким образом, именно ДНК, а не белок определяет размножение бактериофага в зараженных клетках.

Сопоставление плоидности и содержания ДНК в клетке. Параллелизм в поведении хромосом и генов натолкнул исследователей на мысль сопоставить плоидность (число наборов хромосом) клеток и содержание в них ДНК. Наиболее показательные результаты были получены Х. Рисом и А. Мирским (1949). Они исследовали печень крысы, в которой вследствие эндомитоза обнаруживаются клетки различной плоидности: часто хромосомы редуцируются и остаются в материнской клетке, которая не делится. Ядра клеток окрашивали по методике Фельгена, выявляющей ДНК, поскольку она специфична для дезоксирибозы. Интенсивность окраски может быть измерена цитоспектрофотометрически и таким образом зарегистрирована количественно. Х. Рис и А. Мирский обнаружили в печени крысы три типа ядер, интенсивность окраски которых по Фельгену соотносилась как 1:1,9:3,6. В то же время в печени крысы цитологически были найдены клетки трех уровней плоидности: $2n$, $4n$, $8n$. Эти результаты показали, что содержание ДНК в клеточном ядре меняется пропорционально изменению плоидности, что также согласуется с представлениями о генетической роли ДНК.

Видовая специфичность нуклеотидного состава ДНК. На основе правила Чаргаффа (количество А равно Т, G равно С; см. гл. 1) видовая специфичность ДНК выражается соотношением $\frac{G+C}{A+T}$, получившим наименование *коэффициента нуклеотидной (видовой) специфичности*. Это положение легло в основу новой отрасли био-

логии — геносистематики, которая оперирует сравнением состава, а ныне уже и структуры нуклеиновых кислот для построения естественной системы организмов. Некоторые примеры варьирования коэффициента нуклеотидной специфичности у разных организмов приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Содержание оснований в ДНК из различных источников (по А. Ленинджеру, 1976)

Объект	Нуклеотидный состав, мол. %				Коэффициент нуклеотидной специфичности $\left(\frac{A+T}{G+C}\right)$
	A	G	C	T	
Животные					
человек	30,9	19,9	19,8	29,4	1,52
овца	29,3	21,4	21,0	28,3	1,36
курица	28,8	20,5	21,5	29,2	1,38
черепаха	29,7	22,0	21,3	27,9	1,31
лосось	29,7	20,8	20,4	29,1	1,43
морской еж	32,8	17,7	17,3	32,1	1,58
саранча	29,3	20,5	20,7	29,3	1,41
Растения, грибы					
зёрна пшеницы	27,3	22,7	22,8	27,1	1,19
дрожжи	31,3	18,7	17,1	32,9	1,79
<i>Aspergillus niger</i>	25,0	25,1	25,0	24,9	1,00
Бактерии					
<i>E. coli</i>	24,7	26,0	25,7	23,6	0,93
<i>Staphylococcus aureus</i>	30,8	21,0	19,0	29,2	1,50
<i>Clostridium perfringens</i>	36,9	14,0	12,8	36,3	2,70
<i>Brucella abortus</i>	21,0	29,0	28,9	21,1	0,72
<i>Sarcina lutea</i>	13,4	37,1	37,1	12,4	0,35
Бактериофаги					
T7	26,0	24,0	24,0	26,0	1,08
λ	21,3	28,6	27,2	22,9	0,79
ϕ X174	24,6	24,1	18,5	32,7	1,34
ϕ X174 (репликативная форма)	26,3	22,3	22,3	26,4	1,18

Генетическую роль нуклеиновых кислот подтверждает также мутагенный эффект аналогов пуриновых и пиримидиновых оснований для бактерий, а также ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм, поглощаемой азотистыми основаниями.

РНК как генетический материал. Подавляющее большинство организмов содержат ДНК в качестве генетического материала. Лишь некоторые вирусы, например вирус табачной мозаики (ВТМ), лишены ДНК и состоят из белка и рибонуклеиновой кислоты — РНК. РНК отличается от ДНК по химическому составу тем, что в ней содержится сахар — рибоза, а пиримидиновое основание тимин заменено на урацил (рис. 6.5).

Генетическая роль РНК у ВТМ была доказана в экспериментах Г. Френкель-Конрата, А. Гирера и других в конце 50-х годов XX в. Каждая частица ВТМ содержит одиночную нить РНК длиной около 6400 нуклеотидов, заключенную в белковую оболочку.

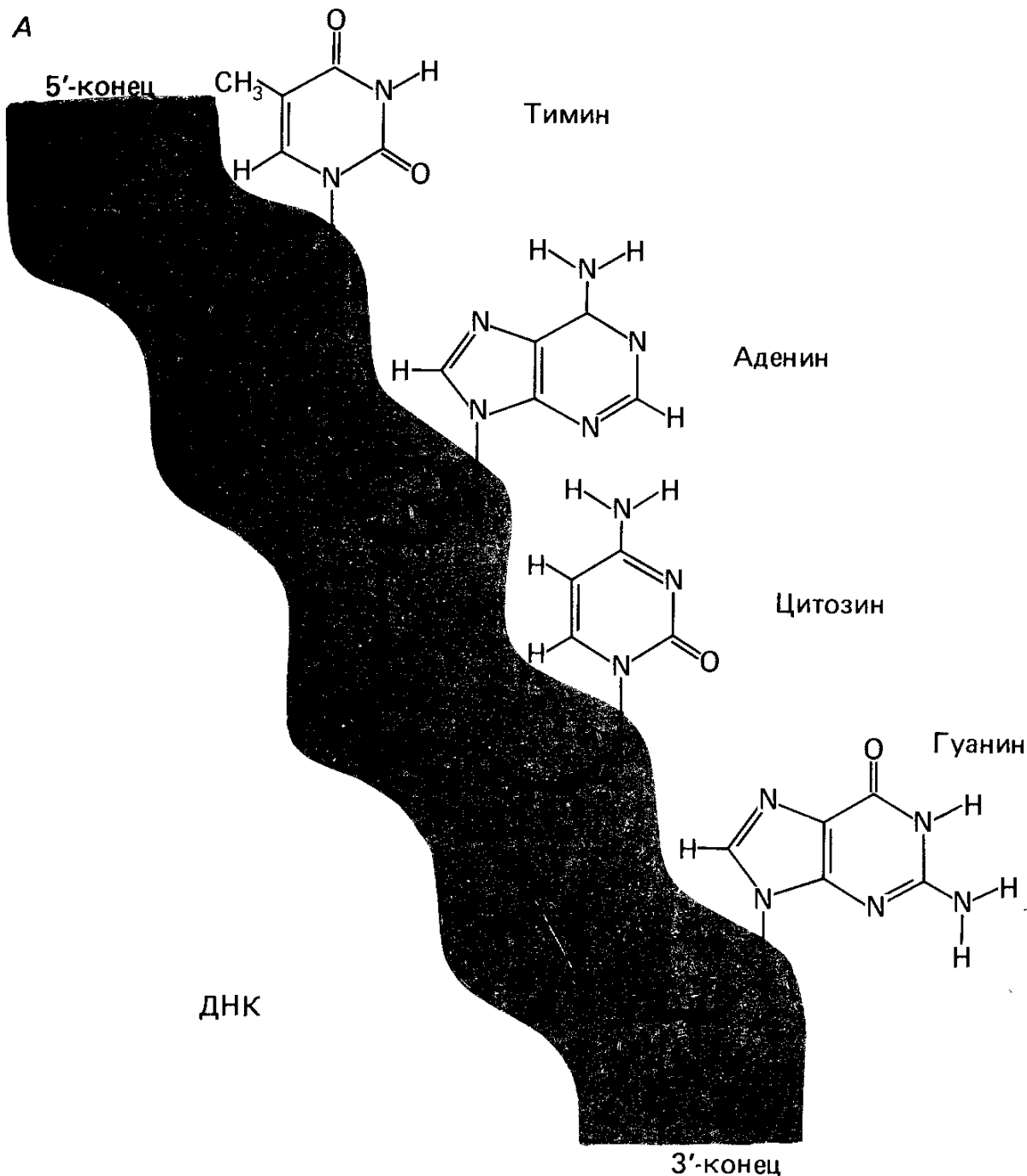


Рис. 6.5. Полинуклеотидные цепи ДНК (А) и РНК (Б)

ку. Оболочка ВТМ состоит примерно из 2130 идентичных субъединиц, каждую из которых составляют 158 аминокислотных остатков. Известны штаммы ВТМ, различающиеся по способности инфицировать различные формы растения-хозяина, по симптомам, которые сопровождают вирусную инфекцию, а также по аминокислотному составу субъединиц белка оболочки. Если отделить белок от РНК ВТМ, то РНК практически теряет инфекционность (на 99,9 %). При реконструкции вирусных частиц (смешивании РНК и белка ВТМ) они вновь становятся инфекционными. Эти особенности ВТМ и были использованы в опытах. Реконструированные вирусные частицы были получены из РНК стандартного

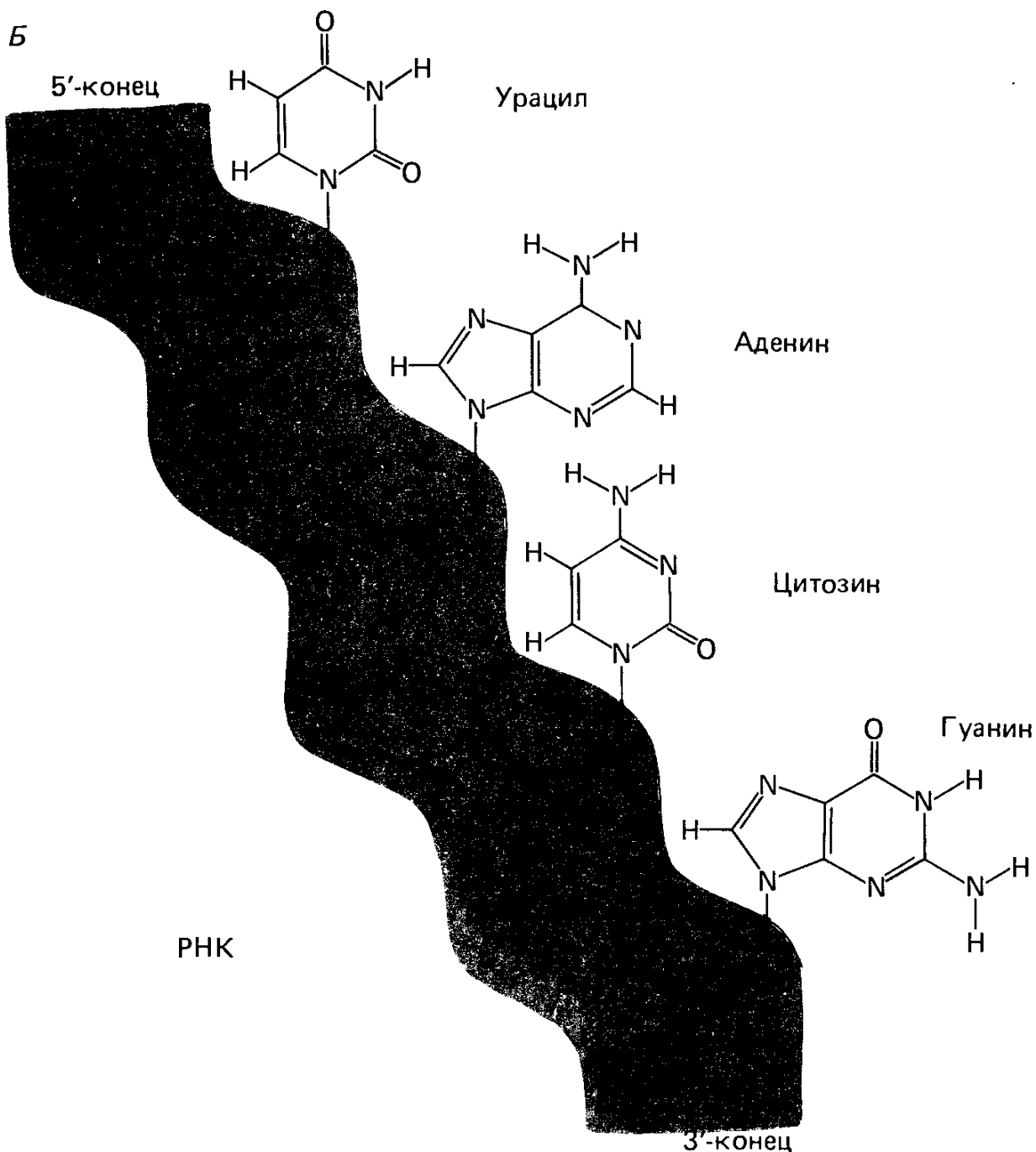


Рис. 6.5. Продолжение.

штамма и белка так называемого штамма НР. Штаммы различались аминокислотным составом белка оболочки. В отличие от штамма НР стандартный штамм не содержал гистидина и метионина.

Вирусные частицы-потомки, образовавшиеся в результате инфекции растений, по аминокислотному составу белка оболочки и другим признакам всегда соответствовали тому штамму ВТМ, от которого брали РНК. Таким образом была показана роль РНК как носителя генетической информации у ВТМ.

Итак, свойство наследственности оказалось связанным с нуклеиновыми кислотами, и прежде всего с ДНК.

6.2. Полуконсервативная репликация ДНК

Модель структуры ДНК, предложенная в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком, давала объяснение кодирования генетической информации, мутационной изменчивости и воспроизведения генов (см. гл. 1), которые согласно этой гипотезе представляют собой участки молекулы ДНК.

В 1957 г. М. Мезельсон и Ф. Сталь подтвердили представления Дж. Уотсона и Ф. Крика о полуконсервативном механизме воспроизведения (репликации) ДНК в клетках бактерий (рис. 6.6).

Г. Стент предложил рассматривать три способа репликации

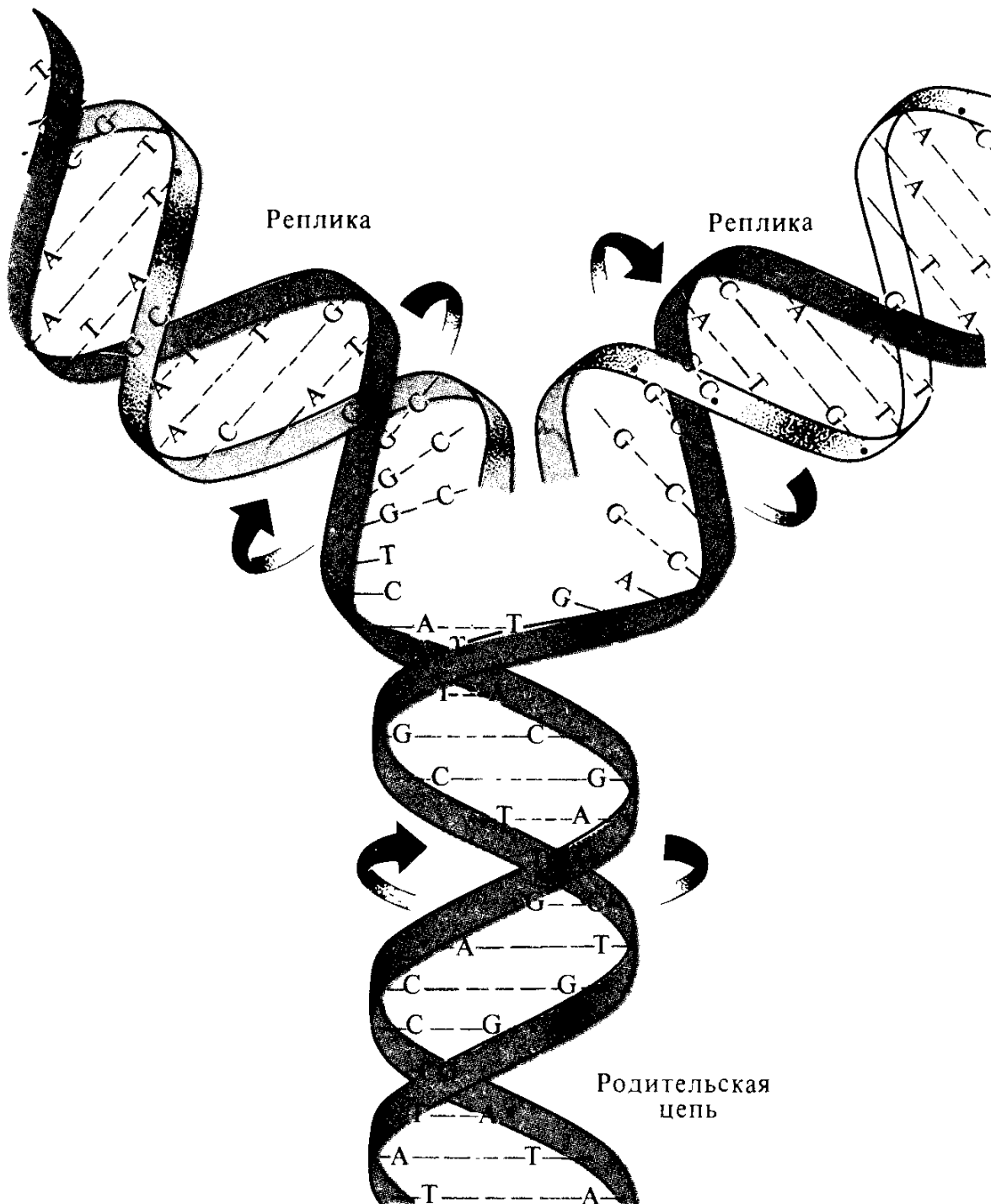


Рис. 6.6. Схема полуконсервативной репликации ДНК (Г. Стент, 1974)

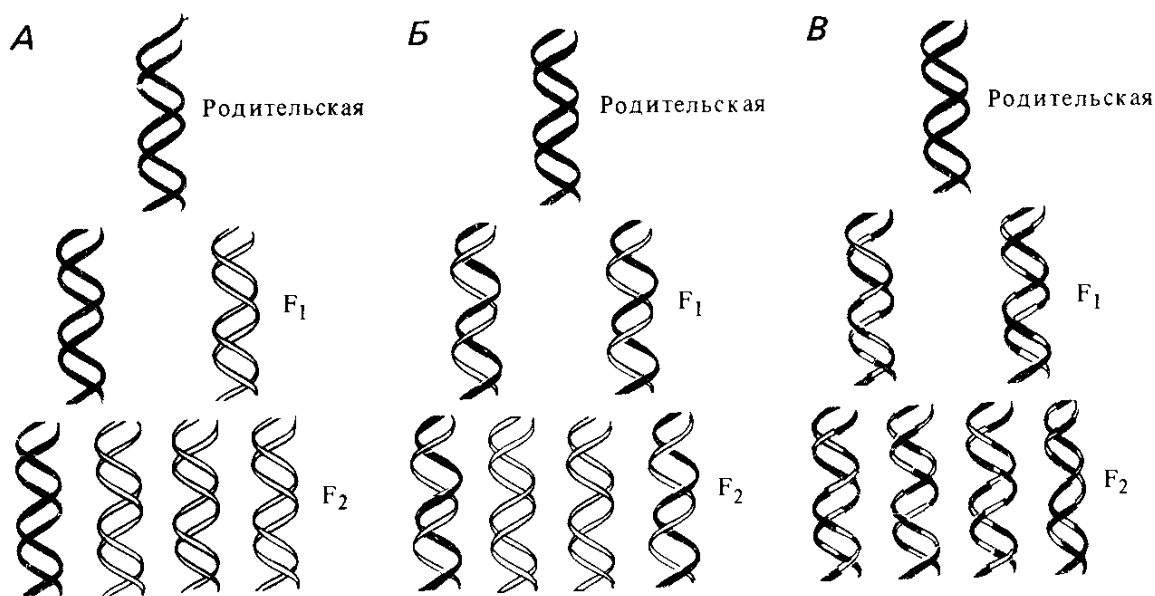


Рис. 6.7. Три возможных варианта воспроизведения ДНК (А — консервативный; Б — полуконсервативный; В — дисперсный), между которыми был сделан выбор в эксперименте М. Мезельсона и Ф. Сталя (по А. Ленинджеру, 1976)

ДНК (рис. 6.7): 1) *консервативный*, при котором новые молекулы не содержат материала родительской ДНК; 2) *полуконсервативный*, при котором новая молекула представлена одной родительской и одной вновь синтезированной цепями; 3) *дисперсный*, когда материал исходной молекулы случайно распределяется в обеих дочерних молекулах. Эксперимент М. Мезельсона и Ф. Сталя позволил сделать выбор между этими тремя вариантами (рис. 6.8).

Главный вопрос — как различать исходные молекулы ДНК и молекулы-потомки — был решен благодаря привлечению нового в то время для биологии метода — равновесного центрифугирования в градиенте плотности CsCl. При этом для мечения вновь синтезируемых молекул была использована утяжеляющая (плотностная) метка — изотоп азота ^{15}N .

Для этой цели клетки бактерии *E. coli* в течение нескольких делений выращивали на среде с единственным источником азота $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, так что вся ДНК оказывалась равномерно помеченной ^{15}N и имела плотность $1,724 \text{ г/см}^3$ в отличие от плотности обычной ДНК ($1,710 \text{ г/см}^3$), содержащей только ^{14}N . Такие образцы тяжелой и легкой ДНК можно разделить, если их смесь ультрацентрифугировать в градиенте плотности CsCl. При помещении 6М раствора CsCl в центрифужные пробирки и при ускорении 10^5 g в течение 20 ч создается градиент плотности раствора. Каждый тип молекул седиментирует до тех пор, пока не достигнет зоны своей плотности.

М. Мезельсон и Ф. Сталь в своих экспериментах использовали аналитическую ультрацентрифугу, в которой фиксировали распределение ДНК в ультрафиолетовом свете с длиной волны 260 нм, которую поглощают нуклеиновые кислоты. Смесь тяжелой (^{15}N) и легкой (^{14}N) ДНК давала две зоны поглощения

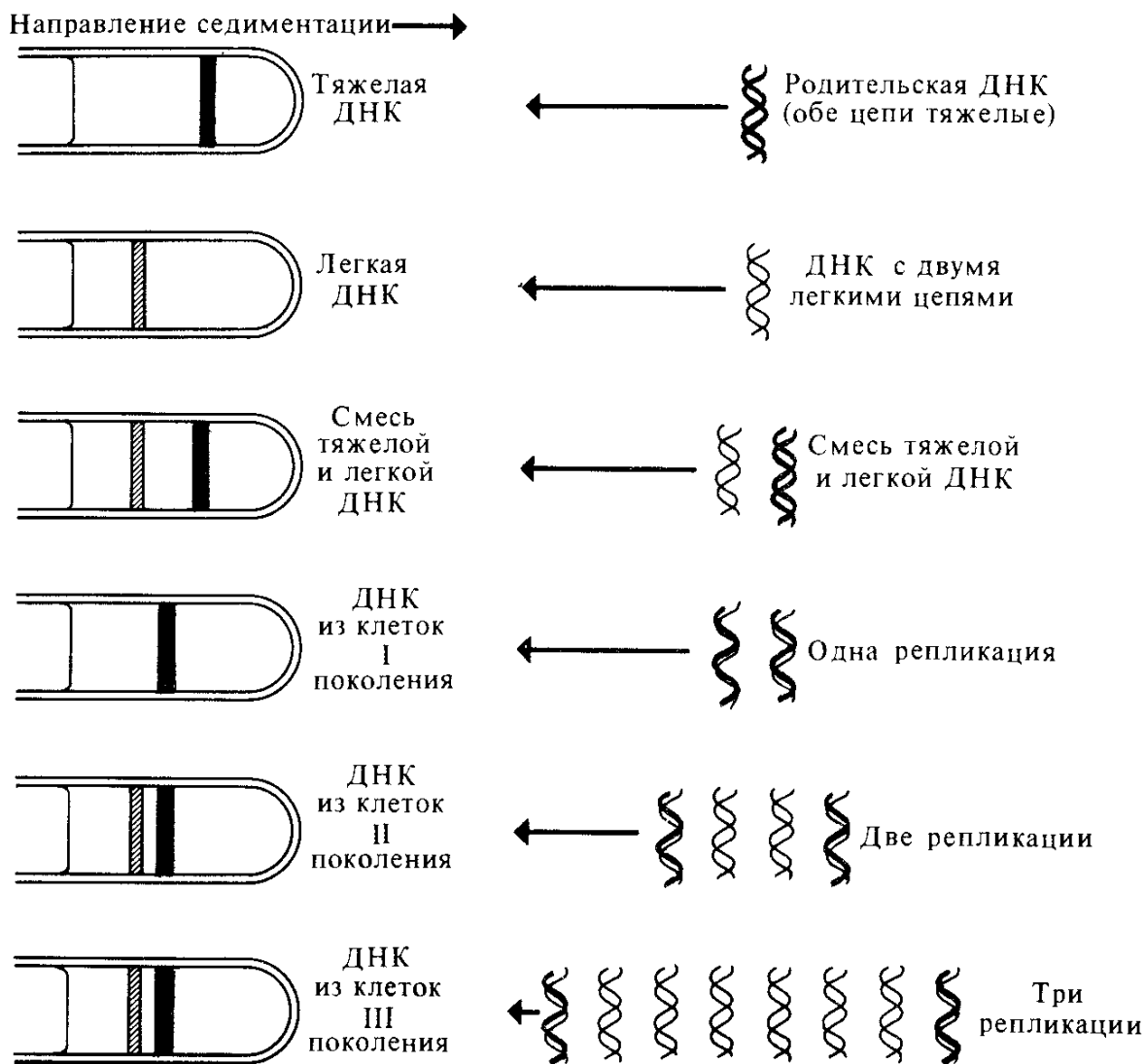


Рис. 6.8. Схема эксперимента М. Мезельсона и Ф. Сталя, доказавшего полуконсервативный механизм репликации ДНК (из А. Ленинджера, 1976)

УФ-света. Если бактерий, выращенных на среде ^{15}N , переносили на среду с ^{14}N и давали им делиться только один раз, то ДНК, экстрагированная из них, собиралась только в одной зоне, поглощающей УФ-свет. Положение вновь синтезированных молекул оказывалось промежуточным — между тяжелой и легкой ДНК. Этот результат исключает консервативный механизм репликации.

Если бактериям давали делиться на обычной среде дважды, то появлялся пик легкой ДНК и сохранялся пик ДНК промежуточной плотности, не исчезающий и при последующих делениях. Этот результат противоречит дисперсионному механизму репликации. Таким образом, именно полуконсервативный механизм лежит в основе репликации ДНК. В соответствии с этим механизмом ДНК, появляющаяся после первого деления клеток на обычной среде и занимающая промежуточное положение в градиенте плотности, должна представлять собой фракцию гибридных молекул. Тогда одна нить (старая) должна содержать только ^{15}N , а другая (новая) — только ^{14}N . Чтобы в этом убедиться, нужно суметь разделить «старую» и «новую» нити. Сделать это сравнительно просто: нужно нагреть ДНК до 100°C .

При этом разрываются водородные связи между основаниями, но сохраняются все ковалентные связи. Происходит так называемое плавление или денатурация ДНК.

Как показали М. Мезельсон и Ф. Сталь, если выделить ДНК промежуточной плотности и расплавить ее, т. е. прогреть в течение 30 мин при 100°C , быстро охладить и вновь центрифугировать в градиенте плотности, то обнаружатся два пика, один из которых по плотности соответствует денатурированной легкой (^{14}N), а другой — денатурированной тяжелой (^{15}N) ДНК.

Полуконсервативный механизм репликации ДНК, доказанный М. Мезельсоном и Ф. Сталем, оказался столь же универсальным для воспроизведения генетического материала, как и сама структура ДНК.

Более того, в тех сравнительно редких случаях, когда генетический материал представлен одонитевой ДНК, как, например, у бактериофага $\phi\text{X-174}$ и некоторых других, при их воспроизведении в клетке синтезируется так называемая репликативная (двунитевая) форма (РФ). Эта РФ далее реплицируется на основе полуконсервативного механизма.

Доказательство полуконсервативного механизма репликации ДНК послужило и первым прямым доказательством справедливости модели Дж. Уотсона и Ф. Крика.

Полуконсервативный механизм репликации показан также для митотических хромосом высших животных и растений, в частности для хромосом бобов — *Vicia faba*. Дж. Тэйлор помещал проростки *V. faba* в среду, содержащую тимидин, меченный тритием, на время одного (или части) клеточного цикла. Это

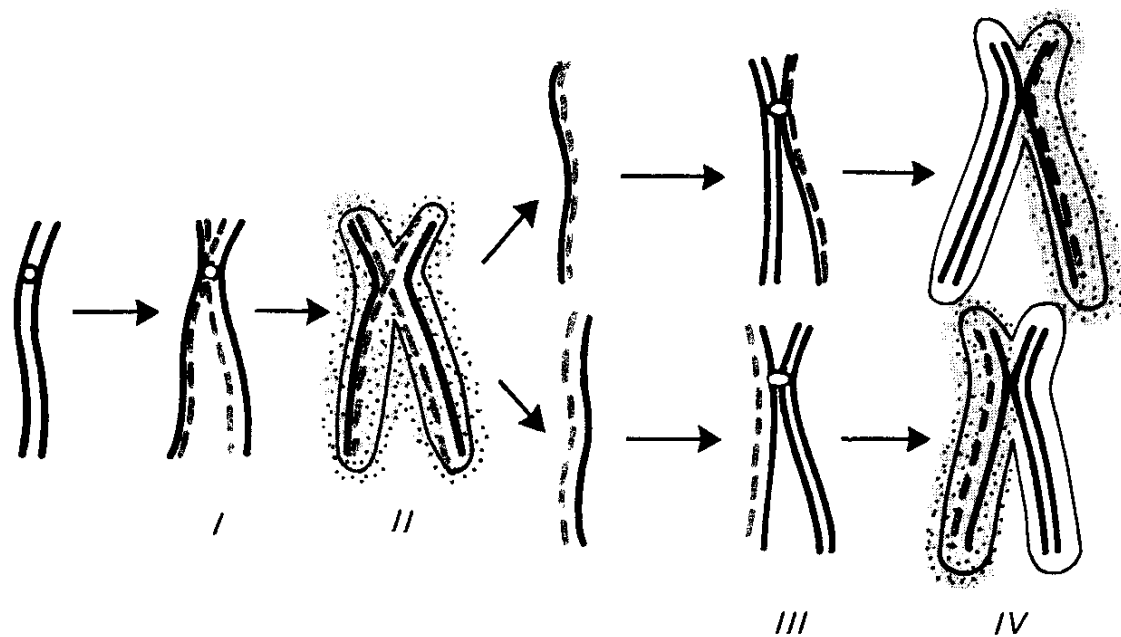


Рис. 6.9. Схема распределения меченого ^3H тимидина при удвоении хромосом *Vicia faba* (по Дж. Тэйлору, 1963).

Пунктирная линия изображает меченую субъединицу хромосомы, сплошная — немеченую. Точки — зерна засвеченной фотоэмульсии на радиоавтографе. I — удвоение в присутствии ^3H -тимидина, II — первая метафаза после включения метки, III — удвоение в отсутствие ^3H -тимидина, IV — вторая метафаза после включения метки

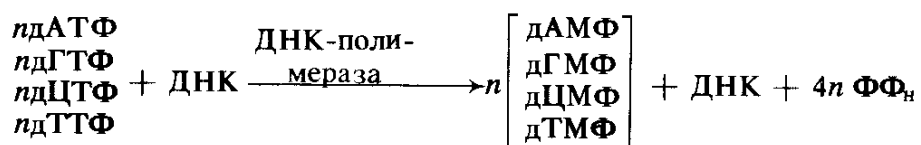
приводило к тому, что хромосомы оказывались равномерно мечеными ^3H , что фиксируется автордиографически. Затем проростки переносили в среду без радиоактивной метки, но содержащую колхицин. Последний применяли для того, чтобы дочерние хроматиды не расходились, а оставались в одной клетке (см. гл. 4).

Во время первой метафазы в «холодной» (без ^3H) среде мечеными оказывались обе дочерние хроматиды, а в следующем делении в метафазе одна хроматида оказывалась меченой, а другая немеченой. Эти результаты свидетельствуют о полуконсервативном воспроизведении ДНК хромосом (см. схему рис. 6.9) и совместимы с представлением о том, что митотическая хромосома содержит одну двунитевую молекулу ДНК.

6.3. Энзимология репликации

Модель Уотсона—Крика дает общее молекулярное описание структуры и функции генов, предполагает принцип репликации генетического материала. Доказательство полуконсервативного механизма репликации ДНК заставило по-новому взглянуть на основные характеристики двойной спирали Уотсона—Крика. Для того чтобы понять, как работает полуконсервативный механизм репликации, необходимо ответить на ряд вопросов: как разделяются комплементарные нити ДНК, закрученные одна вокруг другой? Какая ферментативная система воспроизводит ДНК с учетом антипараллельности ее цепей и др.

Первый обнадеживающий результат на пути к пониманию ферментативного механизма репликации ДНК /был получен А. Корнбергом (отцом) в 1956 г., когда он выделил из клеток бактерии *E. coli* фермент ДНК-полимеразу. Этот фермент осуществлял синтез ДНК при наличии в реакционной смеси всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: АТФ, ГТФ, ТТФ, ЦТФ и молекул ДНК:



В такой реакции количество ДНК увеличивалось в 20 раз по сравнению с внесенным изначально. По своему нуклеотидному составу вновь синтезированная ДНК неотличима от исходной. Реакция полностью зависела от присутствия всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Казалось бы, осуществлена репликация ДНК *in vitro*. Однако если в реакции А. Корнберга использовали трансформирующую ДНК, то ее трансформирующая активность в результате реакции не возрастала. Оказалось, что ДНК-полимераза не является истинной «репликазой». Что же происходит в реакции Корнберга?

Дело в том, что при выделении из клеток ДНК рвется, так что образуются фрагменты с одноцепочечными 5'-концами.

При этом каждый фрагмент с одноцепочечным 5'-концом используется в качестве *матрицы* для полимеризации комплементарных нуклеотидов, которые связываются с ней водородными связями. Более короткая цепь фрагмента, имеющая свободный 3'-конец, служит в качестве *затравки, или праймера*, к которому ковалентно присоединяются

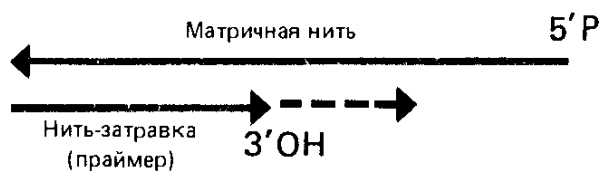


Рис. 6.10. Схематическое изображение фрагмента ДНК, в котором различают матричную и затравочную нити (сплошные стрелки).

Пунктир — направление роста цепи ДНК, синтезируемой ДНК-полимеразой I в реакции А. Корнберга

полимеризуемые нуклеотиды (рис. 6.10). Таким образом, ДНК-полимераза А. Корнберга достраивала двуцепочечные участки на концах фрагментов ДНК, после чего реакция останавливалась.

Дальнейшие попытки выделить из клеток бактерий истинную репликазу были связаны с применением генетических методов. Были получены мутанты *polA* с условным проявлением (в частности, температурочувствительные), лишённые при непермиссивных условиях активности ДНК-полимеразы I, как стали называть фермент А. Корнберга. Эти мутанты сохраняли жизнеспособность даже при непермиссивных условиях. Это ещё раз подтвердило, что ДНК-полимераза I не является ферментом, реплицирующим ДНК *in vivo*.

Из таких бактериальных мутантов Т. Корнберг (сын) и другие выделили ещё два фермента: ДНК-полимеразу II и ДНК-полимеразу III. Эти ферменты также «умели» достраивать двунитевые участки на фрагментах ДНК с односторонними 5'-концами. В дальнейшем было показано, что именно ДНК-полимераза III участвует в синтезе полинуклеотидных цепей при репликации ДНК *E. coli*. У этого объекта были выделены условно летальные мутанты по гену *dna E*, кодирующему ДНК-полимеразу III. Тем не менее ни одна из трех ДНК-полимераз *E. coli* не может инициировать репликацию ДНК в отсутствие уже готового праймера (затравки).

Начало синтеза ДНК — инициацию репликации — осуществляет иной фермент. Им оказалась РНК-полимераза, кодируемая геном *dna G*. Таким образом, в качестве затравки при репликации бактериальной ДНК ДНК-полимераза III использует полирибонуклеотид, синтезируемый на матрице ДНК. Эти короткие (около 10 звеньев) молекулы РНК в дальнейшем — в ходе роста цепи (элонгации) — удаляет ДНК-полимераза I, которая кроме полимеразной активности в направлении 5' → 3' растущей цепи обладает 5' → 3'-экзонуклеазной активностью, т. е. способна отщеплять нуклеотиды с 5'-конца. Благодаря объединению этих двух активностей в одной молекуле фермента ДНК-полимераза I удаляет РНК-праймер и одновременно заполняет образующуюся одностороннюю брешь, полимеризуя дезоксирибонуклеотиды. Кроме этих двух активностей ДНК-полимераза I имеет ещё и третью — 3' → 5'-экзонуклеазную. Благодаря этой активности ДНК-полимераза I осуществляет так называемые *корректорские функции*,

удаляя ошибочно включенные в ДНК основания. 3' → 5'-экзонуклеазная активность свойственна всем трем ДНК-полимеразам *E. coli*, что обеспечивает высокую точность репликации ДНК.

Поскольку все ДНК-полимеразы для синтеза ДНК нуждаются в свободных 3'-ОН концах, легко представить непрерывную репликацию только одной из двух комплементарных цепей с образованием так называемой *ведущей*, или *лидирующей*, цепи ДНК. Что же происходит в «вилке» репликации со второй цепью?

Р. Оказаки, используя очень кратковременное (несколько секунд) мечение реплицирующейся ДНК с помощью ³H-тимидина, показал, что значительная часть вновь синтезированной ДНК выделяется в виде коротких меченых фрагментов — 1000—2000 нуклеотидов. Эти фрагменты, получившие название фрагментов Оказаки, соответствуют коротким участкам репликации второй комплементарной цепи. На ней ДНК также синтезируется в направлении 5'—3'. Каждый фрагмент Оказаки иницируется коротким полирибонуклеотидом (около 10 звеньев), который и служит затравкой для дальнейшего роста полидезоксирибонуклеотида (рис. 6.11). После удаления РНК и заполнения брешы с помощью ДНК-полимеразы I фрагменты соединяются ковалентно. Эту реакцию выполняет фермент *ДНК-лигаза*, замыкающая фосфодиэфирные связи.

У условно летальных мутантов бактерий, лишенных активности ДНК-лигазы, в непермиссивных условиях ковалентного соединения фрагментов Оказаки не происходит. Нить ДНК, синтезируемая в виде фрагментов Оказаки, получила название *запаздывающей*.

Молекулы ДНК в клетке суперспирализованы (рис. 6.12), т. е. двойная спираль образует витки более высокого порядка — так называемые супервитки. Необходимая предпосылка репликации — раскручивание суперспирализованной ДНК, разделение и удержание комплементарных цепей в расплавленном состоянии, т. е. локальная денатурация или плавление ДНК.

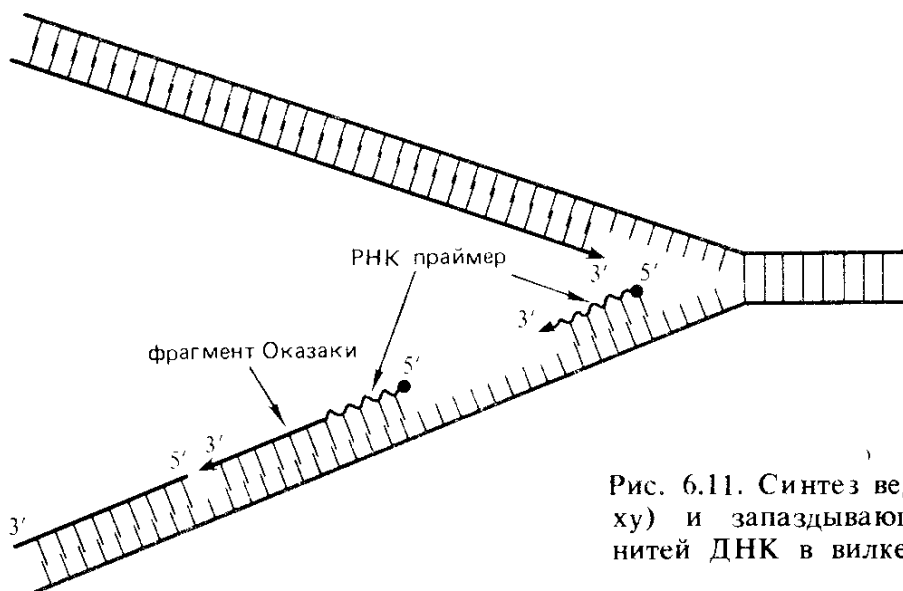


Рис. 6.11. Синтез ведущей (вверху) и запаздывающей (внизу) нитей ДНК в вилке репликации

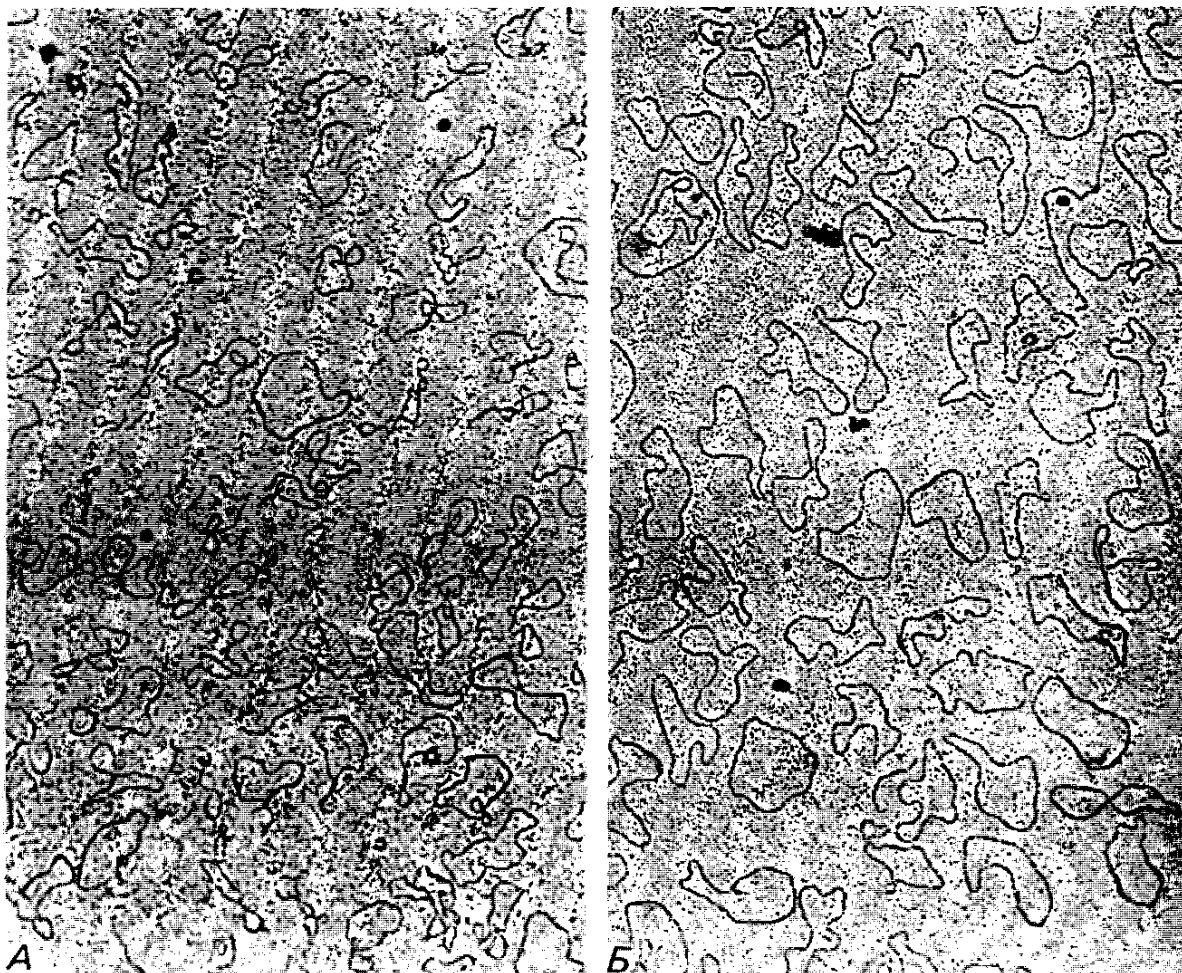


Рис. 6.12. Электронная микрофотография частично суперспирализованной (А) и полностью релаксированной (Б) ДНК вируса полиомы (I. Vinograd et al., 1965)

Все эти операции также осуществляют ферменты. Сбрасывание супервитков, или релаксацию молекул, проводят ферменты, относящиеся к классу *топоизомераз*.

Особый белок (раскручивающий цепи) осуществляет плавление ДНК. Кроме того, особый класс белков, связывающихся с ДНК, удерживает нити ДНК разделенными. Это так называемые белки, дестабилизирующие двойную спираль. Благодаря действию всех этих белков на ДНК образуется участок локальной денатурации и две «вилки», в которых в дальнейшем и происходит репликация (рис. 6.13).

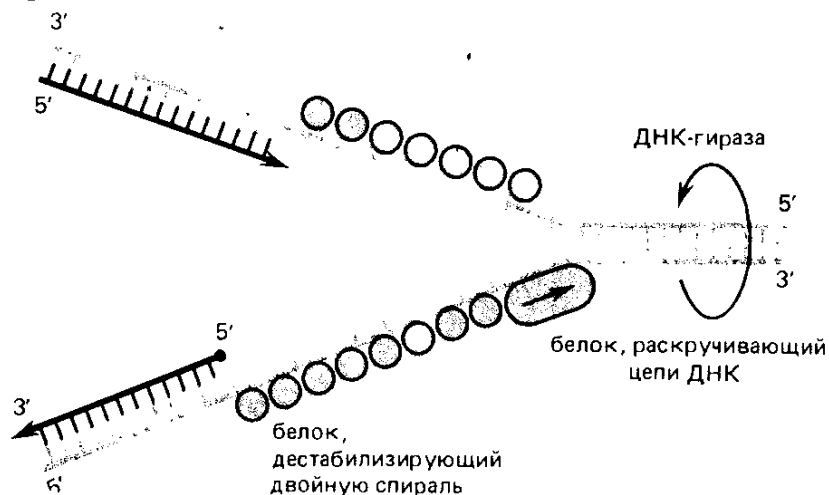


Рис. 6.13. Белки, раскрывающие ДНК для последующей репликации

Согласно концепции Б. Альбертса и А. Корнберна большинство ферментов, ответственных за репликацию ДНК, работает в мультиэнзимном комплексе, связанном с ДНК в виде так называемой *реплисомы*. Благодаря непосредственному взаимодействию

Основные белки, ответственные за репликацию ДНК у *E. coli*

Белок	Функция
Топоизомераза	Сбрасывание супервитков ДНК
Белок, раскручивающий двойную спираль (АТФ-зависимый)	Плавнение ДНК
Белок, дестабилизирующий двойную спираль	Стабилизация односторонних участков
РНК-полимераза («праймаза»)	Инициация синтеза ДНК
ДНК-полимераза III	Синтез ДНК, корректорские функции
ДНК-полимераза I	Удаление РНК-затравки, заполнение односторонних участков, корректорские функции
ДНК-лигаза	Ковалентное соединение фрагментов Оказаки

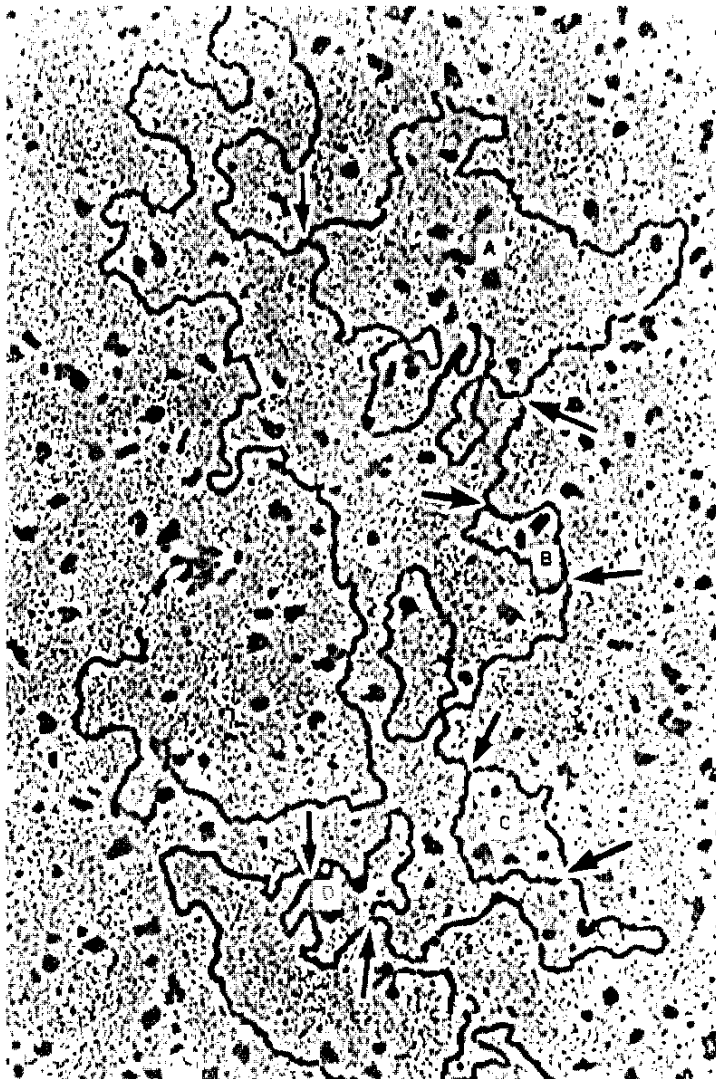


Рис. 6.14. Репликация хромосомной ДНК *D. melanogaster* (Wolstenholme, 1973).

Стрелки указывают на репликационные вилки, движущиеся в противоположных направлениях и образующие так называемые «глазки» или «пузыри» репликации (A — D)

всех этих белков ДНК *E. coli* реплицируется с почти фантастической скоростью. Вся ДНК кишечной палочки (4×10^6 п. н.) воспроизводится за 20 мин при 37°C . Скорость репликации таким образом достигает

$$\frac{4\,000\,000}{20} = 2 \cdot 10^5$$

п. н. в 1 мин, или около 3000 п. н. в 1 с.

Хотя репликация у эукариот изучена не столь подробно, как у прокариот, очевидно, что основные этапы так же, как и основные белки репликации, по своим функциям сходны у разных организмов. У эукариот скорость репликации значительно ниже (100—300 п. н. в 1 с). При этом нужно учитывать, что их хромосомы поли-

репликонны в отличие от *E. coli*, у которой вся хромосома — один репликон. Репликоном называется единица репликации, в пределах которой она начинается и заканчивается. Как у прокариот, так и у эукариот репликация обычно двунаправленна, т. е. две вилки репликации, возникающие в зоне инициации репликации, удаляются друг от друга по мере синтеза ДНК (рис. 6.14) до тех пор, пока они не встретятся с вилками репликации соседних репликонов или друг с другом, как это происходит у *E. coli*, имеющей одну кольцевую хромосому (см. гл. 9).

6.4. Репарация ДНК

Удивительная стабильность генетического материала — ДНК связана отнюдь не с ее консервативностью, а с существованием в клетках всех живых организмов специальных систем репарации, устраняющих из ДНК возникающие в ней повреждения.

Явление репарации, или восстановления жизнеспособности клетки, после действия на нее γ - и рентгеновых лучей было от-

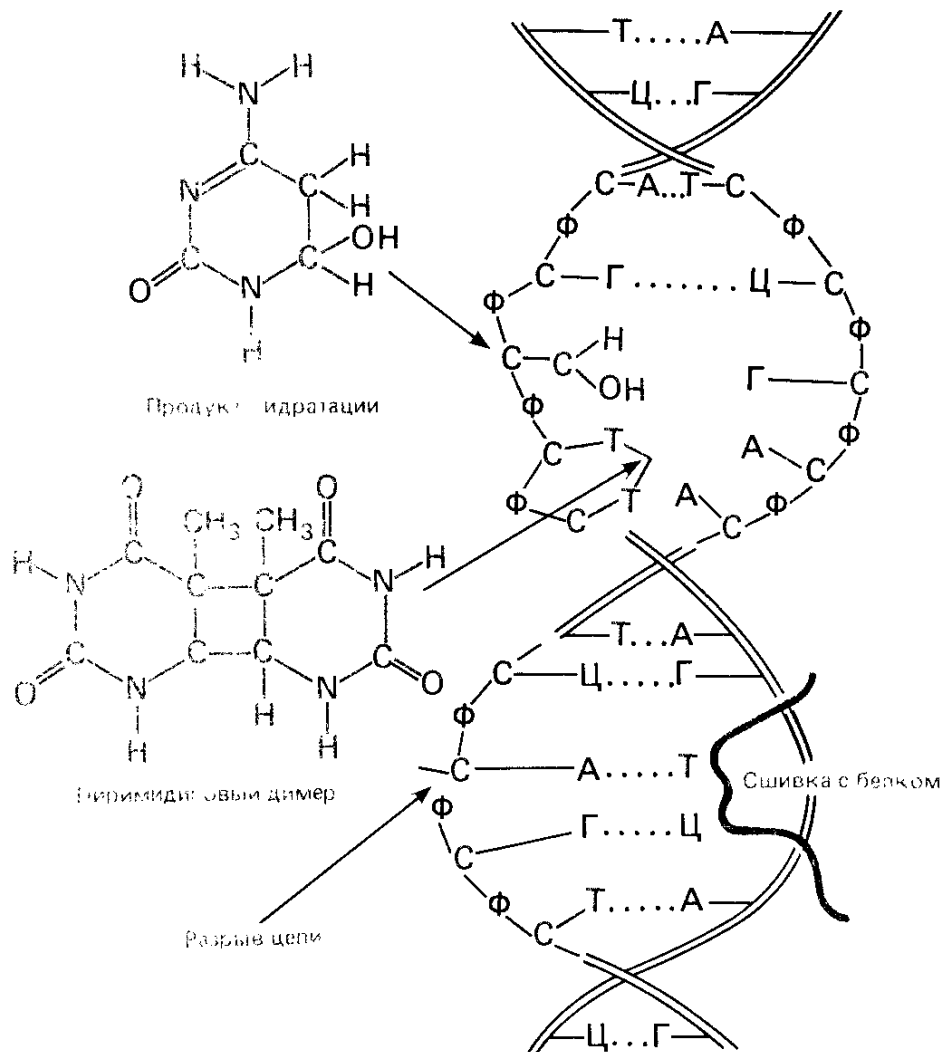


Рис. 6.15. Основные типы повреждений, обнаруженные в ДНК, экстрагированной из клеток, облученных ультрафиолетовым светом (по К. Смит, Ф. Хэнеуолту, 1972):

С — сахар, Ф — фосфат

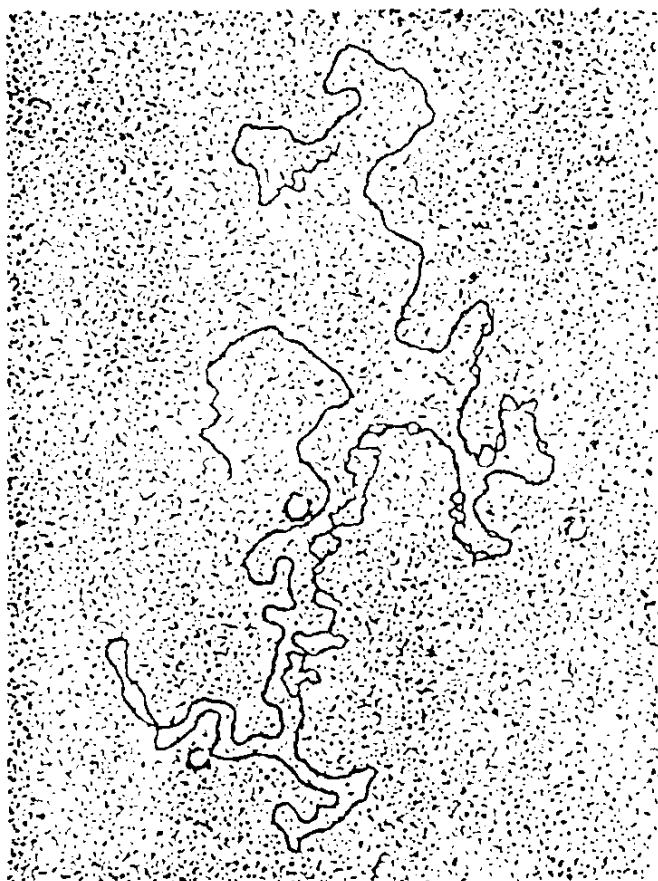


Рис. 6.16. Локальная денатурация (разрыв водородных связей) ДНК бактериофага λ , подвергнутой ультрафиолетовому облучению (R. S. Stafford, D. P. Allison, R. O. Rahn, 1975)

крыто в 1958 г. В. И. Корогодиным у диплоидных дрожжей. Повреждения ДНК, возникающие при действии излучений и химических агентов, в конечном счете приводят к нарушению регулярной Уотсон-Криковской структуры (рис. 6.15), что выражается в локальной денатурации молекулы (рис. 6.16) и приводят к частичному или полному блокированию репликации. Именно такие нарушения конформации, а не конкретные изменения мономеров служат мишенью для большинства систем репарации ДНК.

В настоящее время выявлены три основных механизма репарации ДНК: *фотореактивация*, *эксцизионная репарация* и *пострепликативная репарация* (рис. 6.17). Последние два типа называют также темновой репарацией.

Фотореактивация

Явление фотореактивации заключается в восстановлении биологической активности клеток или молекул ДНК, поврежденных ультрафиолетовым излучением в результате последующего воздействия видимого света.

При фотореактивации происходит мономеризация циклобутановых димеров тимина и других пиримидиновых димеров *in situ*. Известна так называемая неферментативная коротковолновая фотореактивация, которая заключается в мономеризации димеров при действии ультрафиолетового света с длиной волны 240 нм, а также ферментативная фотореактивация. Именно последнюю обычно и подразумевают под собственно фотореактивацией.

Фотореактивация при действии видимого света (300—400 нм — наиболее активная часть спектра) была обнаружена в 1949 г. в нескольких лабораториях. Механизм этого явления был раскрыт в начале 60-х годов нашего века после выделения К. Рупертом из клеток микроорганизмов фермента фотореактивации — *дезоксирибопиримидинфототиазы*. Экстракты дрожжей оказались способными восстанавливать трансформирующую активность ДНК *Haemophyllum influenzae* на свету.

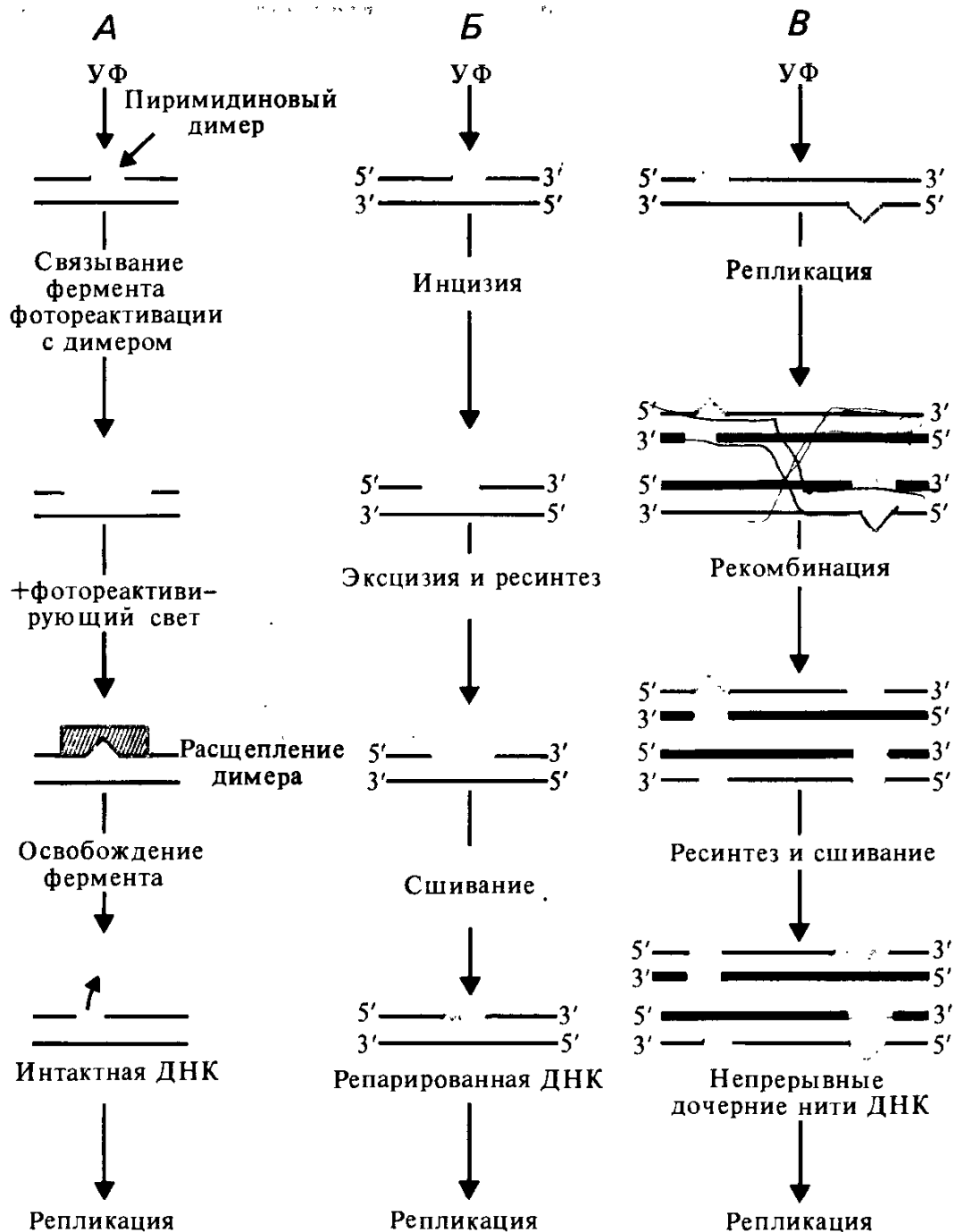


Рис. 6.17. Схема механизмов репарации на примере пострадиационного (УФ) восстановления структуры ДНК (по Р. Hanawalt, 1975, Е. Witkin, 1976):

А — фотореактивация; Б — эксцизионная репарация; В — пострепликационная репарация

Субстратом фермента фотореактивации служат димеры пиримидиновых оснований, с которыми он образует комплекс в темноте (с неповрежденной ДНК фермент не связывается). На свету комплекс распадается, при этом происходит мономеризация димеров. В клетке эукариот фермент локализован в ядре, у прокариот — в непосредственной близости к нуклеоиду. В частности, он не обнаруживается в безнуклеоидных миниклетках, которые образуют некоторые мутанты *E. coli*.

Известен мутант *phg E. coli*, у которого блокирована фоторе-

активация. При облучении видимым светом у этого мутанта не исчезают тиминовые димеры из ДНК.

Фермент фотореактивации широко распространен в природе и обнаружен даже у таких примитивных свободноживущих микроорганизмов, как микоплазмы, найден он в клетках многих высших растений и животных. Он есть у всех изученных бактерий, за исключением *Micrococcus radiodurans*, который тем не менее чрезвычайно устойчив к действию ультрафиолетового света: он выдерживает дозы, в 1000 раз более высокие, чем те, которые убивают *E. coli*. При полном отсутствии способности к фотореактивации *M. radiodurans* обладает мощной системой эксцизионной репарации.

Эксцизионная репарация

Эксцизионную репарацию, т. е. связанную с удалением поврежденного участка ДНК, называют также репарацией по типу выщепления — замещения или более образно «механизм режь — латай» (рис. 6.17). Эксцизионная репарация не столь специфична в отношении повреждений ДНК, как фотореактивация, тем не менее наиболее подробно изучена именно репарация ДНК, содержащей тиминовые димеры. Этому способствовало то обстоятельство, что возможность фотореактивации клеток — критерий присутствия тиминовых димеров в ДНК. Появление димеров приводит к локальной денатурации ДНК, что влечет за собой нарушение процесса репликации: каждый тиминовый димер в ДНК *E. coli* задерживает репликацию на 10 с.

Доказательство существования и изучение механизма эксцизионной репарации стало возможным благодаря получению мутантов *E. coli*, чувствительных к летальному действию ультрафиолетового света. Если штаммы *E. coli*, устойчивые к ультрафиолетовому свету, инкубировать в темноте после облучения, то из их ДНК удаляются тиминовые димеры. У мутантов, чувствительных к ультрафиолетовому свету, этого не происходит.

Эксцизионная репарация представляет собой многоэтапный процесс и заключается в: 1) «узнавании» димера, 2) надрезании одной цепи ДНК вблизи димера — инцизии, 3) удалении димера — эксцизии, 4) ресинтезе ДНК и 5) восстановлении непрерывности репарируемой цепи за счет образования ковалентных связей сахарофосфатного скелета молекулы (рис. 6.17).

«Узнавание» повреждения в ДНК осуществляет фермент УФ-эндонуклеаза, который реагирует не только на димеры тимина, но и на многие другие изменения, приводящие к локальному нарушению структуры ДНК. Эндонуклеаза ответственна и за инцизию, т. е. надрезание одной цепи ДНК (разрыв фосфодиэфирных связей) непосредственно около димера с 5'-конца в поврежденной цепи. Эксперименты *in vitro* с облученной ДНК показали, что число одонитевых разрывов оказывается равным числу димеров в молекуле.

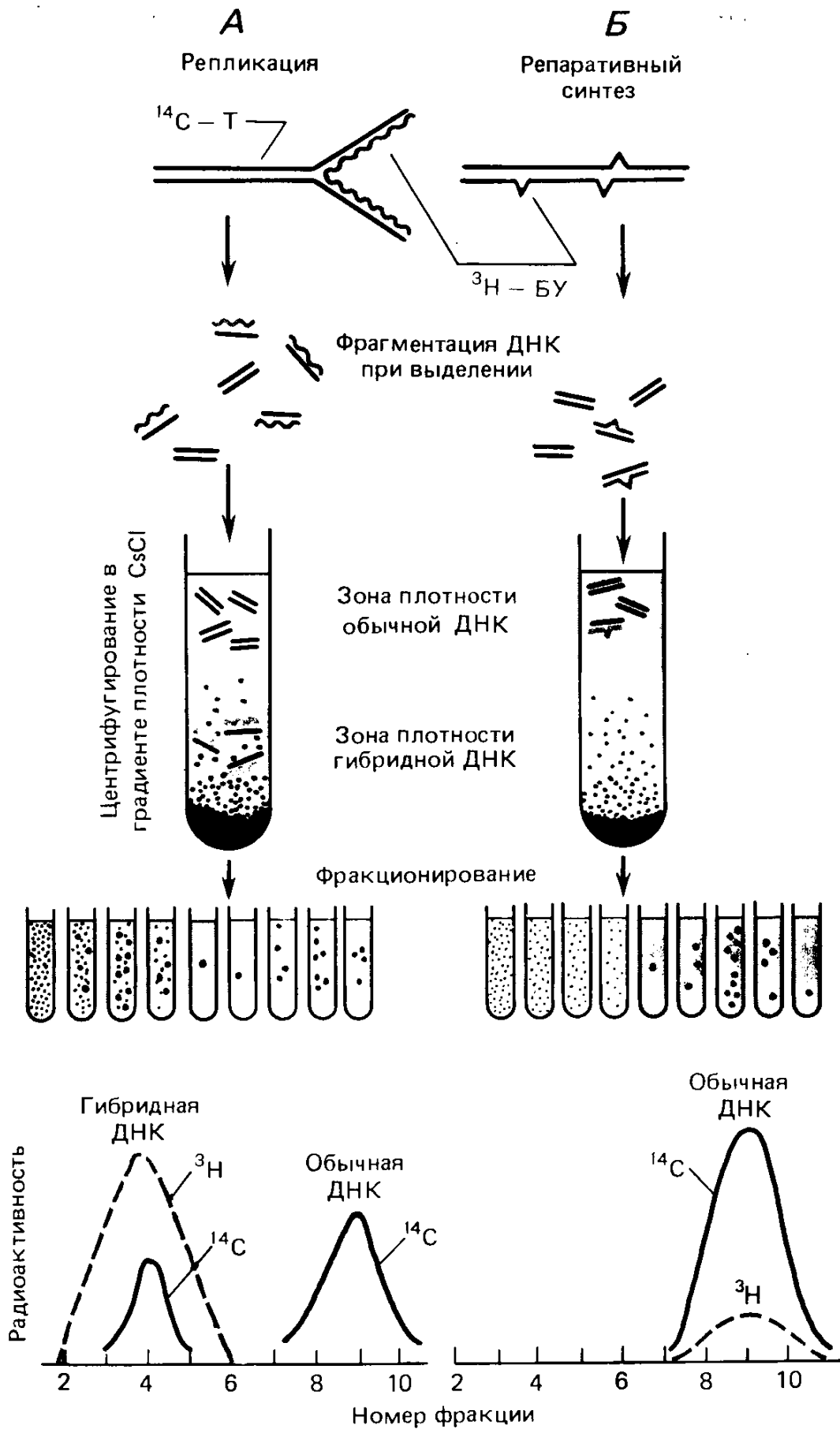


Рис. 6.18. Схема опыта Д. Петтиджона и Ф. Хэнеулта, доказывающая существование репаративного синтеза ДНК в клетках *E. coli*, облученных ультрафиолетовым светом (по К. Смит, Ф. Хэнеулту, 1972):

A — репликативный синтез ДНК; B — репаративный синтез ДНК

Эксцизию, или вырезание димера из молекулы ДНК, осуществляет другая нуклеаза. Димер удаляется в составе короткого олигонуклеотида (3—5 оснований), что может сопровождаться дальнейшей деградацией поврежденной спирали. Продукты деградации облученной ДНК, содержащие тиминные димеры, можно обнаружить в клетках. У некоторых бактерий димеры находили и в культуральной среде. Деградацию ДНК осуществляет АТФ-зависимая ДНКаза. В результате эксцизии и последующей деградации ДНК образуются однонитевые бреши, или пробелы.

Ресинтез ДНК, в результате которого заполняются бреши, идет с использованием в качестве матрицы интактной цепи. Такой репаративный синтез ДНК напоминает «дополнительную» репликацию, обнаруженную в пахитене у эукариот. Прямое доказательство репаративного синтеза у бактерий получили Д. Петтиджон и Ф. Хэнзуолт, использовавшие для этой цели метод М. Мезельсона и Ф. Сталя (рис. 6.18).

ДНК *E. coli* метили ^{14}C , выращивая клетки в присутствии радиоактивного тимина, а затем изучали репликацию в присутствии 5-бромурацила, меченого ^3H . В результате нормальной репликации (рис. 6.18, А) при центрифугировании в градиенте плотности можно наблюдать смещение пика распределения молекул: при этом бромурацил играет роль плотностной метки. В соответствии с этим гибридные молекулы ДНК оказываются мечеными ^{14}C и ^3H . При изучении тем же методом ДНК, выделенной из облученных клеток, обнаруживали только один пик, соответствующий по плотности исходным молекулам. Тем не менее эти молекулы содержали как ^{14}C , так и небольшое количество ^3H (рис. 6.18, Б).

Этот пик радиоактивности появлялся вследствие включения 5-бромурацила в ДНК в ходе репаративного синтеза. Однако фрагменты ДНК, содержащие 5-бромурацил, столь невелики (в среднем пять нуклеотидов на один димер), что не влияют на плавучую плотность молекул, извлекаемых из клетки. Подтверждением предложенного объяснения наблюдаемой картины служило, во-первых, то, что фотореактивация снимала ресинтез ДНК: исчезал дополнительный пик радиоактивности ^3H ; во-вторых, репаративный синтез не отмечался у мутантов, не способных выщеплять димеры тимина. Механизм синтеза ДНК, наблюдаемый в ходе репарации после ультрафиолетового облучения, получил наименование *неполуконсервативного*.

Основной фермент, ответственный за эксцизию димеров и репаративный синтез ДНК, — это ДНК-полимераза I, кодируемая геном *pol A*. Тем не менее у мутантов *pol A*, дефектных по ДНК-полимеразе I, все же наблюдается остаточный репаративный синтез, который связан с активностью ДНК-полимеразы II.

Известно, что неполуконсервативный синтез ДНК в 99% случаев происходит на коротких участках длиной до 30 нуклеотидов. За эту реакцию ответственна ДНК-полимераза I. В 1% случаев синтез идет на гораздо более длинных отрезках — 1000—1500 нук-

леотидов. По-видимому, эту реакцию и осуществляет ДНК-полимераза II.

Последний этап эксцизионной репарации заключается в *восстановлении непрерывности* репарируемой цепи ДНК с помощью фермента ДНК-лигазы, кодируемого геном *lig E. coli*. Температурочувствительные мутанты по этому гену не способны не только завершать процесс эксцизионной репарации в непермиссивных условиях, но и накапливают фрагменты Оказаки при репликации ДНК.

Различные варианты эксцизионной репарации широко распространены у про- и эукариотических организмов. Она обнаружена у простейших (например, *Tetrachimena pyriformis*), в культуре клеток млекопитающих. Удаление тиминовых димеров из клеток млекопитающих сопровождается так называемым внеплановым синтезом ДНК, который происходит по репаративному типу: вне S-фазы клеточного цикла. Он аналогичен пахитенному синтезу ДНК в мейозе. Внеплановый синтез ДНК показан в зародышевых клетках и на постмейотических стадиях гаметогенеза у самцов мыши после действия этилметансульфоната. В ходе эксцизионной репарации у млекопитающих включается в среднем 20 новых нуклеотидов на каждый тиминный димер. Известна мутантная линия клеток китайского хомячка с ослабленным (по сравнению с исходной линией) внеплановым синтезом ДНК, проявляющая повышенную чувствительность к ультрафиолетовому свету.

Нарушения процессов репарации ДНК обнаружены у людей, пораженных наследственным заболеванием — пигментной ксеродермой. Известно несколько типов этой болезни: ХРI, ХРII, ХР_{var}, общими симптомами которой служит повышенная чувствительность к солнечному свету, приводящая к развитию рака кожи. Культура клеток больных ХРI чувствительна к ультрафиолетовому свету, но не к ионизирующим излучениям. У этих больных дефект эксцизионной репарации связан с отсутствием активности УФ-эндонуклеазы. В культуре клеток здоровых людей после облучения ультрафиолетовым светом в дозе 10 Дж/м² через 20 ч из ДНК исчезает до 90% тиминных димеров (со скоростью 40 000 димеров в час), в то время как в клетках больных ХРI димеры вообще не удаляются из ДНК.

Тип ХРII чувствителен как к ультрафиолетовому, так и к рентгеновскому излучениям. Клетки ХРII не способны репарировать ДНК, имеющую односторонние разрывы. По-видимому, это связано с отсутствием в них фермента, аналогичного ДНК-полимеразе I *E. coli*. Наконец, в клетках больных третьего типа — ХР_{var} выщепление димеров тимина идет нормально, а дефект связан с иным типом репарации — пострепликативной.

Пострепликативная репарация

Этот тип репарации (см. рис. 6.17) был открыт в клетках мутантов *E. coli*, не способных выщеплять тиминные димеры. В таких клетках после ультрафиолетового облучения происходит

репликация ДНК, хотя и медленнее, чем в клетках дикого типа. У. Рапп и П. Говард-Фландерс показали, что в клетках мутантов *uvr A* после действия ультрафиолетового света синтезируется ДНК с одностранными пробелами, или брешами, причем длина вновь синтезированных фрагментов соответствует среднему расстоянию между возникшими в родительской ДНК тиминовыми димерами. Таким образом, после репликации нерепарированной ДНК против тиминовых димеров образуются бреши, которые, как оказалось, исчезают при последующей инкубации клеток в питательной среде. Этот тип репарации не происходит в клетках *rec*-мутантов, дефектных по рекомбинации (см. гл. 7). Поэтому пострепликативную репарацию называют также *рекомбинационной репарацией*.

Механизм пострепликативной репарации наименее специфичен, так как здесь отсутствует этап узнавания повреждения. Представления об этом типе репарации связаны со знанием механизма рекомбинации (см. гл. 7). Рекомбинационная пострепликативная репарация — это быстрый способ восстановления нативной структуры по крайней мере части дочерних молекул ДНК. При этом тиминовые димеры остаются в исходных родительских нитях. Эта репарация происходит уже в первые минуты после облучения.

Существует и другая разновидность — медленная пострепликативная репарация, для осуществления которой требуется несколько часов. Ее проводит система ферментов, которых нет в необлученных клетках и которую индуцирует облучение. Этот механизм получил наименование *SOS-репарации*. Его характерная черта — неточность восстановления первичной структуры ДНК, в связи с чем он получил также название *репарации, склонной к ошибкам*. При этом, по мнению ряда авторов, возможен репаративный синтез ДНК «в обход» тиминовых димеров, или, точнее, за счет использования в качестве матрицы цепи ДНК, содержащей димеры.

Пострепликативная репарация существует не только у бактерий, но и в клетках эукариот. Она обнаружена и у млекопитающих, для которых получены данные о том, что пострепликативные бреши могут заполняться не за счет рекомбинации, а за счет синтеза ДНК *de novo*. Уже упоминалось о том, что один из типов пигментной ксеродермы у человека (XP_{var}) связан с блоком пострепликативной репарации.

Ограничимся рассмотрением репарации ДНК только на примере восстановления структуры молекул, облученных ультрафиолетовым светом. ДНК, поврежденная ионизирующим излучением, также может быть восстановлена системами репарации. При этом устраняются одностранные и двунитевые разрывы. Многие этапы восстановления ДНК после действия ультрафиолетового света и ионизирующих излучений одинаковы, однако есть и существенные различия, как, например, при устранении двунитевых разрывов.

6.5. Компактизация ДНК и структура хроматина

Очень длинные молекулы ДНК упакованы в клетке в небольшом объеме. Например, у *E. coli* в клетке диаметром в несколько микрометров находится молекула ДНК длиной около 1 мм ($4 \cdot 10^6$ п. н.). Общая длина ДНК хромосом человека (около 1,8 м) упакована в ядре диаметром меньше одного микрометра. Это означает, что в клетке ДНК компактизована.

У бактерий ДНК уложена в несколько десятков петель или доменов, удерживаемых молекулами РНК. В пределах каждого домена ДНК суперспирализована (рис. 6.19). Так образуется компактный нуклеоид, фиксированный на мембране. Бактериальная «хромосома» практически не содержит белков в качестве структурных компонентов.

Значительно сложнее организованы хромосомы эукариот. Основная структурная единица хроматина — нуклеосома. Ядро нуклеосомы составляют четыре типа гистонов: Н2А, Н2В, Н3 и Н4.

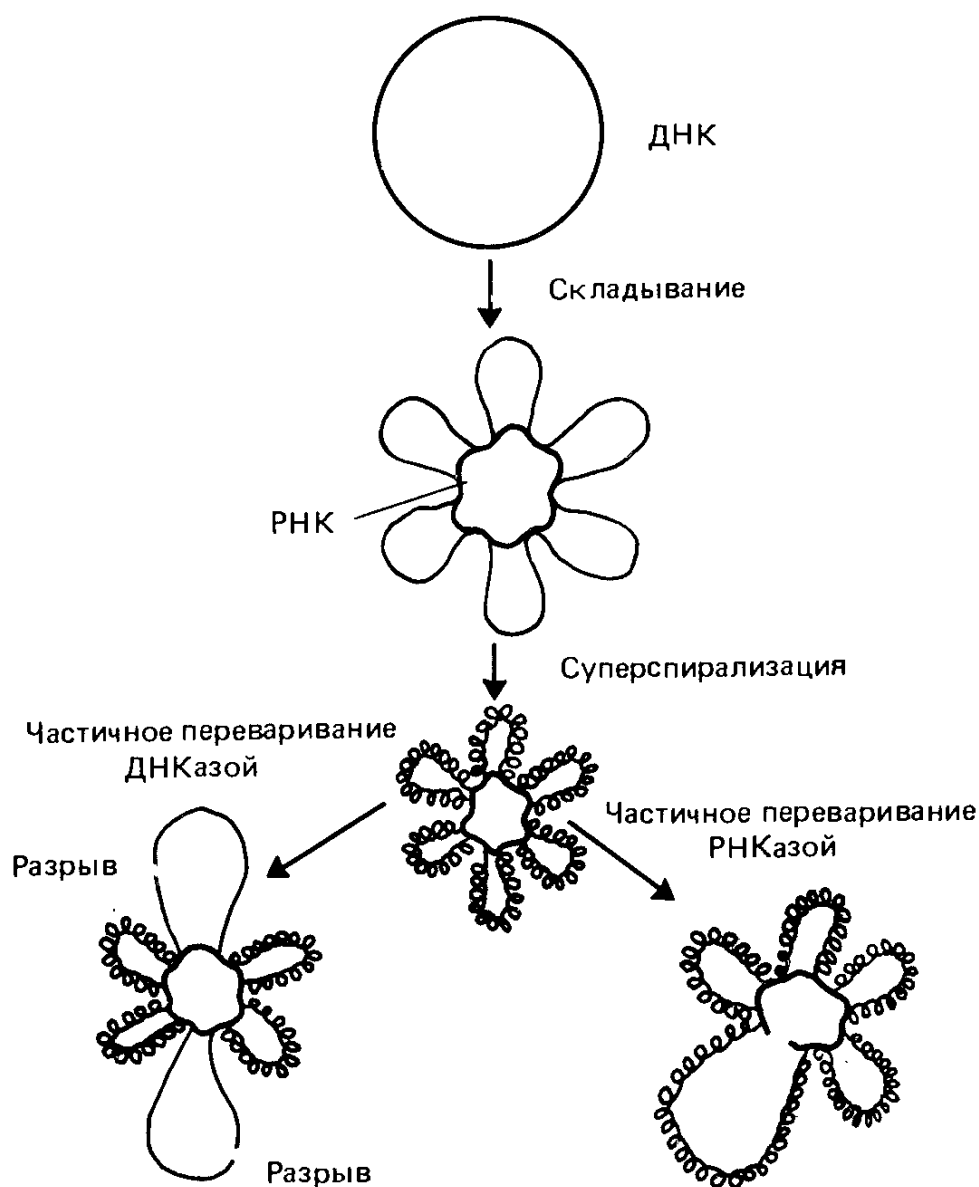


Рис. 6.19. Схема укладки ДНК в нуклеоиде *E. coli* (по D. E. Pettijohn, 1974)

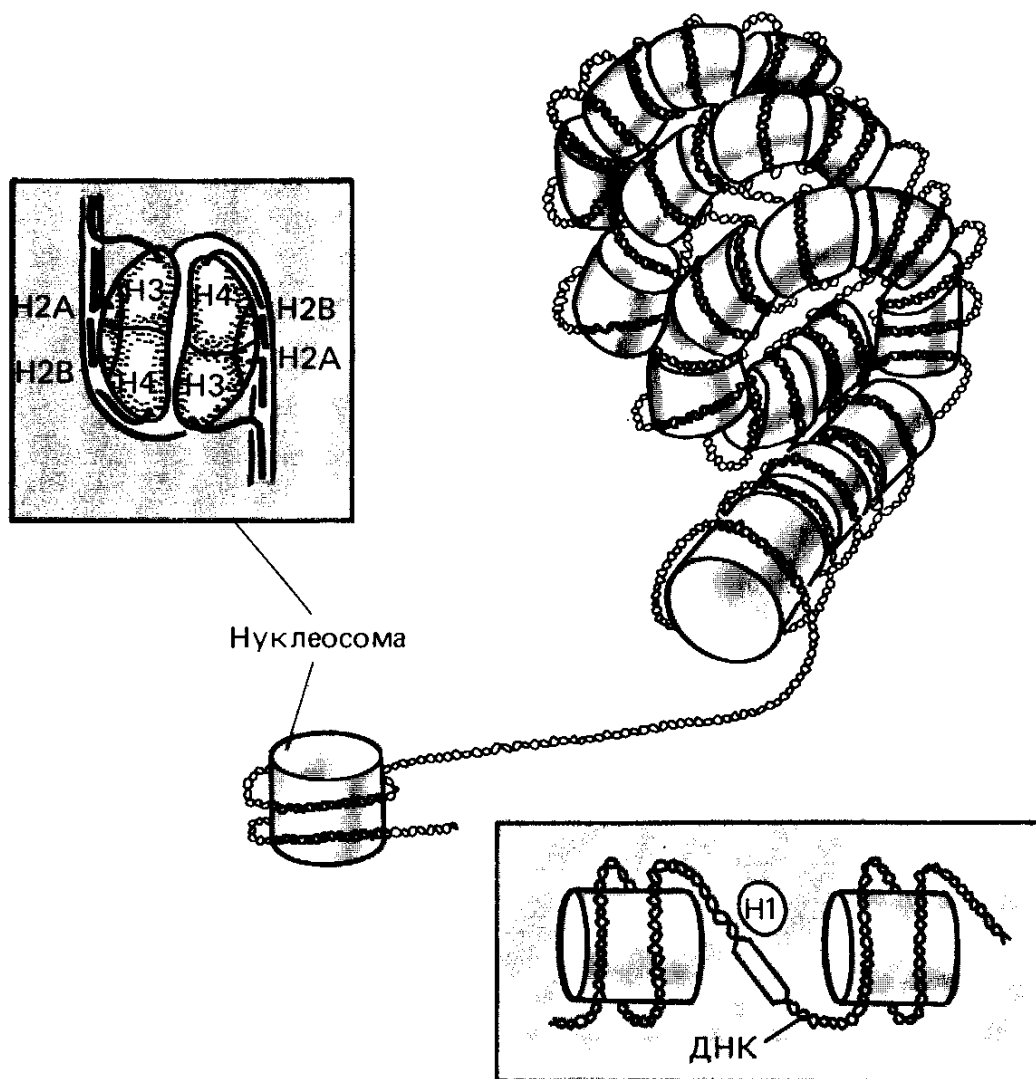


Рис. 6.20. Схема строения нуклеосом и их укладки в структуру соленоида

Молекула каждого из них в общем октамере повторена дважды. Участок ДНК длиной в 140 п. н. вокруг гистонного октамера делает 1,75 витка. Диаметр нуклеосомы около 10 нм. Еще одна молекула гистона Н1 ассоциирована с комплексом: гистоновое ядро—ДНК и служит для стабилизации спиральной наднуклеосомной структуры — *соленида* диаметром около 300—500 нм (рис. 6.20).

В интерфазном ядре соленидная структура в свою очередь уложена в спираль диаметром около 2000 нм. Переход от интерфазного хроматина к метафазным хромосомам, по-видимому, сопровождается возникновением еще одного уровня спирализации с образованием структур диаметром около 6000 нм. При этом следует помнить, что укладка хроматина в разных участках хромосом (эухроматин, гетерохроматин, зоны первичной и вторичной перетяжек и т. д.) может варьировать.

Таким образом, нуклеосомная и наднуклеосомная структуры хроматина способствуют компактизации ДНК.

6.6. Уникальные и повторяющиеся последовательности в ДНК

Как уже упоминалось, двойную спираль ДНК можно расплавить (денатурировать), нагревая раствор ДНК до температуры 100°C. При этом комплементарные цепи вследствие разрыва водородных связей расходятся. При постепенном охлаждении раствора комплементарные цепи могут вновь ассоциировать, восстанавливая структуру двойной спирали.

Этот подход используют для выяснения присутствия в ДНК повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Если таковые имеются, то некоторая фракция ДНК будет ренатурировать быстрее, поскольку соответствующим одноцепочечным участкам легче найти партнера. Участки ДНК, представленные уникальными последовательностями, ренатурируют медленнее.

ДНК бактерий почти не содержит повторов, в то время как в ДНК эукариот повторы многочисленны. Так, около 70% ДНК мыши представлены уникальными последовательностями, около 10% содержат очень часто повторяющиеся (до 10^6 раз) участки. Остальные 20% ДНК — это нуклеотидные последовательности, повторяющиеся умеренно — от 10^2 до 10^5 раз на геном (табл. 6.3).

Таблица 6.3. Уникальные и повторяющиеся последовательности (доля) в геноме некоторых эукариот (по F. Ayala, J. Kiger, 1980)

Организм	Частота последовательностей			
	уникальных	умеренно повторяющихся*	часто повторяющихся**	очень часто повторяющихся***
<i>Nassaria obsoleta</i> (улитка)	0,38	>0,12	>0,15	0,18
Корова	0,55	—	0,38	0,05
<i>Xenopus laevis</i> (лягушка)	0,54	0,06	0,31	0,09
<i>Strongilocentrotus purpuratus</i> (морской еж)	0,38	0,25	0,27	0,10
<i>Drosophila</i>	0,75	—	0,15	0,10

Примечание. * 20—50 копий, ** 250—6000 копий, *** до 10^6 копий.

Принято считать, что подавляющее большинство функционирующих генов является уникальными последовательностями. Из этого правила есть исключения. Это, в частности, гены, кодирующие структуру гистонов и рРНК, которые располагаются в виде тандемных повторов. Большинство умеренно повторяющихся последовательностей не функционирует в качестве матриц, т. е. не транскрибируется. У дрозофилы и мыши повторяющиеся последо-

вательности очень часто представлены короткими участками — около 10 п. н. Большая часть повторов, по-видимому, играет структурную или регуляторную роль. Они локализованы преимущественно в прицентромерном гетерохроматине.

6.7. Искусственные хромосомы

С помощью методов генной инженерии (см. гл. 11) синтезированы искусственные хромосомы по крайней мере для одного эукариотического организма — дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эти хромосомы включают следующие необходимые компоненты.

1. Участок начала репликации ДНК — *репликатор* или *ARS* (от англ. *autonomously replicating sequence*). Приблизительно 400 таких участков рассеяны по хромосомам дрожжей, содержащим около $17,5 \times 10^6$ п. н. Эти *ARS*-последовательности обеспечивают воспроизведение различных репликонов. Первичная структура репликаторов (при сравнении нескольких из них) включает общую последовательность в 11 п. н.:



Здесь представлена только одна цепочка ДНК, а под ней — обнаруженные варианты этой последовательности. Репликаторы видоспецифичны.

2. Нуклеотидную последовательность одной из 17 центромер дрожжей. Дрожжевые центромеры (их исследовано более 10) имеют ряд общих характеристик, как это показано для центромер хромосом 3, 4, 6 и 11 (рис. 6.21). Все они представлены отрезком ДНК длиной около 1000 п. н. и содержат район, обогащенный парами АТ (93—94 %) размером 82—89 п. н. Этот район ограничивают: справа консервативный (мало варьирующий) участок в 11 п. н., слева — менее консервативный в 14 п. н. Структура правого участка очень существенна для функционирования центромеры. Его потеря или даже отдельные замены пар нуклеотидов препятствуют нормальному распределению соответствующей хромосомы.

По-видимому, все эти три участка вместе составляют структуру, «опознаваемую» белками нитей веретена. Центромеры дрож-

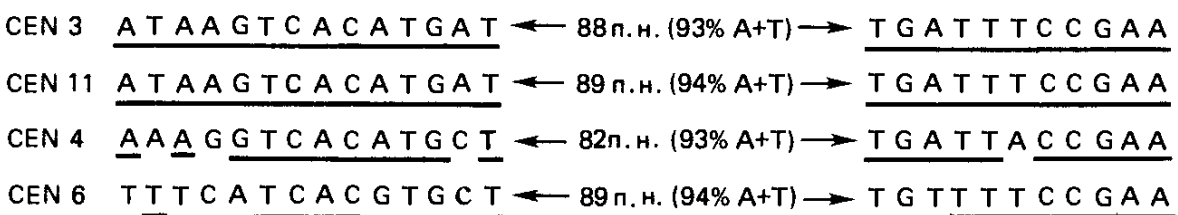


Рис. 6.21. Последовательность элементов общих для четырех центромер дрожжей *Sacch. cerevisiae* (из J. Corbon, 1984).

Представлена только одна из двух комплементарных цепей ДНК. Общие последовательности нуклеотидов подчеркнуты

жей *Saccharomyces cerevisiae* видоспецифичны. Они не функционируют в других дрожжах (*Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*), в плесени (*Neurospora crassa*) и в культивируемых клетках животных.

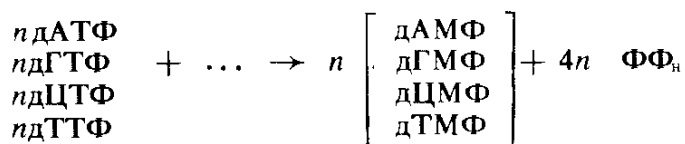
3. Нуклеотидную последовательность теломеры, существенную часть которой — самый конец хромосомы — составляет несколько десятков раз повторенный тетра-нуклеотид СССА (показана только одна цепь ДНК). Конец хромосомы замкнут наподобие шпильки и образует Z-форму (левозакрученную) ДНК.

В искусственные хромосомы, имеющие эти три необходимых компонента, обычно включают ген (нормальную, или доминантную аллель), контролирующий какой-нибудь этап метаболизма. Этот ген служит маркером при трансформации штамма дрожжей, мутантного по этому же гену. Подобные искусственные хромосомы, введенные в клетку при помощи трансформации, судя по данным гибридологического анализа, содержатся в ней в виде одной копии, имеют линейную структуру, реплицируются и распределяются в митозе и мейозе преимущественно подобно обычным хромосомам, если они представляют собой молекулы ДНК длиной около 50 000 п. н. Стабильность таких искусственных минихромосом все же значительно уступает стабильности естественных хромосом. Синтетические минихромосомы теряются с частотой 1×10^{-3} , в то время как хромосомы дрожжей утрачиваются с частотой около 1×10^{-5} . При меньших, чем 50 000 п. н., размерах искусственные хромосомы теряются с частотой 1×10^{-2} и более.

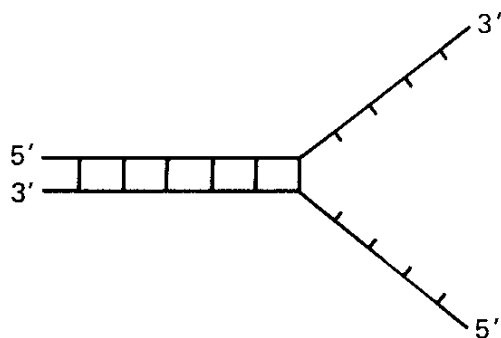
Таким образом, присутствие репликатора, центромеры и теломеры при определенном минимальном размере молекулы ДНК — необходимое и достаточное условие возникновения стабильной хромосомы.

Вопросы к главе 6

1. Каковы доказательства генетической роли нуклеиновых кислот?
2. Схематически изобразите матрицу и затравку при синтезе ДНК в реакции А. Корнберга.
3. Что служит затравкой при репликации ДНК в клетке?
4. Сформулируйте правило Чаргаффа. Что такое коэффициент нуклеотидной (или видовой) специфичности?
5. Сколько типов ДНК-полимераз содержится в клетке кишечной палочки?
6. Что такое фрагменты Оказаки?
7. Какие пуриновые и пиримидиновые основания входят: а) в ДНК и б) в РНК.
8. Что это за уравнение реакции и что в нем пропущено?



9. Учитывая, что ДНК-полимераза наращивает полидезоксирибонуклеотид только в одном направлении, изобразите на схеме вилки репликации: по какой цепи пойдет непрерывный, а по какой — прерывистый синтез комплементарной цепи:



10. У каких организмов РНК выполняет роль генетического материала? Как это доказано?

11. Каким образом эксперимент М. Мезельсона и Ф. Сталя позволяет различить дисперсный и полуконсервативный механизмы репликации ДНК?

12. Какие белки «работают» в вилке репликации *E. coli*?

13. Какие типы репарации: а) не нарушают целостности двойной спирали ДНК? б) приводят к появлению одноцепочечных участков?

14. Какова функция гистона H1?

15. Какие элементы необходимы для обеспечения стабильности хромосом? Достаточны ли эти элементы для их стабильности?

Глава 7

Механизмы рекомбинации

Рекомбинация генов осуществляется различными способами. Этот процесс может быть связан с перераспределением целых хромосом. Такой механизм в соответствии с третьим законом Г. Менделя обеспечивает независимое наследование несцепленных генов и признаков. В дальнейшем будет показана рекомбинация генов хромосом и нехромосомных генов (см. гл. 10). Чаще всего рекомбинацию в узком смысле слова связывают с кроссинговером, т. е. с перекомбинацией генов, локализованных в гомологичных хромосомах. Этому типу рекомбинации в основном и посвящена настоящая глава.

7.1. Цитологическая демонстрация кроссинговера

В профазе I мейоза на стадии диплотены у многих организмов хорошо различимы характерные фигуры, образуемые гомологичными хромосомами, — *хиазмы* (рис. 7.1; см. гл. 4). Еще в 1909 г.

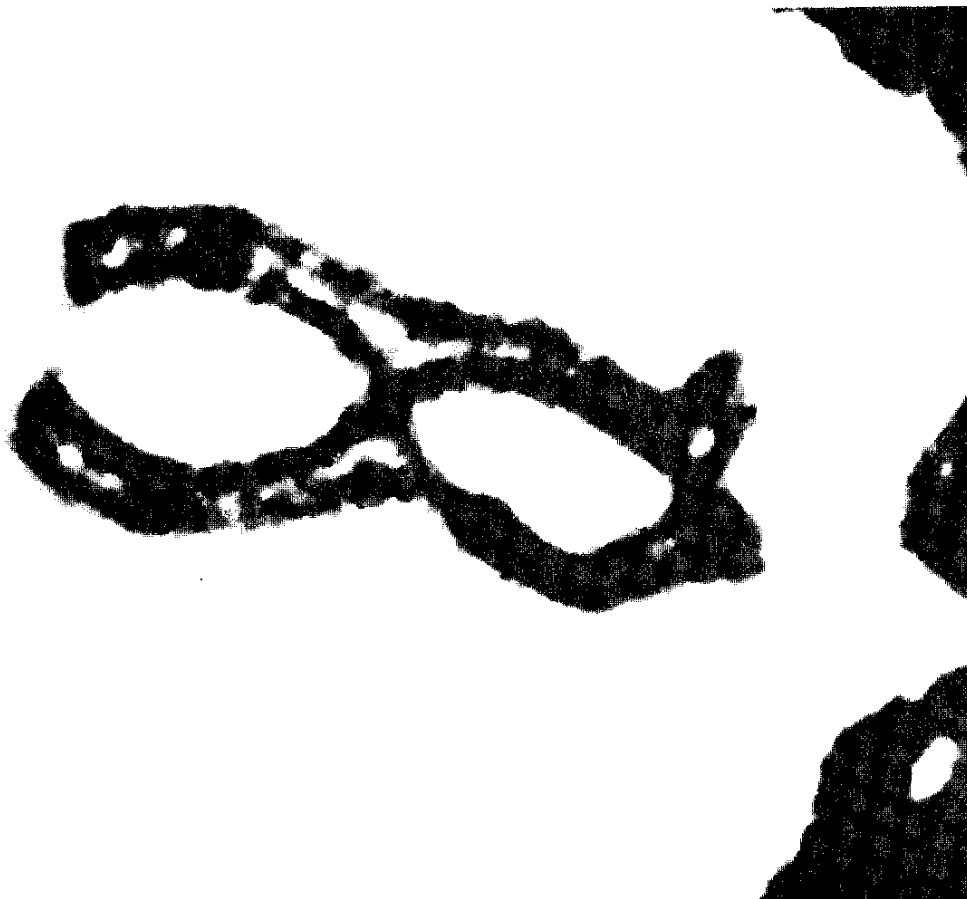


Рис. 7.1. Хиазмы в диплотене в одном из бивалентов у кузнечика (D. Suzuki, A. Griffiths, R. Levontin, 1981)

Ф. Янссенс предположил, что образование хиазм связано с об-
менами гомологичными участками гомологичных хромосом. Позд-
нее Т. Х. Морган связывал хиазмы с кроссинговером, происхо-
дящим согласно гипотезе К. Бриджеса (1915) по *механизму раз-
рыв-воссоединение*.

С. Дарлингтон, исходя из числа хиазм в пахитене, определил
общую длину каждой из хромосом кукурузы. При этом он принял,
что одна хиазма образуется на участке в 50 сМ. Полученный на
основании цитологических данных результат хорошо согласовался
с длинами групп сцепления, вычисленными обычным способом
исходя из частот кроссинговера при гибридологическом анализе.
Параллелизм событий, регистрируемых генетически и цитологи-
чески при рекомбинации сцепленных генов, был продемонстриро-
ван в 1931 г. для двух объектов: кукурузы и дрозофилы. В обоих
случаях был использован следующий принцип: сопоставление ре-
зультатов кроссинговера (появление рекомбинантных классов) с
физическими об-менами гомологичных участков гомологичных хро-
мосом. Очевидно, для такой работы скрещиваемые формы должны
быть дигетерозиготны как по генетическим, так и по цитологиче-
ским маркерам одной пары хромосом.

Харриет Крейтон и Барбара МакКлинтон решили эту проблему
для кукурузы. Была исследована форма дигетерозиготная по ге-

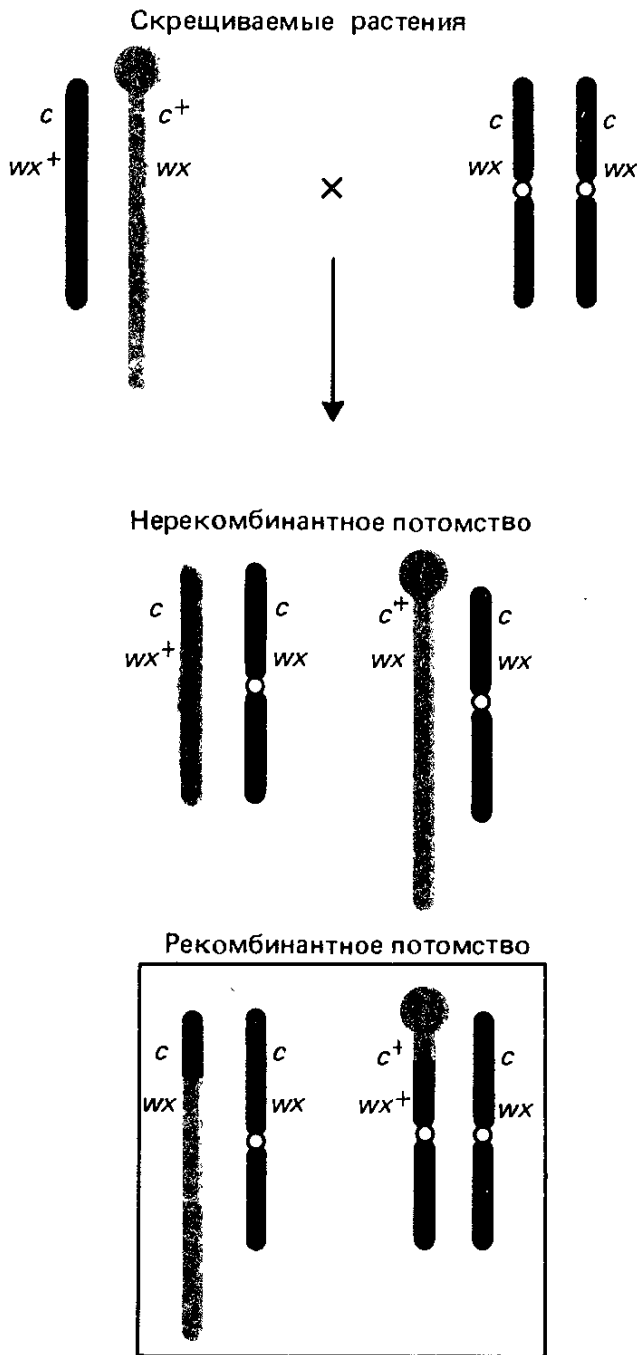


Рис. 7.2. Схема эксперимента Х. Крейтон и Б. МакКлинток, демонстрирующего соответствие между рекомбинацией генов и физическими обмeнами участками гомологичных хромосом у кукурузы.

Выделены рекомбинантные классы потомства, в которых исследовали структуру хромосом

глаза цвета гвоздики, рецессив; cr^+ — нормальная темно-красная окраска глаз, доминант; B (Bar) полосковидные глаза, доминант; B^+ — круглые глаза, рецессив.

Эти же самки несли гетероморфные X-хромосомы: одну сильно укороченную вследствие транслокации ее бесцентромерного участка на четвертую — микрохромосому, другую — Г-образную — вследствие транслокации на нее фрагмента Y-хромосомы. Таких самок скрещивали с самцами, несущими рецессивные аллели ис-

нам (рис. 7.2): c ($colorless$) — бесцветный алейроновый слой эндосперма, рецессив; c^+ — окрашенный, доминант; wx ($waxy$) — эндосперм, а также пыльцевые зерна содержат амилопектин, вследствие чего окрашиваются иодом в красный цвет, рецессив; wx^+ — эндосперм и пыльцевые зерна содержат амилозу, окрашиваемую иодом в синий цвет, доминант.

Кроме того, исследованная форма на одном конце хромосомы несла блок (участок) гетерохроматина, а на другом — транслоцированный участок другой хромосомы. Второй гомолог этих морфологических отличий не имел. В соответствии со схемой рис. 7.2 в потомстве отбирали два реципрокных класса, рекомбинантных по c — wx .

Растения, выращенные из семян этих рекомбинантов, исследовали цитологически и убедились в том, что у всех рекомбинантов по генетическим маркерам произошел физический обмен участками гомологичных хромосом (рис. 7.2).

Сходным образом решил ту же проблему К. Штерн для дрозофилы. Он исследовал расщепление в потомстве от скрещивания самок, дигетерозиготных по генам X-хромосомы: cr ($carnation$)

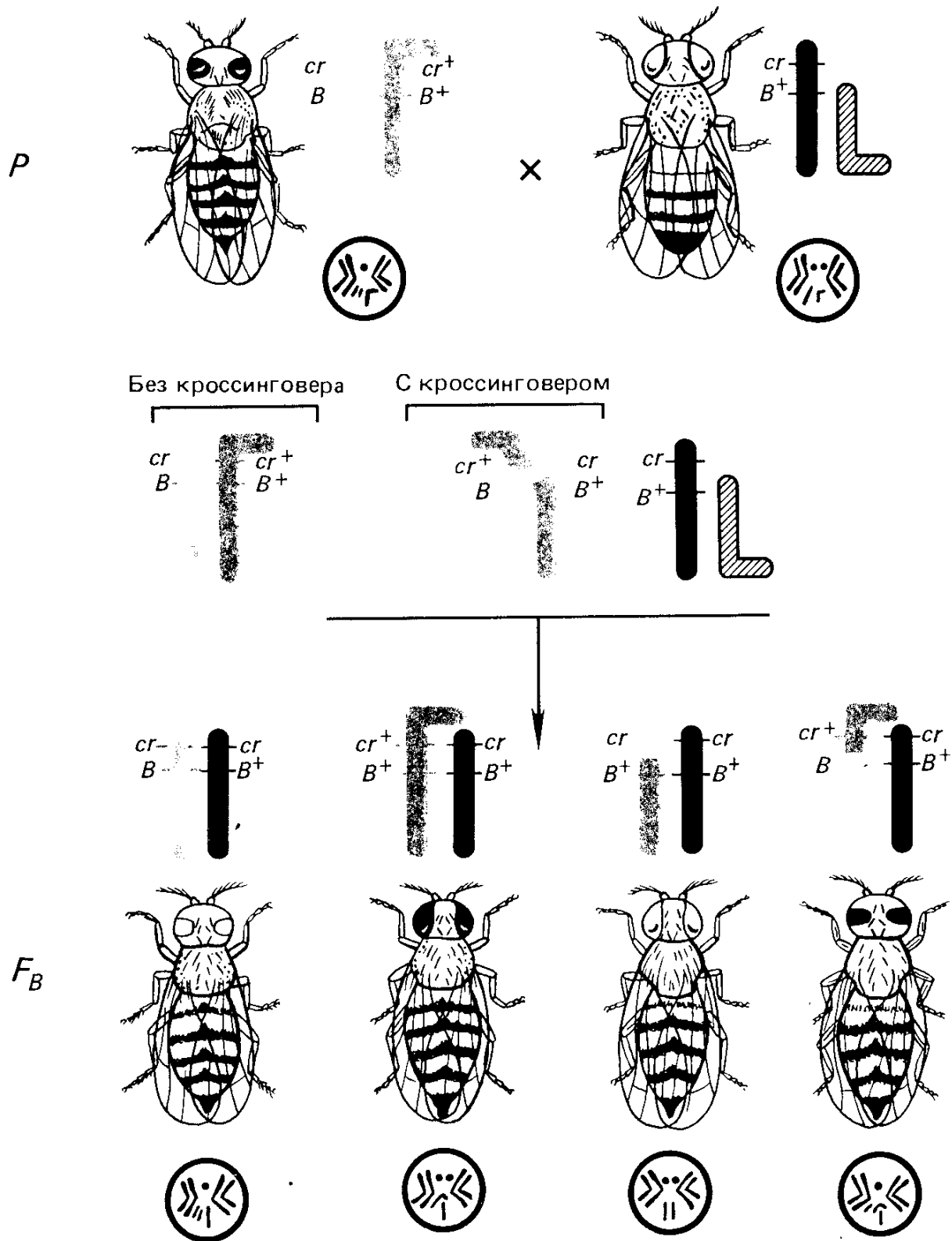


Рис. 7.3. Схема эксперимента К. Штерна, демонстрирующего соответствие между рекомбинацией генов и физическими обмeнами участками X-хромосом у дрозофилы.

В потомстве от скрещивания исследованы только самки (см. пояснение в тексте)

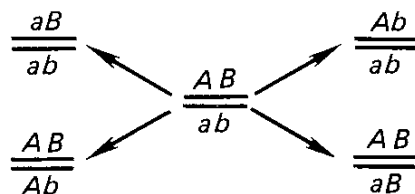
следуемых генов (cr, B^+) в X-хромосоме обычной формы и имевшими обычную Y-хромосому (рис. 7.3). Результат кроссинговера у самок в таком скрещивании — рекомбинантные классы — изучали цитологически. Для этой цели брали только самок, поскольку самцы имеют субметацентрическую, т. е. разноплечую Y-хромосому, которую можно спутать с Г-образной X-хромосомой.

Все четыре класса самок-потомков отличались друг от друга по фенотипу: нерекомбинантные: $\frac{cr B}{cr B^+}$, $\frac{cr^+ B^+}{cr B^+}$ и рекомбинантные

$\frac{cr B^+}{cr B^+}$ и $\frac{cr^+ B}{cr B^+}$, а также по структуре своих X-хромосом (рис. 7.3).

Благодаря этому, исследовав 374 самки, К. Штерн показал, что кроссинговер между генами cr и B сопровождался физическим обменом между X-хромосомами.

Итак, эксперименты Х. Крейтон и Б. МакКлинтон с кукурузой, а К. Штерна с дрозофилой доказали, что в основе кроссинговера лежит реальный обмен участками гомологичных хромосом, однако механизм этого обмена оставался неясным. Наряду с гипотезой К. Бриджеса (механизм разрыв — слияние) рассматривался и другой механизм, предложенный Дж. Беллингом (1933), изучавшим мейоз у растений. Согласно этой гипотезе разрывов и перевоссоединения хромосом не происходит, а кроссинговер приурочен к стадии воспроизведения хромосом. При этом, как считал Дж. Беллинг, сначала воспроизводятся хромомеры, а затем их соединяют хрономемы. Такое соединение может привести к рекомбинантным сочетаниям хромомеров. В 1930 г. Х. Винклером была предложена еще одна гипотеза, согласно которой в потомстве дигетерозиготы рекомбинантные классы могут появляться вследствие направленных изменений аллелей под влиянием друг друга — гипотеза конверсии:



Тетрадный анализ у грибов показал, что подобные изменения, как правило, не происходят. Не согласовывались с этой гипотезой и данные цитологического изучения результатов кроссинговера. Однако окончательное выяснение механизма реципрокных обменов и доказательство физического обмена участками родительских молекул ДНК при рекомбинации было получено значительно позже — в 1961 г. в эксперименте М. Мезельсона и Дж. Уэйгла, изучавших рекомбинацию у бактериофага λ .

В этом эксперименте использовали биологические (генетические) и физические (изотопы ^{14}C и ^{15}N) маркеры, по которым контролировали физические обмены участками генетического ма-

териала при рекомбинации. (Подробнее этот материал излагается в курсе «Молекулярная генетика».)

Доказательство справедливости гипотезы разрыв—воссоединение было получено также Дж. Тэйлором в 1967 г. для кузнечика, которое будет приведено в следующем разделе.

7.2. Кроссинговер на стадии четырех хроматид

Теоретически допустимо, что кроссинговер происходит как до репликации хромосом — на стадии двух нитей, так и после их репликации — на стадии четырех нитей. Решить эту альтернативу позволяет *тетрадный анализ*, поскольку при этом подходе возможно исследование всех четырех продуктов каждого мейоза. Одним из наиболее удобных объектов для тетрадного анализа является гаплобионт хлебная плесень — *Neurospora crassa* (рис. 7.4).

Особенность мейоза у этого объекта состоит в совпадении направления веретена I и II деления мейоза с длинной осью аска, или сумки, в которой располагаются затем гаплоидные аскоспоры. Четыре гаплоидных ядра после мейоза еще раз делятся митотически, в результате чего в аске в ряд располагаются четыре пары гаплоидных спор, а генотип каждой пары спор идентичен.

Если бы кроссинговер происходил на стадии двух нитей, то в тетрадах (октадах) аскоспор нейроспоры, получаемых при дигибридном скрещивании, можно было бы ожидать расположения аскоспор, показанного на рис. 7.5, А, однако такие случаи при тесном сцеплении генов крайне редки и причина их появления связана с определенными типами двойных обменов, о чем будет сказано далее. Как правило, кроссоверные аскоспоры содержатся в тетрадах (октадах) с расположением аскоспор, показанных на рис. 7.5, Б, где рассмотрены последствия кроссинговера на стадии четырех нитей. Благодаря тому, что расхождение центромер у *N. crassa* ориентировано по длине аска, а у аска различают базальный и апикальный концы, доказательство того, что кроссинговер идет на стадии четырех нитей, можно получить и при рассмотрении моногибридного скрещивания. При скрещивании штаммов, различающихся по аллелям только одного гена *B/b*, всегда имеется еще один маркер, в качестве которого служит направление расхождения центромер при двух делениях мейоза. Порядок расположения аскоспор, возникающий вследствие кроссинговера на участке ген-центромера, подтверждает вывод о том, что рекомбинация происходит на стадии четырех хроматид.

В этом можно убедиться, если на схеме рис. 7.5 рассматривать только расщепление по гену *B/b*, дистальному от центромеры. В случае кроссинговера на участке ген *B* — центромера не совпадает *редукция по центромере* и *редукция по гену B/b*. Редукция по центромере происходит при мейозе I, а редукция по генетическому фактору — при мейозе II. Редукция по центромере и по гену *B/b* совпадает только тогда, когда на участке ген-центромера нет

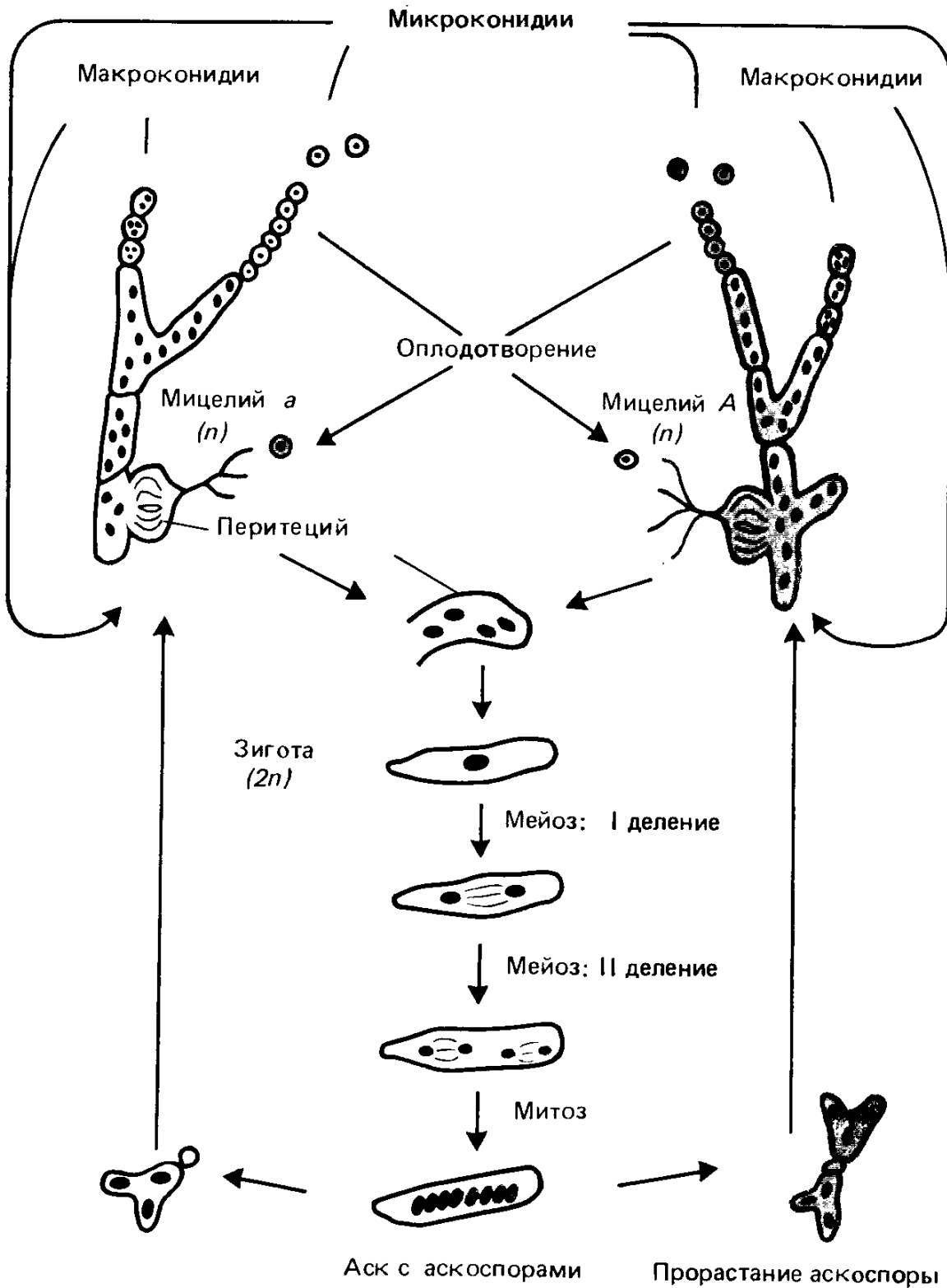


Рис. 7.4. Жизненный цикл *Neurospora crassa*

кроссинговера. Таким образом, благодаря особенностям жизненного цикла нейроспоры у нее можно картировать гены по отношению к центромерам. Для этого нужно учитывать частоту редукции (расщепления) по данному гену при мейозе II, о которой можно судить по расположению аскоспор в асках.

В том, что кроссинговер происходит после репликации хромосом, можно убедиться не только на примере нейроспоры и других

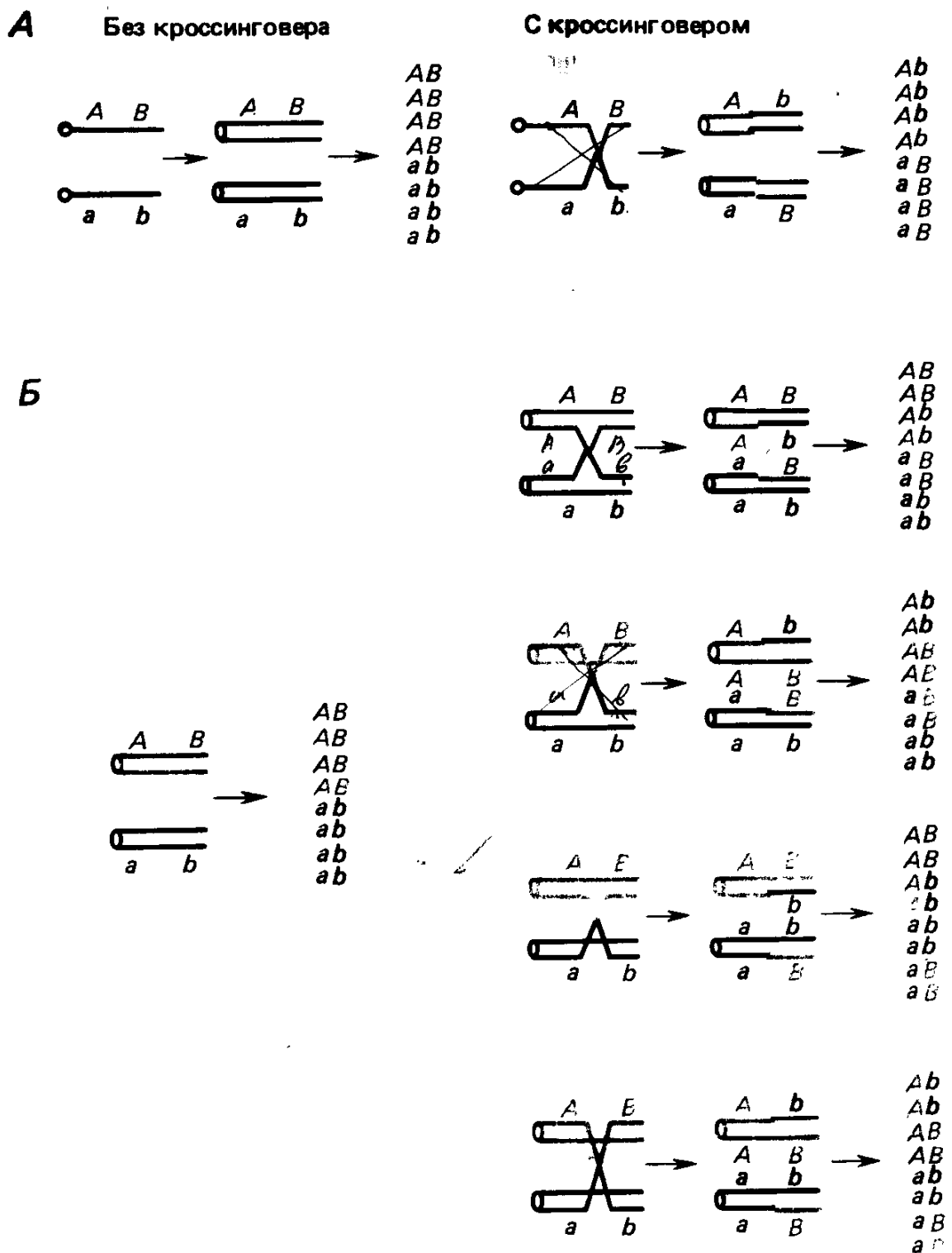


Рис. 7.5. Возможные последствия кроссинговера на стадии двух (А) и четырех (Б) нитей у *Neurospora crassa* при дигибридном скрещивании. Кружки — центромеры

организмов, у которых возможен тетрадный анализ. В 1925 г. К. Бриджес и И. Андерсон продемонстрировали хроматидный кроссинговер у дрозофилы. Для этого они использовали линию со сцепленными X-хромосомами, несущую вдобавок Y-хромосому (X·XY), аналогичную той линии double yellow, которая была описана в гл. 5. Мухи в опытах К. Бриджеса и И. Андерсона были

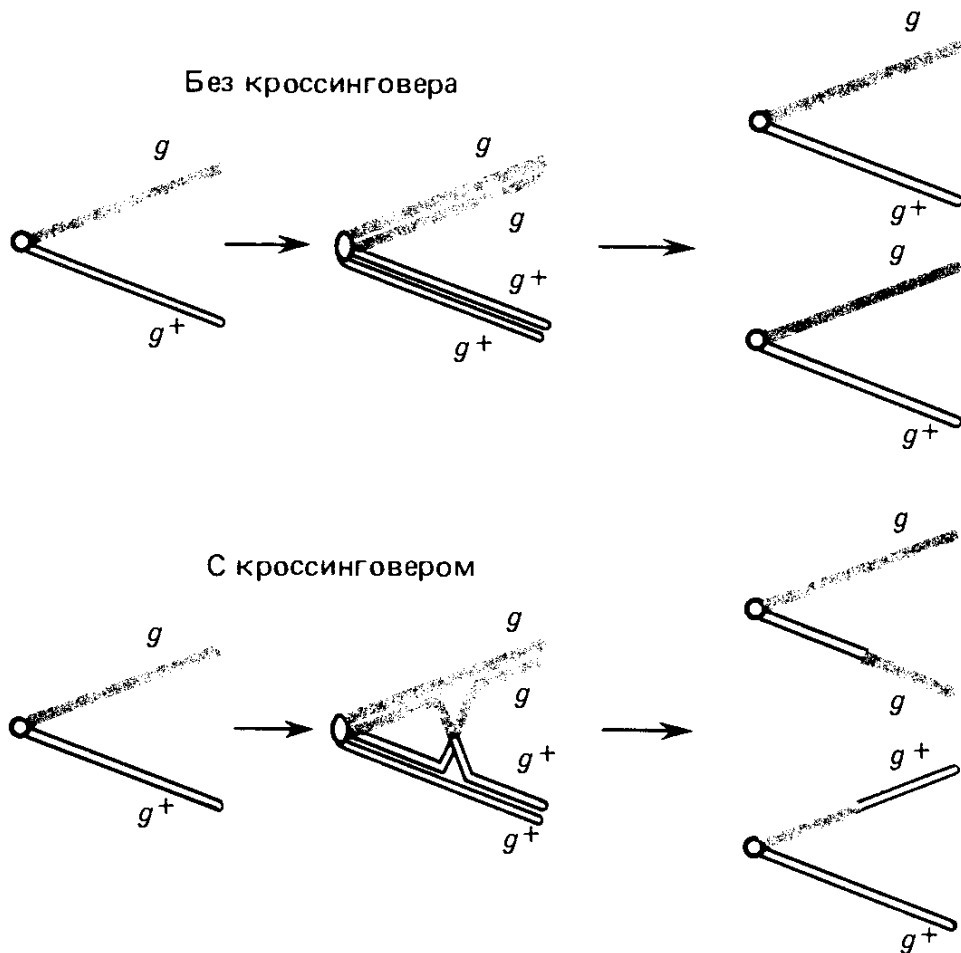


Рис. 7.6. Кроссинговер на стадии четырех хроматид между сцепленными X-хромосомами у дрозофилы на участке ген — центромера

гетерозиготны по генам X-хромосомы: *f* (forked) — раздвоенные, вильчатые щетинки, *g* (garnet) — ярко-красные глаза или *v* (vermillion) — также ярко-красные глаза. При скрещивании этих самок с обычными самцами они непосредственно передают две свои X-хромосомы дочерям и только половина их потомства выживает. При этом некоторая часть самок в потомстве от такого скрещивания оказывается гомозиготной по рецессивным генам X-хромосомы (рис. 7.6). Очевидно, такие гомозиготы могут появляться только в результате кроссинговера на стадии четырех хроматид на участке ген—центромера. Исследовав гомозиготизацию по трем разным генам X-хромосомы, К. Бриджес и И. Андерсон убедились, что ее частота пропорциональна их расстоянию от центромеры, которая находится на самом конце X-хромосомы (для *f* — 5,5%, для *g* — 10, для *v* — 16,1%). Этот способ анализа у дрозофилы получил название полутетрадного, поскольку каждая учитываемая в эксперименте самка (X·XY) несет две из четырех хроматид бивалента, образующегося в профазе I мейоза (см. гл. 4).

Убедившись в том, что кроссинговер происходит на стадии четырех нитей, обратимся к эксперименту Дж. Тэйлора (1967), доказывающему справедливость гипотезы «разрыв—воссоеди-

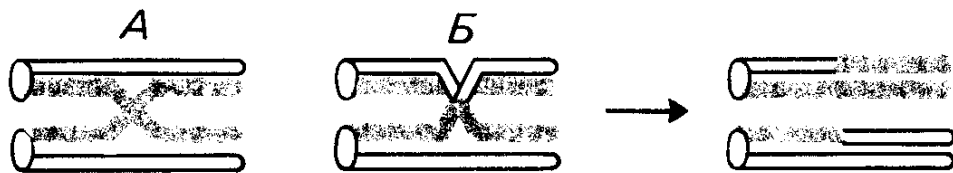


Рис. 7.7. Реципрокные обмены на стадии четырех хроматид в профазе мейоза у кузнечика (по J. Taylor, 1967). Красные хроматиды мечены ^3H . А — обмены не регистрируются; Б — обмены регистрируются

ние». Этот эксперимент — своеобразный вариант тетрадного анализа с использованием цитологического метода. Нимфам кузнечика вводили тимидин, меченный тритием так, чтобы он включался в хромосомы в последнем митотическом цикле перед мейозом. Благодаря этому в результате последующей премейотической репликации каждая хромосома бивалента состояла из меченой и немеченой хроматид (рис. 7.7). Результаты реципрокных обменов между мечеными и немечеными хроматидами были четко видны на радиоавтографах. Такие обмены представляют лишь половину всех происходящих, так как обмены только между мечеными или только между немечеными хроматидами не регистрируются.

Частота наблюдаемых обменов соответствовала предсказанной, исходя из числа хиазм и отсутствия сестринских обменов. Например, среднее число хиазм, приходящихся на самую длинную хромосому, равно 3,67. Поскольку обмены осуществляются на стадии четырех хроматид, каждая хиазма дает только две рекомбинантные хроматиды ($3,67:2 = 1,88$). Регистрируется половина всех обменов ($1,88:2 = 0,94$). Для этой хромосомы Дж. Тэйлор наблюдал рекомбинантные хроматиды с частотой 0,89.

Тетрадный анализ незаменим при изучении *множественных обменов* и интерференции между ними. Для этого рассматривают тригибридное скрещивание ($ABC \times abc$) по сцепленным генам. Учитывая, что кроссинговер происходит на стадии четырех хроматид, возможны три типа двойных обменов (рис. 7.8). Это *двойные двуххроматидные обмены*, *двойные треххроматидные обмены* и *двойные четыреххроматидные обмены* только между несестринскими хроматидами, последствия которых генетически различимы.

Можно идентифицировать последствия двух-, трех- и четыреххроматидных обменов по присутствию в тетрадах аскоспор без обменов (ABC и abc), с одним обменом (ABc и abC или Abc и aBC) и с двумя обменами: (AbC и aBc), как это показано на рис. 7.8. Расположение аскоспор в данном случае несущественно. Если предположить, что все типы обменов равновероятны, то следует ожидать появления указанных трех типов тетрад в соотношении 1:2:1.

В 1963 г. С. Эмерсон статистически обработал данные многих авторов по тетрадному анализу двойного кроссинговера и получил

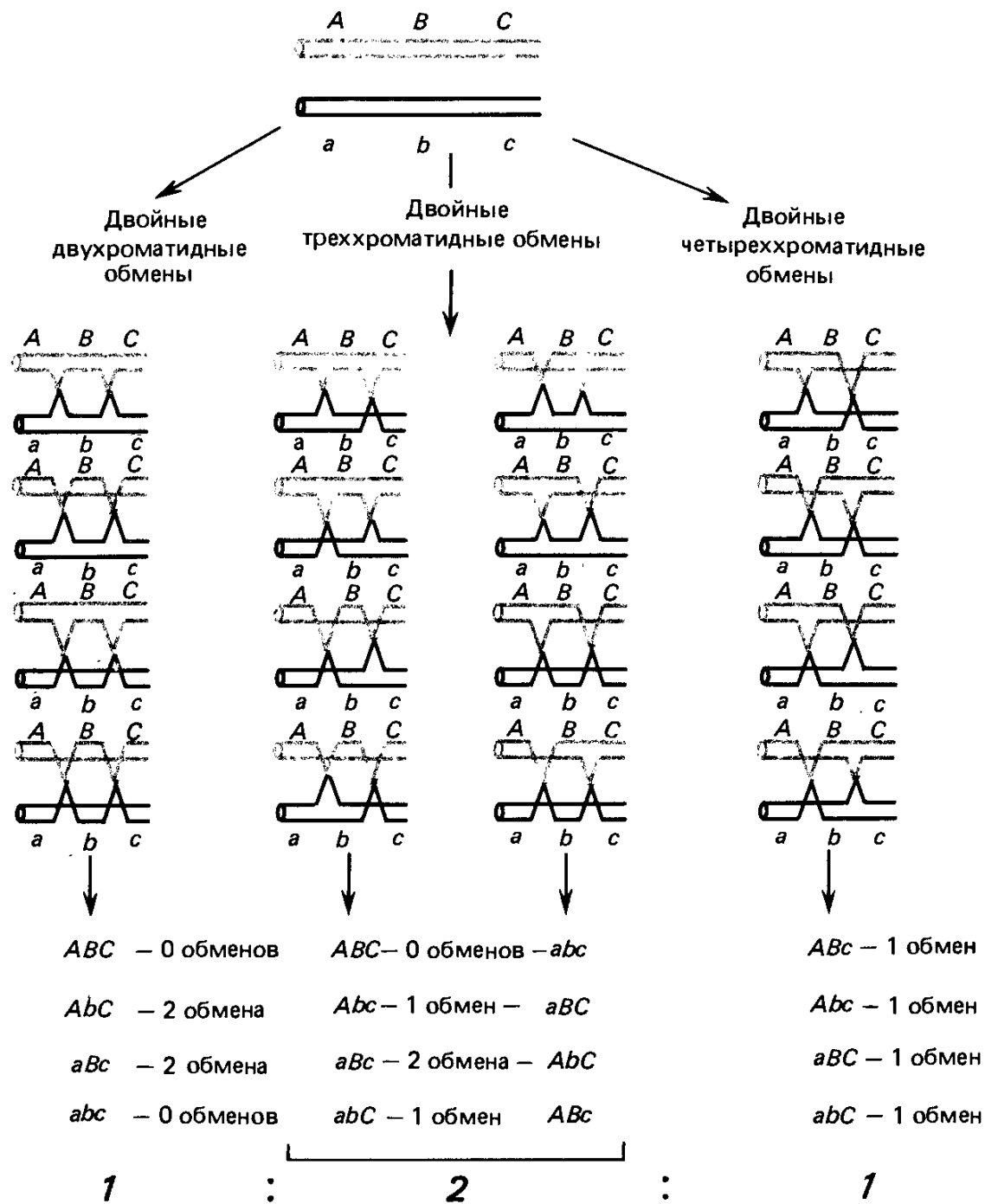


Рис. 7.8. Типы двойных обменов, регистрируемые при тетрадном анализе тригибридного скрещивания у грибов.

Внизу — ожидаемое соотношение типов тетрад; порядок спор не фиксирован

общее соотношение двух-, трех- и четыреххроматидных обменов — 0,29:0,48:0,23. Это соотношение близко к 1:2:1. Следовательно, различные типы двойных обменов происходят практически случайно, т. е. хроматиды, вступившие или не вступившие в один акт рекомбинации, с одинаковой вероятностью участвуют в повторном акте рекомбинации.

Приведенные здесь данные показывают, что *хроматидная интерференция* отсутствует. Ее отсутствие не противоречит существованию *хромосомной, или хиазменной, интерференции*, о кото-

рой говорилось в гл. 5. Это значит, что один обмен затрудняет второй и последующие обмены на соседних участках, но если двойной кроссинговер все же происходит, то все четыре хроматиды вовлекаются в него равновероятно.

По-видимому, важную, но до конца не выясненную роль в мейотическом кроссинговере играет синаптонемный комплекс СК (см. гл. 4). У разных организмов способность к кроссинговеру коррелирует с образованием СК. Например, он формируется у самок *D. melanogaster* с нормальным кроссинговером, но не у самцов, у которых кроссинговер подавлен (см. гл. 6). При образовании СК небольшие участки ДНК конъюгирующих хромосом вовлекаются внутрь центральной зоны СК. Предполагается, что именно на этих участках и иницируются межхроматидные обмены. У растений известны ахиазматические мутанты, у которых изменение одного гена приводит к утрате СК, отсутствию хиазм и подавлению кроссинговера.

Здесь были рассмотрены обмены только между несестринскими хроматидами. Для выяснения вопроса о возможности и частоте обменов между сестринскими хроматидами в мейозе требуются специальные генетические подходы.

Таким образом, кроссинговер происходит на стадии четырех нитей — в профазе мейоза. В результате этого образуются хиазмы, которые удобнее всего наблюдать на стадиях диплотены и диакинеза.

7.3. Митотический кроссинговер

Кроссинговер возможен не только в мейозе, но и в митозе. В 1936 г. К. Штерн исследовал мух *D. melanogaster* генотипа

$\frac{y^+}{+sn}$. Мутация *y* — желтое тело, *sn* (*singed*) — опаленные щетинки. Оба гена находятся в X-хромосоме, а центромера расположена справа от гена *sn*. Исследуемые дигетерозиготы имели дикий фенотип по обоим признакам, однако изредка на теле некоторых мух появлялись двойные пятна: половина пятна — желтая с нормальными щетинками, другая половина — нормального серого цвета, но покрытая опаленными щетинками.

Появление таких двойных пятен К. Штерн объяснил митотическим кроссинговером на стадии четырех хроматид на участке *sn* — центромера (рис. 7.9, А). Действительно, если такой обмен произойдет, то при расхождении хромосом в митозе в половине случаев (рис. 7.9, Б) должны образовываться двойные пятна. Частота митотического кроссинговера значительно ниже (на 2—3 порядка) мейотического. Тем не менее митотический, или соматический, кроссинговер также можно использовать для генетического картирования.

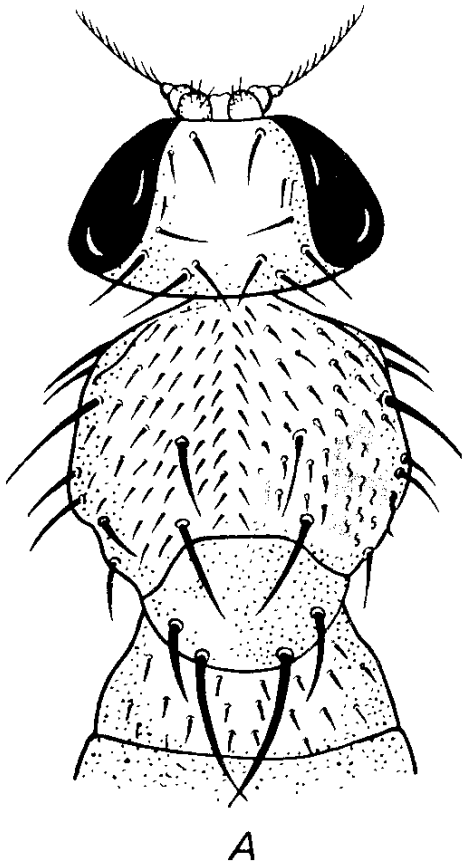
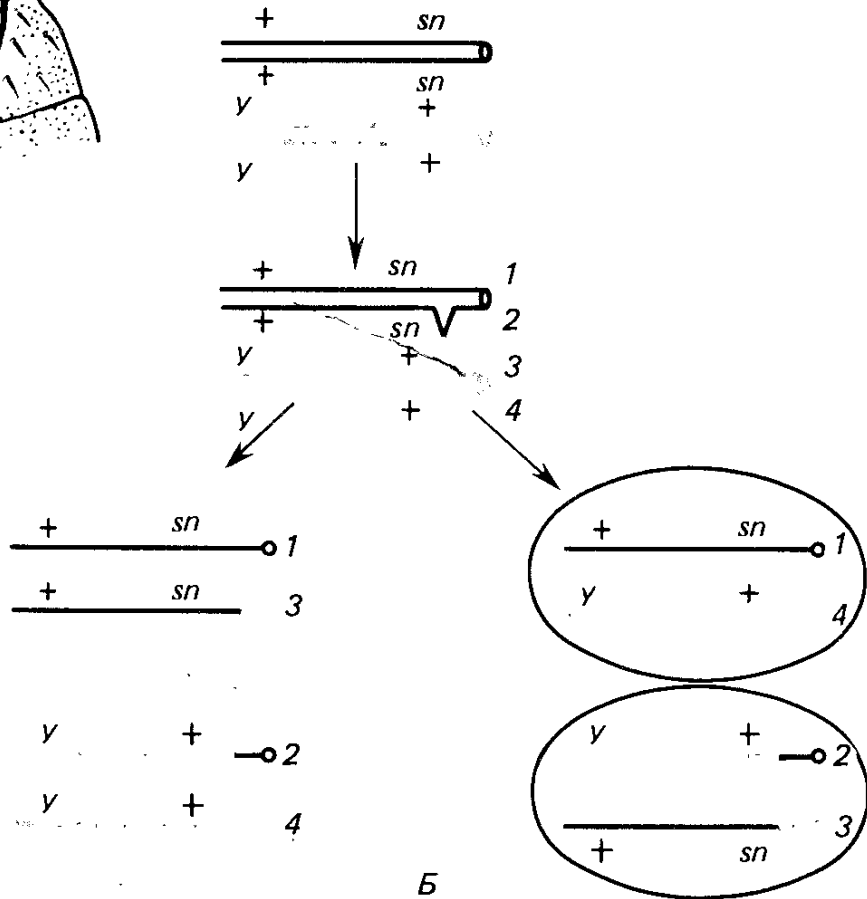


Рис. 7.9. Митотический кроссинговер у *D. melanogaster*. А — результат митотического кроссинговера у мух, гетерозиготных по $\frac{y+}{+sn}$ на участке *sn* — центромера; Б — два возможных варианта расхождения хромосом после митотического кроссинговера (1, 2, 3, 4 — дочерние центромеры).

Двойные пятна $\frac{+sn}{+sn}$, $\frac{y+}{y+}$ образуются в половине случаев



Представим, что эксперимент К. Штерна был поставлен несколько иначе, и дигетерозиготные мухи несли оба рецессивных гена в одном гомологе: $\frac{y sn}{++}$. Тогда кроссинговер на участке *sn* — центромера должен был привести к гомозиготизации обоих генов в одной клетке. Кроссинговер на участке *y—sn* должен приводить к гомозиготизации только по *y*. Поскольку *y* расположен дальше от центромеры, гомозиготизация по *y* должна происходить чаще, чем гомозиготизация по обоим генам. Этот принцип

используется при генетическом картировании у некоторых грибов, у которых существует диплоидная стадия, но утрачена способность к мейозу (подробнее см. гл. 8).

7.4. Предпосылки молекулярной модели кроссинговера

Как уже отмечалось, попытка объяснить появление кроссоверных классов только на основе гипотезы конверсии, т. е. взаимопревращения аллелей в дигетерозиготе, оказалась несостоятельной. Реальность реципрокных обменов была доказана при цитогенетическом изучении кроссинговера (см. 7.1). Гипотезу конверсии, казалось бы, опровергают данные тетрадного анализа: регулярное расщепление (2:2) для каждого из исследуемых генов. Действительно, эта иллюстрация правила чистоты гамет опирается на наиболее частые варианты тетрад.

Сенсационным стало открытие К. К. Линдегрена (1949), описавшего отклонения от нормального (2:2) расщепления в тетрадах диплоидного гибрида дрожжей *Sacch. cerevisiae*, гетерозиготного по *ADE2/ade2*. Наряду с тетрадами 2*ADE2*:2*ade2* изредка встречались тетрады с соотношением 3*ADE2*:1*ade2* и 1*ADE2*:3*ade2*. Для объяснения этого явления К. К. Линдегрэн возродил гипотезу конверсии Х. Винклера.

В дальнейшем было показано, что у дрожжей конверсия по различным генам — обычное явление, встречающееся с частотой около 1%. Как правило, наблюдается равенство частот тетрад 3*A*:1*a* и 1*A*:3*a*. Конверсия была описана и у других грибов, например *Neurospora crassa*, *Sordaria fimicola*. При этом у них были получены не только октады с соотношением 6*A*:2*a* или 2*A*:6*a*, аналогичные тетрадам дрожжей с расщеплением 3*A*:1*a* и 1*A*:3*a*, но и октады с соотношением 5:3 (и 3:5), поначалу казавшиеся загадочными. Появление этих странных соотношений можно было объяснить, только предположив, что у некоторых гаплоидных продуктов мейоза происходит расщепление в последующем митотическом делении — так называемое *постмейотическое расщепление*.

Если конверсию изучают в полигетерозиготах по ряду сцепленных маркеров, можно наблюдать корреляцию между конверсией по какому-либо маркеру и реципрокной рекомбинацией по фланговым маркерам, т. е. по маркерам, расположенным слева и справа от участка конверсии. С. Фогель, Р. Мортимер и Д. Херст изучили 11023 тетрады дрожжей, среди которых обнаружили 907 случаев конверсии (*конвертантных тетрад*) и убедились, что в 445 из них (49,1%) одновременно с конверсией произошла *реципрокная рекомбинация* (кроссинговер) по фланговым маркерам, т. е. практически в половине случаев конверсия сопровождалась кроссинговером. Таким образом, связь этих событий не случайна. Исследователи получили доказательство того, что кон-

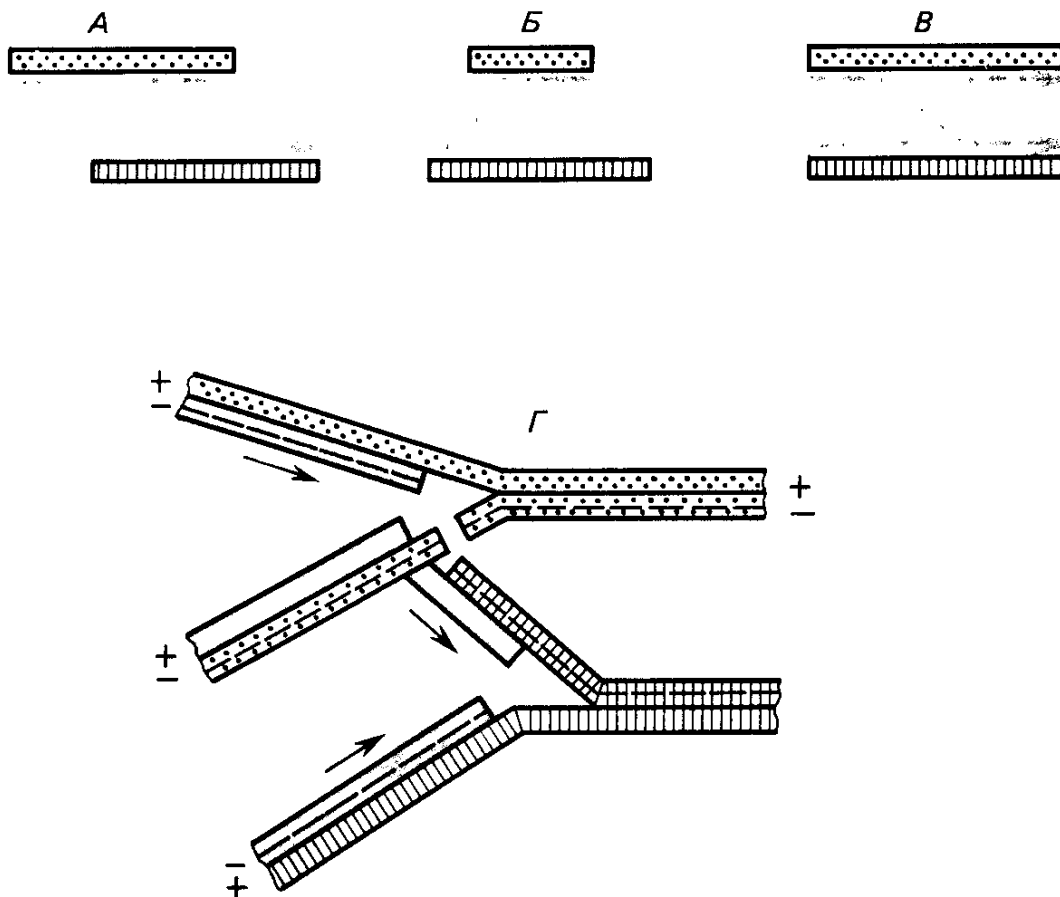


Рис. 7.10. Различные схемы механизма выборочного копирования (по Кушеву, 1971).

A — образование рекомбинантной хромосомы по гипотезе частичных реплик; *B* — выборочное копирование части хромосомы; *V* — реципрокное переключение реплик, обеспечивающее кроссинговер; *Г* — разрыв и копирование.

A, B, V: сплошные линии — двунитевые молекулы ДНК, пунктирные — их копии при допущении консервативной репликации. *Г:* антипараллельные нити ДНК (+ и -) изображены сплошными и пунктирными линиями. Стрелки — направление репликации

версия не приводит к появлению новых аллелей, а только нарушает соотношение родительских аллелей при расщеплении некоторых тетрад. Это заставило предположить, что конверсия происходит вследствие копирования одной аллели за счет другой. Здесь уместно вспомнить гипотезу Дж. Беллинга, возрожденную в 50-х годах А. Херши и Дж. Ледербергом, о выборочном копировании, или копировании со сменой матриц применительно к репликации и рекомбинации геномов бактериофагов и бактерий. Согласно этой гипотезе репликация частично может происходить по матрице одной, а частично по матрице другой (гомологичной) молекулы ДНК (рис. 7.10). По-видимому, этот механизм возможен только для рекомбинации на очень коротких участках, поскольку в противном случае это будет противоречить полуконсервативному механизму репликации ДНК (см. гл. 6).

На участие матричного процесса (репликации ?) в ходе кон-

версии указывают и данные по *совместной конверсии* сразу двух тесно сцепленных мутаций. Например, в тетрадном анализе дигетерозиготы дрожжей: $\frac{a+}{+b}$ могут быть получены тетрады как с аномальным расщеплением по каждому из маркеров:

$$\begin{array}{cccc} a+ & a+ & a+ & a+ \\ a+ & ++ & ab & a+ \\ ab & +b & +b & ++ \\ +b & +b & +b & +b, \end{array}$$

так и с аномальными расщеплениями по обоим маркерам:

$$\begin{array}{cc} a+ & a+ \\ a+ & +b \\ a+ & +b \\ +b & +b. \end{array}$$

Это явление и получило название *совместной конверсии* или *коконверсии*. Могут быть получены и тетрады — результат реципрокной рекомбинации:

$$\begin{array}{c} a+ \\ ++ \\ ab \\ +b. \end{array}$$

Правилом является то, что случаи коконверсии встречаются на коротких расстояниях между a и b (около 1% рекомбинации), причем чем ближе располагаются a и b , тем чаще коконверсия и тем реже реципрокная рекомбинация. Существование коконверсии показывает, что *конверсия захватывает некоторый участок* генетического материала.

Здесь следует напомнить так называемую высокую отрицательную интерференцию (см. гл. 5). Явление, которое трактовали как стимулирование одного реципрокного обмена другим, также наблюдается на очень коротких генетических расстояниях, например в IV хромосоме *D. melanogaster*, имеющей рекомбинационную длину всего 3,0%. Появление в полигибридных скрещиваниях множественно-рекомбинантных сегрегантов по очень тесно сцепленным маркерам дает величину коинциденции $c \gg 1$, и интерференция ($I = 1 - c$) в таком случае приобретает отрицательное значение. Подобные рассуждения справедливы только в случаях с реципрокной рекомбинацией — кроссинговером. Кажущееся совпадение нескольких рекомбинационных событий на коротких расстояниях — результат конверсии, что улавливается только

при тетрадном анализе. Например, при расщеплении тригетерозиготы $\frac{AbC}{aBc}$ могут появиться тетрады:

AbC		AbC
ABC	или	AbC
aBc		abc
aBc		aBc

с конверсией по среднему маркеру B/b . При рассмотрении случайной выборки гамет при генетическом анализе высших эукариот, например при анализирующем скрещивании, появление потомков ABC и abc создает впечатление неслучайного совпадения обменов на участках $A—B$ и $B—C$ при тесном сцеплении всех маркеров и редком появлении одиночных рекомбинантов на участке $A—C$.

В действительности это результат конверсии, или нереципрочной рекомбинации, а так называемой *высокой отрицательной интерференции не существует*.

7.5. Молекулярный механизм кроссинговера

Современные представления о молекулярном механизме кроссинговера в основном сложились в 60-е годы нашего столетия. При этом с учетом особенностей молекулярной структуры ДНК как носителя генетической информации более детально разработана гипотеза «разрыв — воссоединение». Кроме того, предложенные модели удовлетворительно объясняли те результаты генетического анализа, которые были рассмотрены в предыдущем разделе. Наибольшую известность приобрела модель Р. Холлидэя. Рассмотрим эту схему рекомбинации между двумя из четырех хроматид бивалента (рис. 7.11). На рисунке показана рекомбинация только между двумя хроматидами. Еще две хроматиды остаются интактными, однако при рассмотрении конечного результата — расщепления в тетрадах — их также необходимо учесть. ABC и abc — три тесно сцепленных маркера, судьба которых прослеживается на протяжении всего процесса рекомбинации. Стрелки символизируют антипараллельные цепи ДНК. Для рассматриваемой схемы очень существен учет полярности цепей.

Весь процесс инициируют два односторонних разрыва в нитях одинаковой полярности. На рис. 7.11, А они показаны в гомологичных точках, однако, как будет ясно далее, этот момент не имеет принципиального значения. Разрывы могут быть и не строго гомологичны. На первом этапе молекулы ДНК, вступающие в рекомбинацию, образуют гибридные участки — так называемые *гетеродуплексы*, в которых одна цепь происходит от одной молекулы, а другая — от другой (рис. 7.11, Б). Это *полухиазма*. На сле-

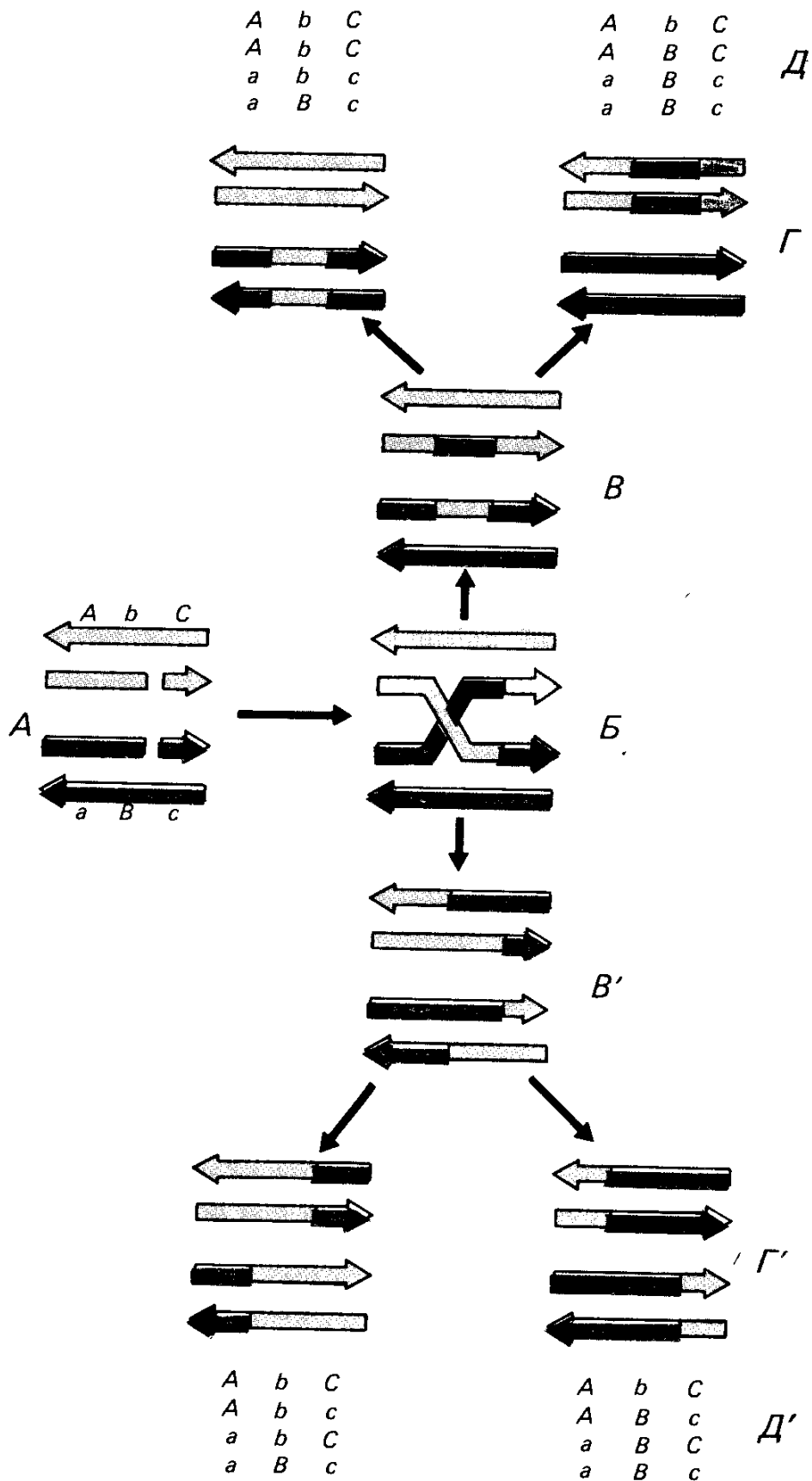


Рис. 7.11. Схема кроссинговера, предложенная Р. Холлидеем (Holliday, 1964).

Необходимо иметь в виду, что на схеме на стадиях $A - \Gamma$ (Γ') показаны только две хроматиды из четырех — две двунитевые молекулы ДНК, вступающие в рекомбинацию. Две другие хроматиды, не вступающие в рекомбинацию, не показаны. На стадии D (D') — расщепление в тетрадах с учетом всех четырех хроматид, как показанных, так и не показанных на предыдущих стадиях. См. также пояснения в тексте

дующем этапе в точке перекреста нити разрываются (рис. 7.11, В). При этом рвутся либо нити, в которых были первичные разрывы (рис. 7.11, А), либо другие две нити (рис. 7.11, В). Предполагается, что оба типа разрывов равновероятны.

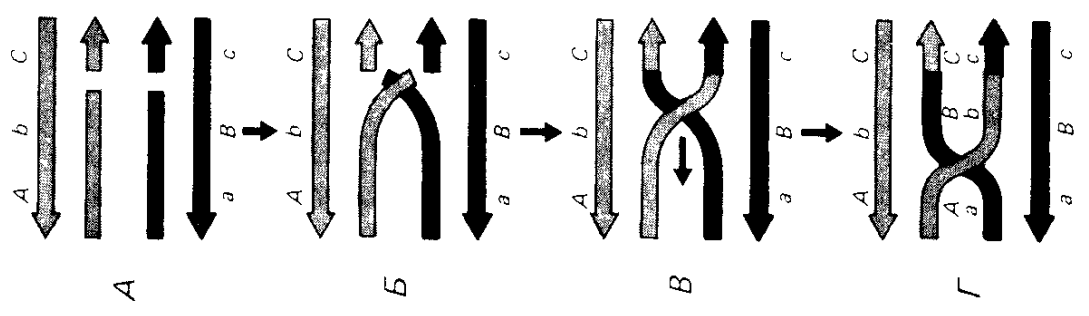
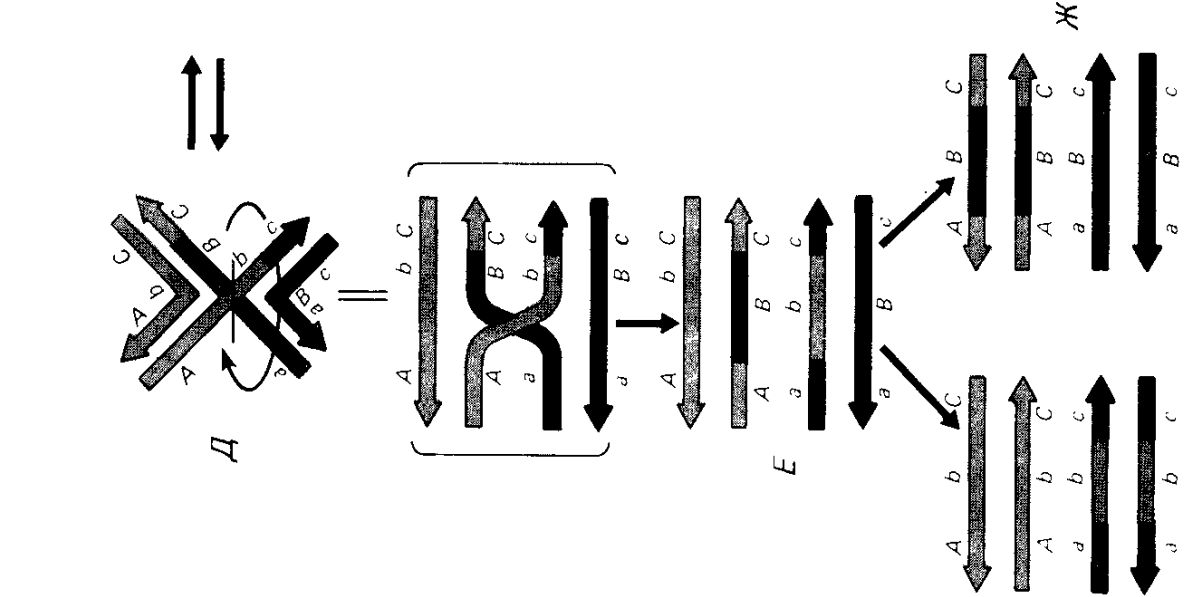
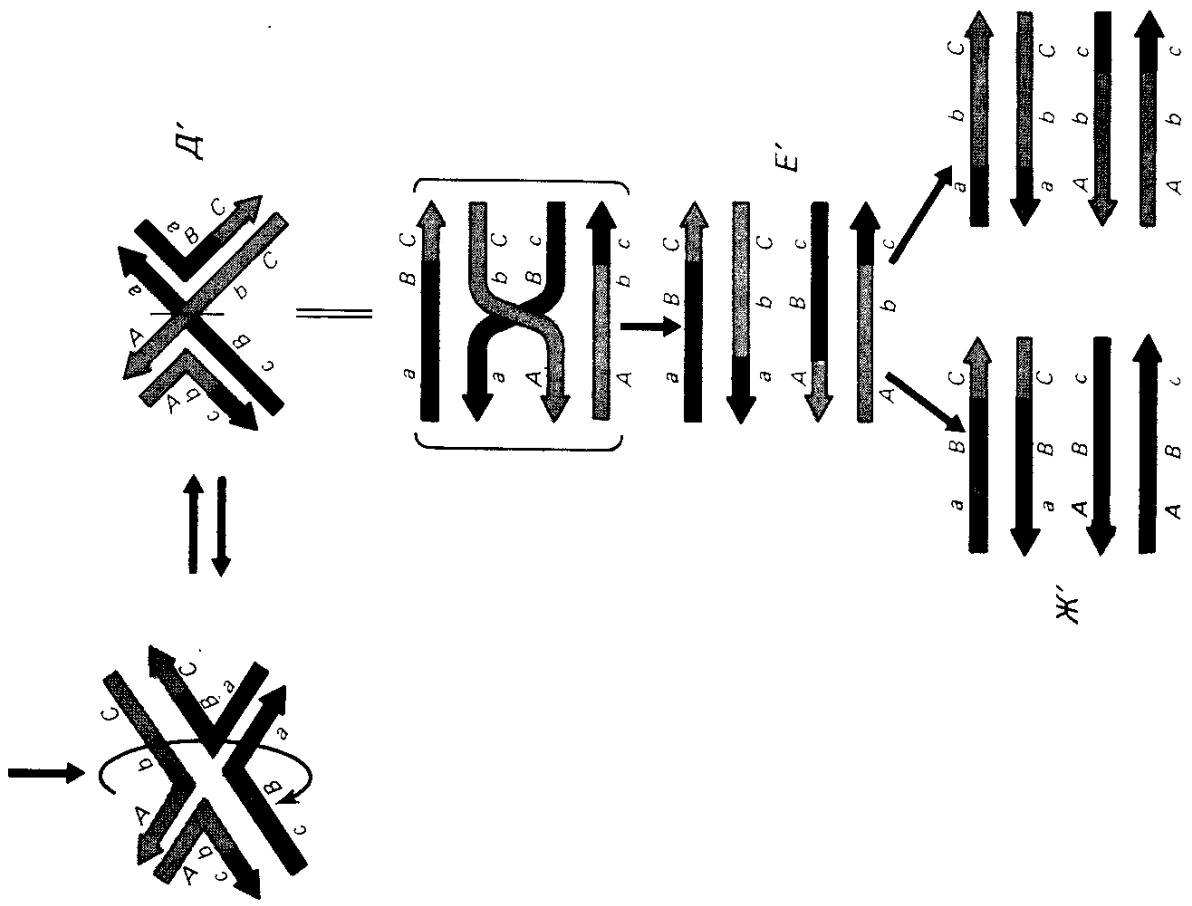
Таким образом, получаются либо две нерекомбинантные по фланговым маркерам молекулы ($A-C$ и $a-c$), несущие гибридный участок — зону гетеродуплекса в районе среднего маркера B/b (рис. 7.11, В), либо две молекулы, рекомбинантные по фланговым маркерам, и опять же гетеродуплексные в районе среднего маркера (рис. 7.11, В').

Поскольку, согласно положению Дж. Уотсона и Ф. Крика, мутации — это изменения чередования нуклеотидов в ДНК, аллели одного гена, в частности B/b , различаются по составу нуклеотидов (как минимум по одной паре оснований). Тогда в участке гетеродуплекса должна образоваться зона *локального неспаривания оснований*. Эти участки «узнают» специальные ферменты репарации (см. гл. 6), обеспечивающие структурную стабильность ДНК. Они устраняют то или другое неспаренное основание и заменяют его на комплементарное. В таком процессе *коррекции* с равной вероятностью матрицей служит та или другая нить гетеродуплекса (рис. 7.11, Г и Г'). Однако в каждом конкретном случае коррекция распространяется вдоль хроматиды и в качестве матрицы используется одна и та же одиночная нить гетеродуплекса ДНК. Если в зону гетеродуплекса попадает несколько маркеров, то это должно привести к коконверсии.

В итоге расщепление в тетрадах можно рассматривать как результат этого процесса (рис. 7.11, Д и Д'). Если принять во внимание еще две хроматиды, которые не вступали в рекомбинацию, будет ясно, что схема с равной вероятностью допускает появление тетрад с конверсией 3:1 и 1:3 по среднему маркеру как с кроссинговером (рис. 7.11, Д'), так и без него (рис. 7.11, Д) по фланговым маркерам, т. е. согласно этой схеме корреляция конверсии и кроссинговера 50%.

Если представить, что коррекция на стадии Г и Г' рис. 7.11 произойдет только в одной хроматиде, а в другой — нет, то будет наблюдаться постмейотическое расщепление ($3b:5B$ или $5b:3B$), встречающееся в октадах у нейроспоры. Его отмечают и в тетрадах дрожжей. В этом случае некоторые гаплоидные колонии, выращенные из аскоспор одной тетрады, будут представлены половинками разного генотипа: B и b . Такое явление действительно наблюдается у дрожжей.

Рис. 7.12. Образование полухиазмы ($A-B$), миграция ветвей (Γ), изомеризация полухиазмы (D, D') и различные результаты разрешения полухиазмы в зависимости от характера разрывов (горизонтальная и вертикальная линии в зоне переброски гибридной ДНК на стадии D) и коррекции гетеродуплексов ($E, E', Ж, Ж'$). В скобках — варианты изображения изомеров полухиазмы, показанной на стадии Γ . Так же, как и на рис. 7.11, демонстрируются только две хроматиды из четырех — те, что вступают в рекомбинацию. Остальные пояснения — в тексте



Существенный момент в рассмотренной схеме — необходимость дополнительного синтеза ДНК в процессе рекомбинации, в частности при репарации (коррекции) гетеродуплексов. Действительно, И. Хотта и Х. Штерн обнаружили у растений (лилии) и у животных (мыши) в пахитене мейоза небольшой синтез ДНК репаративного типа, который дополняет основную репликацию ДНК в премейотической S-фазе. У тех же объектов на стадии зиготены — пахитены показано повышение активности фермента, производящего однонитевые разрывы в ДНК, а также усиленный синтез белка, дестабилизирующего двойную спираль ДНК. Все это события, необходимые для рекомбинации.

Особого внимания в схеме Р. Холлидэя заслуживает способ образования гетеродуплексов. На рис. 7.12 показаны последовательные стадии образования полухиазмы (A—B), которая затем может видоизменяться путем миграции вдоль конъюгирующих хроматид (молекул ДНК) на стадиях B, Г. Этот процесс получил название *миграции ветвей* полухиазмы. Зона переброски движется подобно застежке «молния», удлиняя участки гетеродуплексов. При этом молекулы ДНК должны вращаться вокруг своих осей навстречу друг другу. Эксперименты с объемными молекулярными моделями показывают, что это возможно. Результаты тетрадного анализа у дрожжей, гетерозиготных по двум маркерам, между которыми известно расстояние, выраженное в числе пар нуклеотидов, показывают, что зона гибридной ДНК может распространяться на участки длиной около 1000 п. н. Об этом судят по способности к коконверсии мутаций, расположенных на таком расстоянии друг от друга.

Модель Р. Холлидэя детализирована и в той части, которая связана с *разрешением полухиазмы* двумя типами разрывов, приводящих затем к конверсии без кроссинговера в одном варианте и к конверсии с кроссинговером — в другом. Если фигуру, образовавшуюся вследствие миграции ветвей полухиазмы (рис. 7.12, Г), изобразить несколько иначе (рис. 7.12, Д), то она допускает вращение связанных полухиазмой молекул относительно друг друга (рис. 7.12, переход Д—Д'). Этот процесс назван *изомеризацией полухиазмы*. Разрыв в точке перекреста одиночных нитей, показанный на рис. 7.12, Д, приводит к конверсии без кроссинговера, а разрыв в точке перекреста на рис. 7.12, Д' — к конверсии с кроссинговером по фланговым маркерам. Характерные фигуры, соответствующие стадиям рекомбинации рис. 7.12, Д—Д', были выявлены при электронно-микроскопическом изучении рекомбинации молекул ДНК плазмид (см. гл. 9) в бактериальных клетках (рис. 7.13).

Несмотря на большие успехи в понимании механизма гомологичной рекомбинации (она же общая рекомбинация), о которой шла речь в предыдущих разделах, остается еще много неясных моментов. Основные этапы рекомбинации у всех организмов, по видимому, сходны, однако не совсем понятны различия, которые накладывает на этот процесс разница в организации генетического

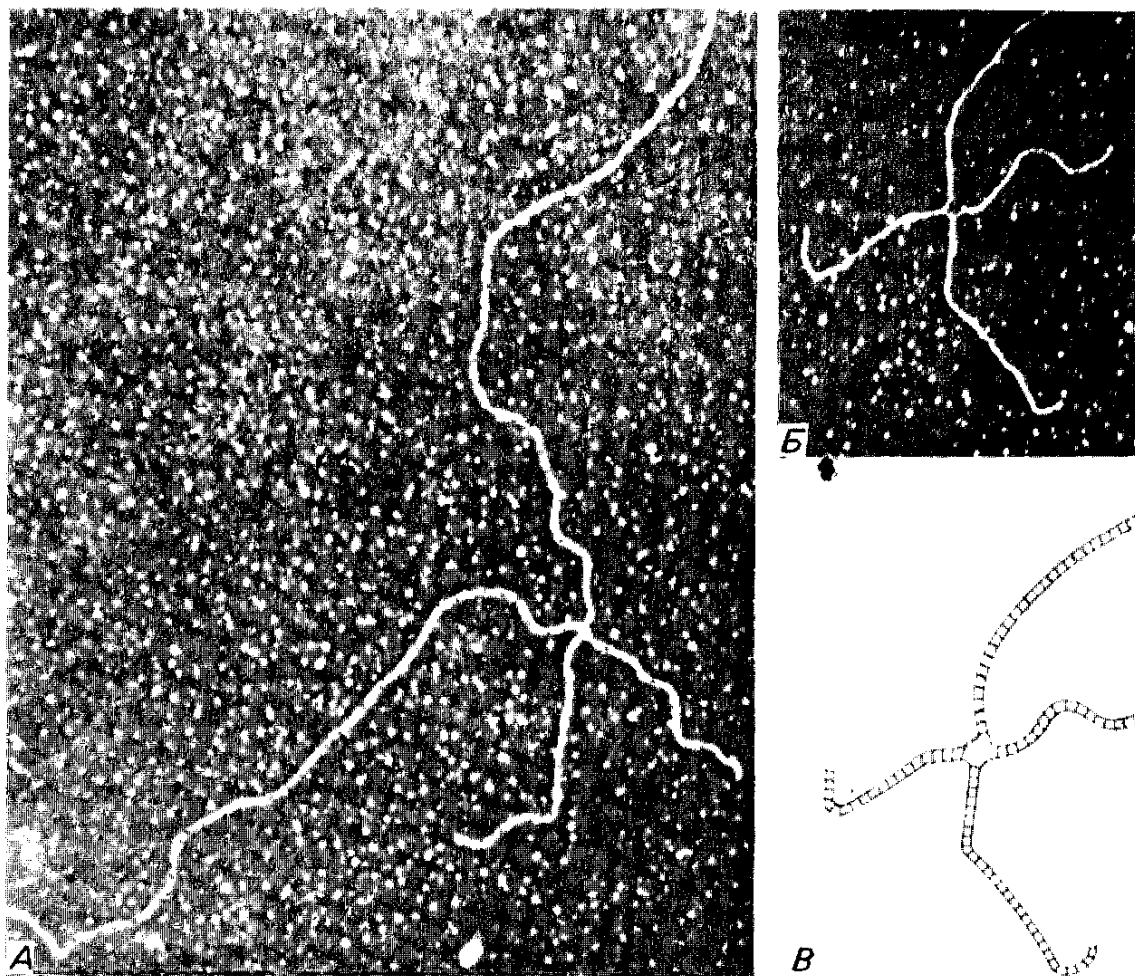


Рис. 7.13. Изомеры полухиазмы Р. Холлидея, обнаруженные при рекомбинации плазмид в клетках *E. coli* (Potter, Dressler, 1976, 1978):
 А — соответствует стадии *D* и *D'* на рис. 7.12 (крайние варианты изомеризации полухиазмы); Б — соответствует стадии *D* и *D'* на рис. 7.12 (промежуточный вариант изомеризации полухиазмы); В — графический эквивалент фото рис. 7.13, Б.

материала бактерий и эукариот с их нуклеосомной структурой хроматина. Неясно, какова роль СК в процессе рекомбинации, каковы иницирующие события в образовании полухиазмы и т. д. Не ясны детали митотического кроссинговера. Известно, что зоны гибридной ДНК при митотической конверсии длиннее, чем при мейотической, однако отсутствие регулярной конъюгации хромосом в митозе затрудняет понимание всего процесса.

Несмотря на ряд нерешенных вопросов, разработка молекулярного механизма рекомбинации представляет собой яркий пример синтеза формально-генетического и молекулярно-биологического подходов в исследованиях одного из важнейших биологических процессов.

7.6. Факторы, влияющие на кроссинговер

Частота мейотического (и митотического) кроссинговера зависит от многих факторов окружающей среды. Различные типы излучений: ультрафиолетовый свет, рентгеновские и γ -лучи, корпускулярное излучение, как правило, повышают частоту реком-

бинации, вызывая одно- и двунитевые разрывы в ДНК хромосом. Влияние излучения может быть специфично для определенных участков хромосом. Так, у *D. melanogaster* частота рекомбинации повышается в прицентромерных районах, в то время как в дистальных рекомбинация подавляется.

Многие химические агенты, нарушающие структуру ДНК или препятствующие ее нормальной репликации (вещества, алкилирующие и дезаминирующие основания, нитрозосоединения и др.), также повышают частоту кроссинговера. Как увидим в дальнейшем, большинство таких агентов одновременно являются мутационными факторами (гл. 12.21).

Частоту рекомбинации изменяют повышение и понижение температуры, в частности, у дрозофилы при отклонении от оптимальной температуры (25°C) в обе стороны.

Частота рекомбинации зависит также от физиологического состояния организма: с увеличением возраста самок *D. melanogaster* кроссинговер происходит реже; голодание личинок повышает, а недостаток влаги снижает частоту кроссинговера.

В качестве агентов, модифицирующих частоту рекомбинации, следует упомянуть и нарушение нормальных экологических отношений между организмами. Известно, что *D. melanogaster*, как и все членистоногие, не способна осуществлять первые этапы биосинтеза стероидов и поэтому должна получать стероиды — предшественники стероидных гормонов и мембран в готовом виде. В лабораторных условиях для этого используют дрожжи. Как показали Е. М. Лучникова и Т. О. Камилова, при выращивании дрозофилы на дрожжах с извращенным синтезом стероидов (условия частичного голодания по эргостерину), у самок *D. melanogaster* подавляется кроссинговер в прицентромерных районах II и III хромосом (рис. 7.14).

Частота кроссинговера находится под строгим генетическим контролем. Было показано, что кроссинговер не происходит у самцов *D. melanogaster*, а также у самок тутового шелкопряда. Его частота, как правило, ниже у гетерогаметного пола. Многие хромосомные перестройки (см. гл. 13) снижают частоту кроссинговера. Известны мутации как повышающие, так и снижающие частоту рекомбинации в отдельных участках хромосом у дрозофилы, кукурузы и других организмов.

Метод мутационного блокирования нормальных функций оказался очень плодотворным при изучении энзимологии и последовательных этапов рекомбинации у бактерий. Сложнее обстоит дело у эукариот, особенно многоклеточных, поскольку мейотическая рекомбинация — это в известном смысле кульминационный момент, завершающий сложные процессы клеточной детерминации и дифференцировки при переходе клеток к мейозу, который отсутствует у бактерий. Поэтому большинство мутаций, изменяющих частоту рекомбинации у эукариот, затрагивает ее лишь косвенно, в качестве одного из плейотропных эффектов.

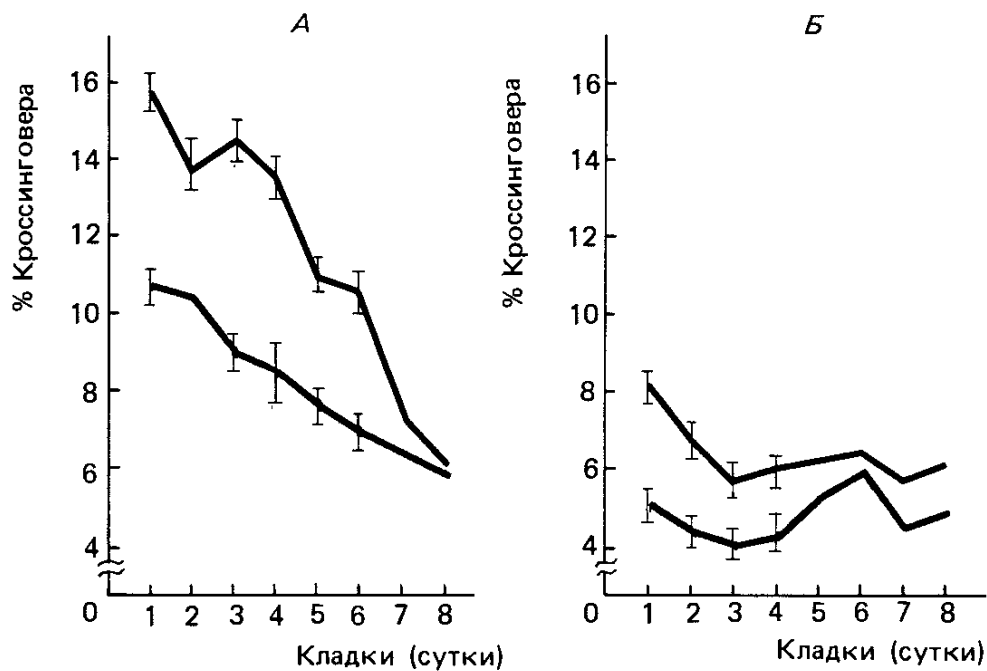


Рис. 7.14. Подавление кроссинговера у *D. melanogaster* во II хромосоме (Т. А. Камилова, Е. М. Лучникова, 1985). Он происходит между генами *b* (черное тело) и *sp* (ярко-красные глаза) в условиях частичного стертинового голодания — нижняя кривая. Верхняя кривая — нормальная диета. Графики иллюстрируют также изменение (падение) частоты кроссинговера с увеличением возраста самок (в последовательных кладках) и зависимость частоты кроссинговера от температуры: А — при 28 °С, Б — при 25 °С. Вертикальные черточки — размах варьирования

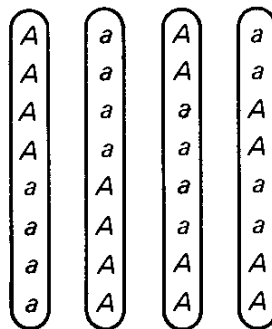
Таким образом, частота кроссинговера между двумя генами — величина постоянная только в константных условиях и на выровненном генотипическом фоне (см. гл. 3). Очевидно, что такая идеальная ситуация недостижима. Поэтому следует иметь в виду, что в генетических картах расположение генов (в отсутствие хромосомных перестроек) инвариантно, а конкретные расстояния между ними могут варьировать.

В этой главе была рассмотрена рекомбинация сцепленных маркеров, или кроссинговер между гомологичными хромосомами. Классический кроссинговер и конверсия как отражение событий, инициирующих реципрокную рекомбинацию, — не единственный способ обмена участками генетического материала. Для других типов рекомбинации, вовлекающих участки не гомологичные по локализации в пределах одной или даже разных хромосом (см. гл. 13), обычно необходимы достаточно протяженные одинаковые или очень сходные нуклеотидные последовательности в ДНК. С этой точки зрения рекомбинация почти всегда гомологична. Тем не менее существуют механизмы и негомологичной в строгом смысле рекомбинации (гл. 13). Еще один механизм — сайт-специфической рекомбинации — будет рассмотрен в гл. 9. При этом типе рекомбинации протяженной гомологии не требуется.

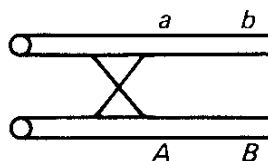
Раскрытие механизмов генетической рекомбинации позволило понять, как работает этот мощный источник наследственной изменчивости, и открыло путь к направленному изменению генетического материала.

Вопросы к главе 7

1. Как было показано, что кроссинговер происходит на стадии четырех нитей (двунитевых хромосом)? Какая это стадия клеточного цикла?
2. Какое расположение аскоспор в аске нейроспоры доказывает, что кроссинговер осуществляется на стадии четырех хроматид? Нужно отметить на схеме.



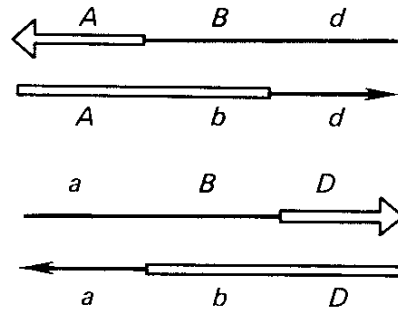
3. Какие типы гамет и в каком соотношении образует самка дрозофилы со сцепленными X-хромосомами, если она гетерозиготна по генам a, b, c , расположенным на расстоянии, соответственно, 10, 20 и 40 сМ от центромеры X-хромосомы? Как выявить эти гаметы?
4. Нарисуйте возможные продукты митотического кроссинговера, попадающие в дочерние клетки:



5. К каким последствиям приводит соматический кроссинговер у высших эукариот?
6. Какие типы гамет образует тригетерозигота $ABEabe$ (гены сцеплены) в результате двойного треххроматидного кроссинговера между генами $A—B$ и $B—E$?
7. Какие гаметы образует тригетерозигота по сцепленным генам: $aVeAbE$ при наличии полной положительной хроматидной интерференции?
8. Что такое «гетеродуплекс», «конверсия», «коррекция»? Проиллюстрируйте схемами.
9. Известно, что конверсия в 50% случаев сопровождается реципрокной рекомбинацией. Как это объяснить при помощи модели Холлидея?
10. У нейроспоры проведено скрещивание:



A, B, D — тесно сцепленные маркеры. При обмене между двумя из четырех хроматид возникли следующие гетеродуплексы:



Каким будет расщепление в октаде, если при коррекции в качестве матрицы всегда используется: а) «тонкая» нить, б) «толстая» нить, в) если коррекция по матрице «тонкой» нити пройдет только в одной молекуле ДНК?

2

ЧАСТЬ

РАЗНООБРАЗИЕ И ЕДИНСТВО ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ

Глава 8

Жизненные циклы. Процессы, ведущие к рекомбинации у эукариот

Соотношение процессов, обеспечивающих константность организмов и их изменчивость в связи с рекомбинацией, а следовательно, с распространением перекрестного и самооплодотворения, — неотъемлемая характеристика вида. В совокупности с темпом и характером мутационной изменчивости (см. гл. 12—14) все это, по определению К. Дарлингтона, составляет *генетическую систему вида*.

В этой главе рассматриваются жизненные циклы многоклеточных и одноклеточных эукариот прежде всего с точки зрения их генетической значимости. По отношению к отдельным видам или более крупным таксонам обращается внимание: 1) на генетический контроль половых различий или иных типов несовместимости, определяющих характер объединения генетического материала разных особей и клеток; 2) на длительность и способ смены дипло- и гаплофазы; 3) на способ оплодотворения и характеристику зиготы; 4) на особенности рекомбинации. Только на основе этих фактов можно оценить особенности генетического анализа у различных объектов.

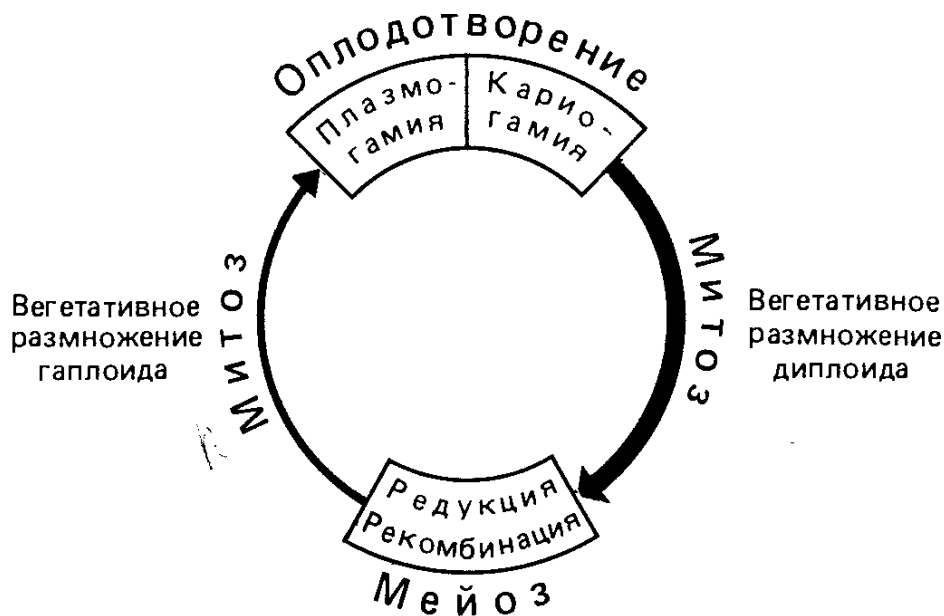


Рис. 8.1. Обобщенная схема жизненного цикла эукариотических организмов

Типичный жизненный цикл эукариот включает: оплодотворение, состоящее из плазмогамии, т. е. слияния клеток, и последующей кариогамии — слияния ядер; митотическое размножение клеток; мейоз, приводящий к редукции и рекомбинации хромосом. Образующиеся при этом гаплоидные клетки в ряде случаев могут делиться митотически и рано или поздно сливаются, восстанавливая диплоидную фазу (рис. 8.1).

Реальное разнообразие жизненных циклов в разных таксономических группах можно свести к неодинаковой длительности этапов, показанных на рис. 8.1. Представление об этом разнообразии дает рис. 8.2.

О некоторых особенностях генетических систем многоклеточных растений и животных уже говорилось в предыдущих главах. Это облегчает задачу обобщения материала в следующих разделах, а также объясняет логическое движение — вниз по эволюционной лестнице.

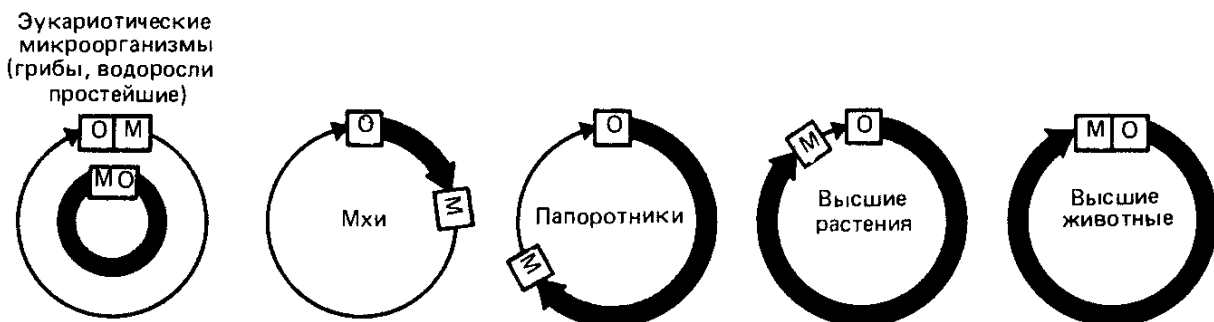


Рис. 8.2. Разнообразие жизненных циклов у эукариот.

Для эукариотических микроорганизмов показаны два крайних варианта (две концентрические окружности), между которыми имеется множество промежуточных вариантов. М — мейоз, О — оплодотворение, толстая линия — диплоидная стадия, тонкая — гаплоидная стадия

8.1. Гаметогенез и оплодотворение у животных

Генетические системы многоклеточных животных основаны преимущественно на раздельнополости и перекрестном оплодотворении, за исключением случаев гермафродитизма, при которых женские и мужские половые органы образуются у одной и той же особи. Гермафродитизм распространен среди беспозвоночных: кишечнополостных, плоских червей, некоторых моллюсков. У позвоночных это некоторые рыбы, например морской окунь. При гермафродитизме в связи с одновременностью созревания яйцеклеток и сперматозоидов одной и той же особи, как правило, происходит перекрестное оплодотворение.

Высшие животные также потенциально бисексуальны, однако хромосомный механизм определения пола (см. гл. 5) обуславливает дифференцировку мужских или женских особенностей организма. Различают *первичные половые признаки* — строение гонад, а также те физиологические и морфологические особенности, которые определяют нормальное развитие гамет и их слияние при оплодотворении, и *вторичные половые признаки*, характерные для данного пола, но непосредственно не связанные с процессом полового размножения.

Зачатки гонад у эмбрионов животных содержат два типа тканей — *кортекс* (внешний слой) и *медуллу* (внутренний слой). В процессе дифференцировки, согласно хромосомной детерминации пола, у женских особей кортекс развивается в яичники, а у мужских особей из медуллы образуются семенники. Потенциальную бисексуальность животных наглядно демонстрируют эксперименты по переопределению пола в онтогенезе. Кастрация петуха приводит к развитию у него признаков курицы. Если такой курице вновь пересадить семенники, то восстанавливаются признаки мужского пола.

У крупного рогатого скота известен феномен *фримартинизма*. При рождении разнополой двойни у коровы в некоторых случаях внутренние органы телки приобретают признаки мужского пола, хотя наружные гениталии устроены по женскому типу. Такие фримартинны всегда стерильны. Их появление объясняется тем, что мужские гормоны бычка, развивающегося нормально, начинают выделяться раньше, чем женские гормоны телки, и переопределяют пол женского эмбриона.

Искусственное гормональное переопределение пола может быть временным, как, например, у кур при обработке яиц женским гормоном — *эстрогеном*, или постоянным, как это показано для некоторых земноводных и рыб. В последнем случае у аквариумной рыбки *Oryzias latipes* действием женского полового гормона на новорожденных мальков удалось полностью переопределить пол. В результате генетические самцы (XY) функционировали как самки и приносили потомство с расщеплением по генам, сцепленным с полом, которого следовало бы ожидать при скрещивании двух самцов. У данного вида рыб особи YY жизнеспособны.

Начальные стадии формирования предшественников мужских и женских половых клеток — гониальных клеток — сходны. Схема сперматогенеза и оогенеза представлена на рис. 8.3.

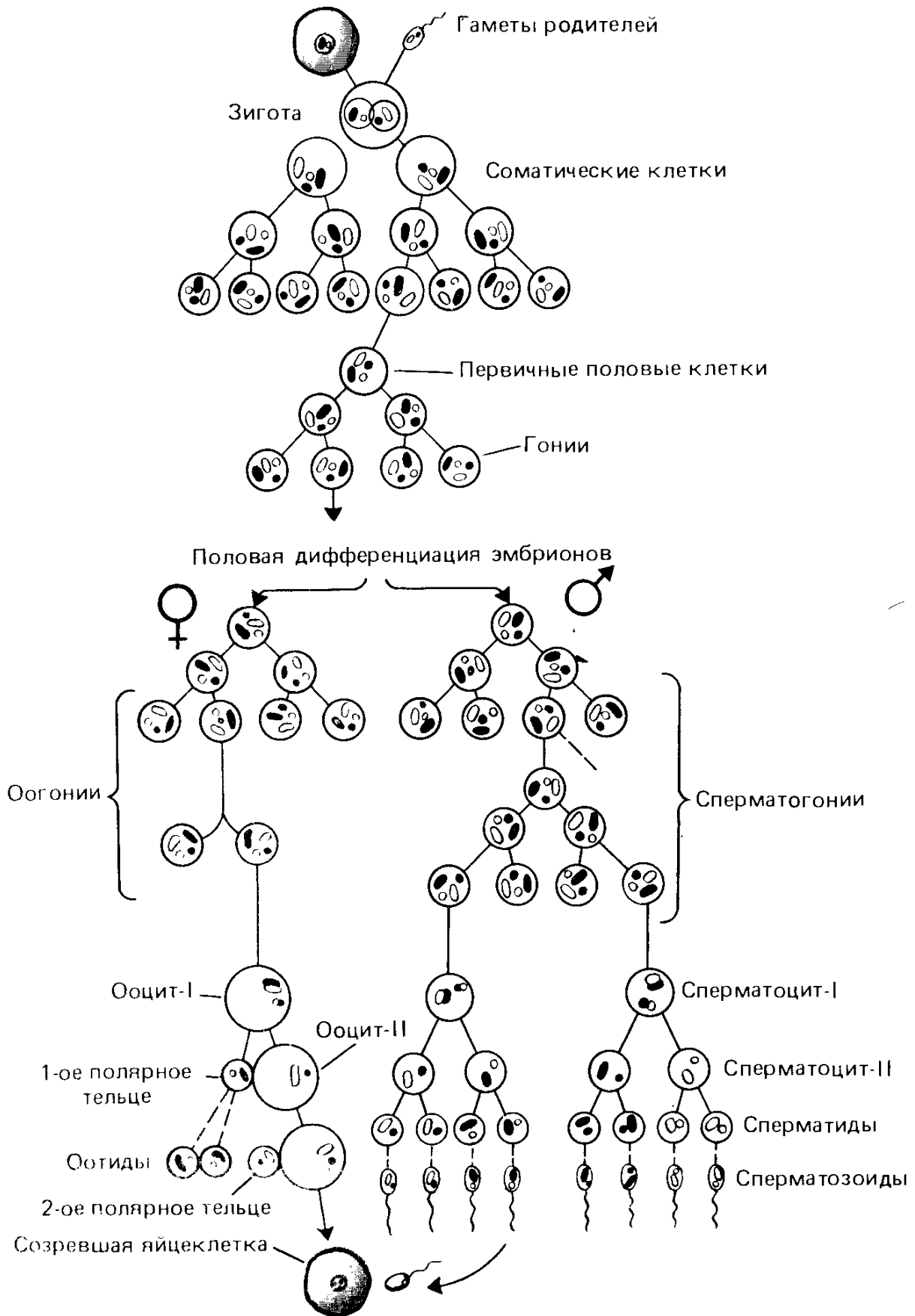


Рис. 8.3. Сравнительная схема развития мужских (сперматогенез) и женских (оогенез) половых клеток

В семенниках *сперматогонии* после периода роста превращаются в *сперматоциты I порядка*, которые претерпевают I деление мейоза и в результате образуются *сперматоциты II порядка*. В них проходит II деление мейоза и возникают *сперматиды*. Так, каждый диплоидный сперматоцит дает четыре гаплоидные клетки. Далее сперматиды в результате процесса спермиогенеза превращаются в *сперматозоиды*. При этом образуется головка сперматозоида, представленная практически только гаплоидным ядром, а все элементы цитоплазмы участвуют в формировании хвоста и аппарата, обеспечивающего подвижность сперматозоида.

Развитие женских половых клеток — *яйцеклеток* — происходит в яичниках. Как яйцеклетки, так и сперматозоиды претерпевают два деления мейоза. Существенным различием при этом является то, что *ооциты I порядка*, в которые превращаются *оогонии* в результате более продолжительного роста, образуют при I делении мейоза две гаплоидные клетки с неодинаковым количеством цитоплазмы: одну крупную клетку — *ооцит II порядка* и неболь-

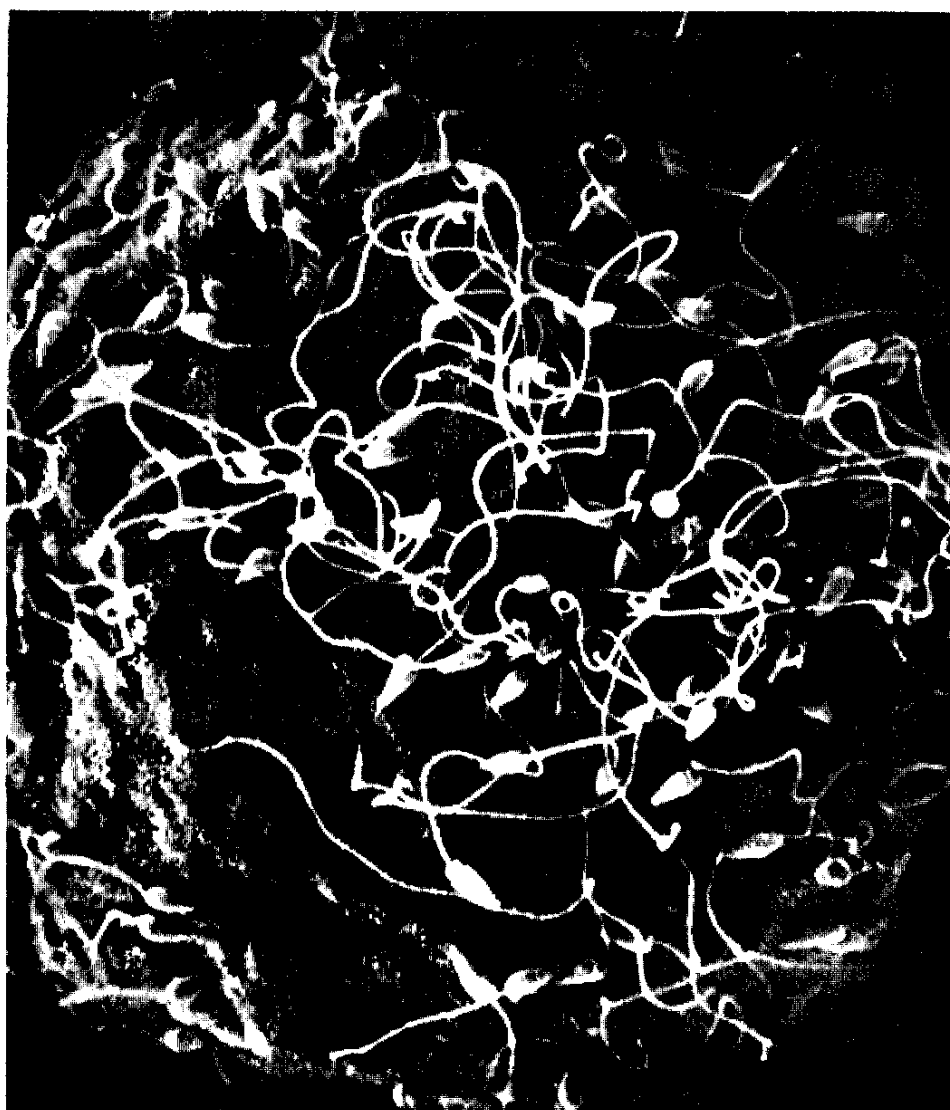


Рис. 8.4. Сперматозоиды морского ежа на фоне яйцеклетки
(D. Suzuki, A. Griffiths, R. Levontin, 1981]

шое первое *полярное тельце*. При II делении мейоза каждый ооцит II образует одну *оотиду* и второе полярное тельце. Первое полярное тельце также делится. Так, в результате мейоза ооцит I образует четыре оотиды, но только одна из них, созревая, превращается в яйцеклетку. Три оставшиеся клетки абортивны.

В дальнейшем при оплодотворении в яйцеклетку проникает только ядро сперматозоида — мужской *пронуклеус*. Он сливается с женским пронуклеусом — ядром яйцеклетки. Сперматозоид может проникать не только в зрелую яйцеклетку, но у некоторых животных — и на различных стадиях формирования ооцита I и ооцита II. Тем не менее при оплодотворении сливаются только гаплоидные ядра, завершившие мейоз.

В дальнейшем зигота развивается только за счет цитоплазмы яйца, а сперматозоид вносит в зиготу только свою половину хромосомного набора. Сравнение сперматозоидов и яйца морского ежа представлено на рис. 8.4.

Такой тип оплодотворения носит название *анизогамии* или *гетерогамии*. При этом неравенство сливающихся гамет касается только цитоплазмы, в то время как ядерный материал поступает от отца и матери. Неравенство гамет по цитоплазме позволяет исследовать относительную роль ядра и цитоплазмы в детерминации признаков. Для этого используют реципрокные скрещивания (подробнее см. гл. 10). Последующее перераспределение отцовского и материнского материала происходит в мейозе (см. гл. 4), однако возможны и случаи митотической рекомбинации (гл. 7), которые могут иметь генетическое значение только у организмов, размножающихся вегетативным путем.

Таким образом, в соответствии со схемой на рис. 8.1 жизненный цикл многоклеточных животных представлен диплоидной стадией, а гаплоидны только половые клетки. Исключение представляют животные с гапло-диплоидным жизненным циклом.

8.2. Цветковые растения

У высших растений большая часть жизненного цикла, так же как у животных, представлена диплоидной фазой — стадией *спорофита*. Однако гаплоидные клетки, образующиеся в результате мейоза, — *микроспоры* и *мегаспоры*, дают начало редуцированным мужскому и женскому *гаметофитам*, которые гаплоидны. В свою очередь они формируют мужские половые клетки — спермии и женские — яйцеклетки.

Процессы мега- и микроспорогенеза представлены на рис. 8.5. Они протекают сходно с оогенезом (до стадии ооцита II) и сперматогенезом (до стадии сперматиды) соответственно. При микроспорогенезе вслед за образованием тетрады гаплоидных микроспор каждая из них делится путем митоза (рис. 8.6) и образует два ядра: вегетативное и генеративное, которое в результате второго митоза образует два ядра — спермии.

Из тетрады мегаспор три в дальнейшем дегенерируют, а чет-

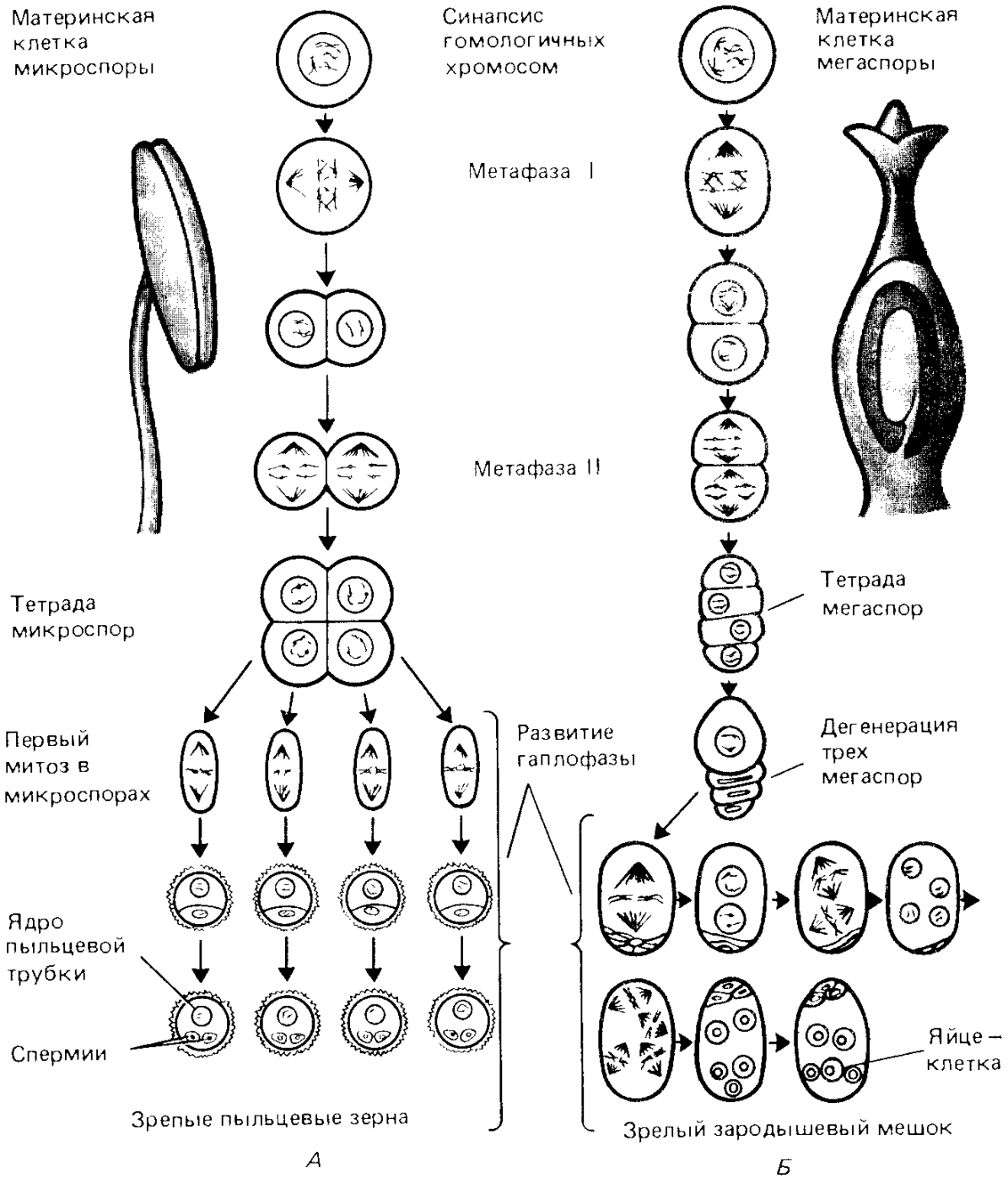


Рис. 8.5. Образование: А — пыльцевых зерен (микроспорогенез) и Б — зародышевых мешков (мегаспорогенез) у цветковых растений (М. Е. Лобашев, 1967)

вертая дает начало зародышевому мешку. После периода роста ее ядро делится от одного до трех раз. В большинстве случаев у покрытосеменных растений происходят три деления, в результате которых образуются восемь гаплоидных ядер. Затем эти восемь ядер группируются по четыре. Одна четверка — вблизи *микропиле* — места проникновения спермия, а другая — на противоположном конце зародышевого мешка. Из первой четверки одно ядро обособляется и дает начало ядру яйцеклетки, еще два ядра образуют так называемые *синергиды*, которые после оплодотворения разрушаются. Четвертое ядро мигрирует в центр зародышевого мешка. Из другой четверки ядер, отошедших к противоположному

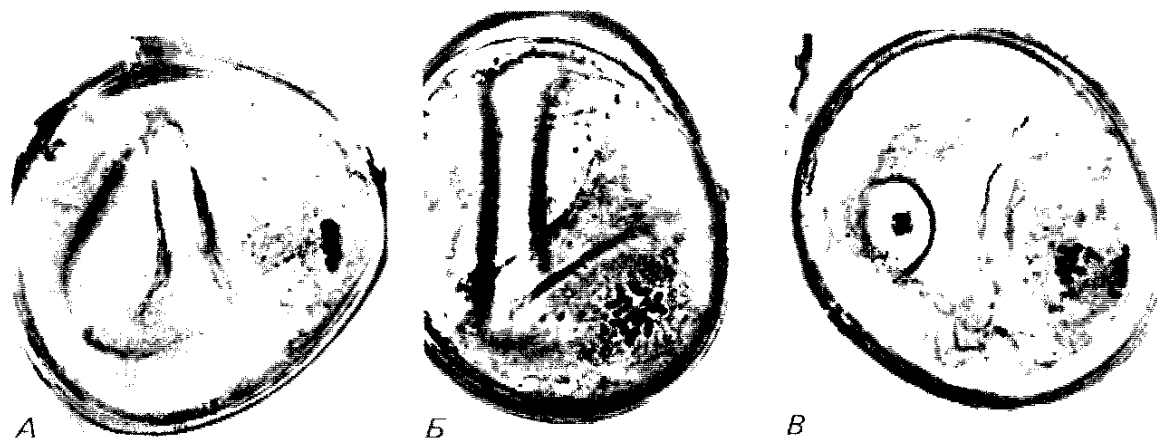


Рис. 8.6. Первый постмейотический митоз в пыльцевом зерне кукурузы: А, Б — метафаза (вид с экватора и с полюса); В — анафаза (фото И. Н. Голубовской)

концу зародышевого мешка, три образуют *клетки-антиподы*, а одно ядро также мигрирует в центр, где и сливается с ядром, отошедшим от микропиле. Так образуется диплоидное *центральное ядро*.

Оплодотворение у растения состоит из следующих этапов. Пыльцевое зерно, попавшее на рыльце пестика, набухает, образуется пыльцевая трубка, которая проникает в глубь столбика по направлению к завязи. При прорастании на рыльце пестика нескольких пыльцевых трубок лишь одна из них достигает зародышевого мешка и проникает через микропиле. При соприкосновении конца пыльцевой трубки с синергидами она лопаются, а синергиды разрушаются. Два спермия вместе с содержимым пыльцевой трубки попадают внутрь зародышевого мешка. Один из них сливается с гаплоидным ядром яйцеклетки, в результате чего образуется зигота, дающая начало зародышу. В данном случае также имеет место гетерогамия (или анизогамия), поскольку количество цитоплазмы, вносимое в зиготу яйцеклеткой, значительно больше того, которое поступает со спермием. Тем не менее с цитоплазмой спермия у некоторых растений могут передаваться и пластиды, что существенно для генетического анализа нехромосомного наследования (см. гл. 10).

Второй спермий, проникший в зародышевый мешок, сливается с центральным диплоидным ядром. Так возникает триплоидное ядро, дающее начало питающей ткани — *триплоидному эндосперму*. Весь этот процесс получил название *двойного оплодотворения* (рис. 8.7). Его открыл в 1898 г. русский ботаник С. Г. Навашин. Триплоидная природа эндосперма была установлена С. Г. Навашиным в 1915 г. у скерды (*Crepis*).

Признаки организма, заложенные в зародыше при оплодотворении, могут быть учтены только после высева семян и выращивания из них растений следующего поколения. В то же время признаки эндосперма можно учесть непосредственно на семенах, завязавшихся в результате опыления в год скрещивания. Это явление — прямое влияние пыльцы на признаки эндосперма — было

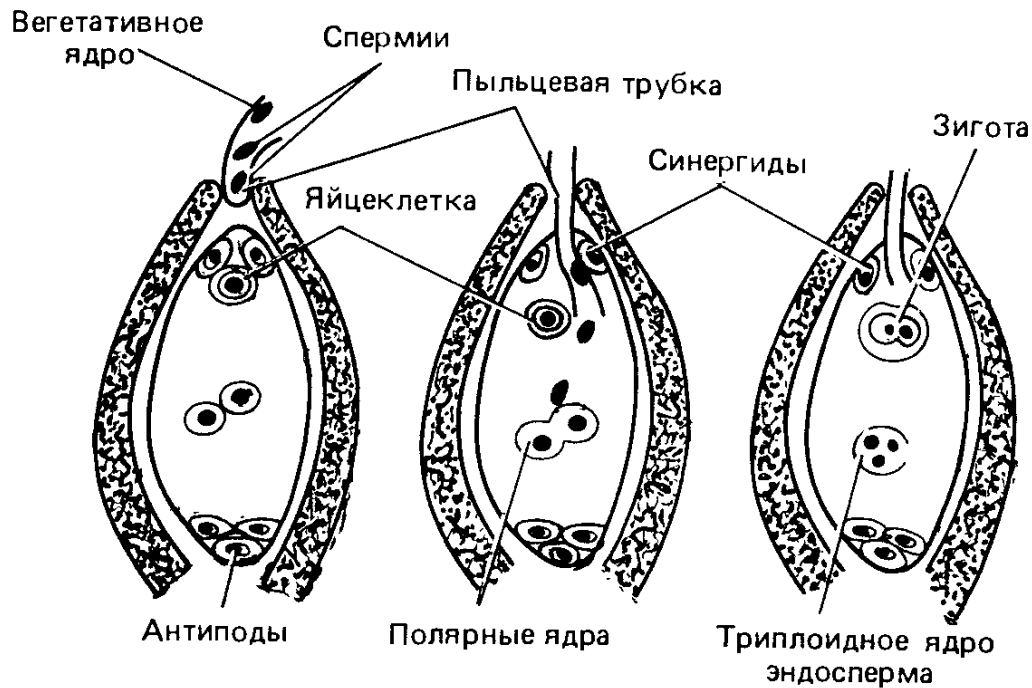


Рис. 8.7. Схема двойного оплодотворения у покрытосеменных растений (М. Е. Лобашев, 1967)

названо В. Фоке (1881) *ксениями*. Так, если кукурузу белозерного сорта (белые зерна — рецессив) опылить пылью желтозерного (доминант) сорта, то образуются желтые семена, несмотря на то, что они развиваются на растениях белозерного сорта.

Признаки семян, завязавшихся в год опыления, можно учесть и в другом случае, если они касаются семядолей зародыша. Это отмечал еще Г. Мендель в «Опытах над растительными гибридами»: «Гибридная форма семян и окраска белка развиваются непосредственно после искусственного оплодотворения, под прямым воздействием чужой пыли. Их можно наблюдать поэтому уже в первом опытном году, тогда как все другие признаки появляются только в следующем году на тех растениях, которые выращиваются из оплодотворенных семян»¹. Так, Г. Мендель писал о признаках желтой — зеленой окраски и гладкой — морщинистой формы семян гороха.

8.3. Несовместимость у растений

Возможность объединения гамет — оплодотворение — у растений обуславливается не только их половой принадлежностью. Наряду с полом у них существует генетически детерминированная система несовместимости, которая объясняется неспособностью пыльцевых трубок определенного генотипа проникать в завязь растения соответствующего генотипа. Несовместимость описана более чем у 3000 видов растений, принадлежащих к 78 семействам.

Типы несовместимости подразделяют на две группы в зависимости от обеспечивающих ее механизмов: гомоморфическую и гетероморфическую.

¹ Мендель Г. И. Опыты над растительными гибридами. М., 1965. С. 16.

При *гомоморфической* несовместимости реакция, препятствующая оплодотворению, происходит между пыльцой и тканями пестика. В этом случае цветки в популяции растений не имеют морфологических различий. Различают два типа контроля несовместимости: гаметофитный и спорофитный.

При *гаметофитной* несовместимости реакция пыльцы — остановка роста пыльцевых трубок — определяется ее генотипом по генам несовместимости, которых может быть один или два, каждый с серией множественных аллелей. Этот тип характерен для семейств *Solanaceae* (томат, паслен), *Rosaceae* (яблоня, роза), *Fabaceae* (бобы) и др.

При *спорофитной* несовместимости реакция пыльцы определяется генотипом диплоидного растения, на котором она образуется, т. е. зависит от взаимодействия аллелей генов несовместимости. При этом аллели могут проявлять доминирование или быть кодоминантными. Этот тип несовместимости контролирует один ген с серией множественных аллелей. Он характерен для семейств *Brassicaceae* (капуста, редька), *Asteraceae* (скерда).

Как при гаметофитной, так и при спорофитной несовместимости оплодотворение невозможно, если взаимодействуют одинаковые аллели пыльцы и пестика, и возможно, если взаимодействуют разные аллели одного (при моногенном контроле) или обоих генов при зависимости от двух генов.

Гетероморфическая несовместимость (гетеростилия) связана с морфологическими различиями в строении цветков в популяции, как это показано у *Primula*, *Lythrum*, *Polygonum* и др. Самоопыление оказывается невозможным, так как одни цветки имеют короткие тычинки и длинный пестик, а другие — длинные тычинки и короткий пестик. В этих случаях один и тот же ген контролирует различия в строении цветка и физиологическую реакцию несовместимости. Контроль осуществляется по спорофитному типу, и в гене выявляются только две аллели.

Существование несовместимости у растений способствует поддержанию перекрестного оплодотворения у перекрестноопыляющихся, поскольку опыление собственной пыльцой у них невозможно. Это явление называется *самонесовместимостью* или *автостерильностью*. У самонесовместимых растений можно получить мутантные автофертильные формы, например у ржи *Secale cereale*.

Существует, однако, большое число автофертильных видов, например ячмень, пшеница, горох.

Знание генетического контроля несовместимости существенно при генетическом анализе. Во-первых, самонесовместимость затрудняет инбридинг (для растений обычно употребляют термин инцухт), необходимый для получения гомозиготных форм. Во-вторых, тесное сцепление исследуемых генов с генами несовместимости искажает истинные частоты рекомбинации между генами, поскольку часть генотипов при расщеплении не будет учтена из-за несовместимых опылений.

Материал, изложенный в предыдущих разделах этой главы,

показывает, что регулярные типы полового размножения и чередование поколений у растений и животных основаны на закономерностях мейоза и оплодотворения, которые в этих двух царствах в основном протекают одинаково. При этом экспериментатор в скрещиваниях и анализе расщеплений, как правило, вынужден иметь дело с организмами на диплоидной стадии.

8.4. Нерегулярные типы полового размножения

У животных и растений встречаются так называемые нерегулярные типы полового размножения. Это прежде всего *апомиксис* (от греч. «апо» — без, «миксис» — смешение), т. е. половое размножение без оплодотворения. Апомиксис противоположен *амфимиксису* («амфи» — разделенный), т. е. половому размножению, происходящему путем слияния разнокачественных гамет. Синоним апомиксиса — *партеногенез*, т. е. девственное размножение от греч. «партенос» — девственница). Термин апомиксис чаще употребляют в отношении растений, а партеногенез — в отношении животных.

Партеногенез может быть гаплоидным и диплоидным. При гаплоидном, или генеративном, партеногенезе новый организм развивается без оплодотворения, из гаплоидной яйцеклетки. Развивающиеся при этом особи могут быть только мужскими, только женскими или теми и другими. Это зависит от хромосомного механизма определения пола. Например, у пчел, паразитических ос, червецов, клещей самцы появляются в результате партеногенеза. Партеногенез может быть постоянным (облигатным), как в упомянутых случаях, или циклическим (факультативным). У дафний, тлей, коловраток партеногенетические поколения чередуются с половыми. У дафний, в частности, самки диплоидны, а самцы гаплоидны. В благоприятных условиях у дафний не происходит мейоза. Яйцеклетки диплоидны. Они развиваются без оплодотворения и дают начало только самкам. Это пример диплоидного, или соматического, партеногенеза. В неблагоприятных условиях (понижение температуры, нехватка корма) самки начинают откладывать гаплоидные яйца, из которых выводятся самцы. В результате полового процесса образуются диплоидные зиготы, вновь дающие начало самкам.

В 1958 г. И. С. Даревский описал популяции ящериц рода *Lacerta*, состоящие из одних самок и размножающиеся партеногенетически. Затем аналогичное явление было обнаружено у ящериц рода *Snemidaphorus*. Оказалось, что у них перед мейозом в гониальных клетках происходит эндомитотическое удвоение числа хромосом. Далее эти клетки проходят нормальный цикл мейоза и в результате образуются диплоидные яйцеклетки, которые без оплодотворения дают начало новому поколению, состоящему только из самок.

Явление апомиксиса у растений связано с драматическими

страницами в истории генетики. По неудачному совету К. Нэгели Г. Мендель после 1865 г. занялся проверкой открытых им закономерностей у ястребинок (*Hieracium*). Скрещивая разные виды этого растения, он обнаружил расщепление в F_1 и полное единообразие в F_2 . Получив этот результат, Г. Мендель опубликовал его в работе «О некоторых бастардах *Hieracium*, полученных искусственным оплодотворением» (1869) и бросил занятия гибридизацией. Только через 40 лет выяснилось, что Г. Мендель столкнулся с апомиктическим размножением. Очевидно, выбранные формы были факультативно апомиктическими. В поколении, которое Г. Мендель считал первым гибридным, происходило расщепление исходно гетерозиготных форм. Теперь известно, что факультативные апомикты после гибридизации приобретают способность к устойчивому апомиксису.

Знание закономерностей партеногенеза и хромосомного механизма определения пола у шелкопряда было использовано Б. Л. Астауровым для отбора наиболее продуктивных линий. Если извлечь из самок неоплодотворенные и не прошедшие мейоза яйца, то при прогревании их до 46°C мейоз отсутствует. Эти яйца содержат Z- и W-хромосомы. Они развиваются партеногенетически и дают начало только самкам, так как у шелкопряда женский пол гетерогаметен. Таким образом можно быстро размножить ценный племенной материал.

Наряду с партеногенезом наблюдается и развитие яйцеклетки, активируемое сперматозоидом, не участвующим в оплодотворении. Мужской пронуклеус погибает, а организм развивается за счет женского пронуклеуса. Это явление называется *гиногенезом*, который встречается у гермафродитных круглых червей и у некоторых рыб.

Противоположность гиногенеза — андрогенез — развитие только за счет мужского пронуклеуса в случае гибели женского пронуклеуса. Гаплоидный андрогенез встречается очень редко. Развитие андрогенных особей до взрослого состояния наблюдали только у наездника *Habrobracon* и у тутового шелкопряда.

У тутового шелкопряда при оплодотворении в яйцеклетку проникает несколько сперматозоидов, но ядро лишь одного из них сливается с ядром яйцеклетки, остальные погибают. Если неоплодотворенные яйцеклетки активировать температурным шоком, как это описано выше, и облучить рентгеновскими лучами, то ядро яйцеклетки погибнет. Если далее такие энуклеированные яйца осеменить, то два мужских пронуклеуса, проникшие в яйцеклетку, сливаются между собой. За счет образовавшегося диплоидного ядра развивается зигота. Как показал Б. Л. Астауров, такие андрогенетические зиготы всегда превращаются в самцов, поскольку они несут две одинаковые половые хромосомы — ZZ. Получение чисто мужского потомства у шелкопряда экономически выгодно, так как самцы продуктивнее самок.

В практических целях эта задача иначе была решена В. А. Струнниковым (см. гл. 22).

8.5. Одноклеточные эукариоты

Мир одноклеточных эукариот, или эукариотических микроорганизмов, охватывает грибы, водоросли и простейших. Разнообразие их жизненных циклов и процессов, ведущих к рекомбинации, столь обширно, а число генетически изученных видов столь ограничено, что большие обобщения были бы рискованными. Достаточно сказать, что из более 4200 родов и около 50 000 видов грибов, описанных к настоящему времени, приблизительно у 450 видов исследованы типы несовместимости, знание которых — первое условие любого генетического анализа. Генетически изучены только 30 видов грибов, принадлежащих к 20 родам.

В последние годы активно разрабатывается именно генетика одноклеточных эукариот. Это объясняется тем, что данная группа организмов включает многие объекты — продуценты белка, антибиотиков и других биологически активных веществ (дрожжи, пеницилл, аспергилл и другие грибы), потенциальные продуценты биомассы (одноклеточные водоросли). Многие грибы и простейшие патогенны для человека, животных и сельскохозяйственных растений.

С другой стороны, среди эукариотических микроорганизмов известен целый ряд так называемых модельных объектов, удобных для изучения структуры, функции и регуляции действия генома, детерминации и клеточной дифференцировки. Если к началу 70-х годов основными объектами молекулярной генетики оставались бактерии и бактериофаги, то в 80-х годах их сильно потеснили эукариоты и прежде всего эукариотические микроорганизмы, сочетающие клеточное строение, характерное для высших организмов, с одноклеточностью микробов.

8.6. Грибы

Первыми микроорганизмами, которые начала осваивать генетика в 30-е годы, были грибы, прежде всего *Neurospora* и различные виды дрожжей рода *Saccharomyces*.

Микроорганизмы, как правило, не отличаются разнообразием морфологических признаков, но это кажущееся неудобство с лихвой компенсирует возможность приблизиться к генетическому контролю метаболизма клетки посредством получения мутантов, ауксотрофных (недостаточных) по различным органическим соединениям, или мутантов, способных усваивать экзогенные источники углерода и азота. Тем самым концепция элементарного признака, или фена (гл. 2), конкретизируется в виде одной биохимической реакции и далее — в виде активности фермента.

Метод селективных сред, широко используемый в микробиологии, позволяет регистрировать редкие события: мутации и рекомбинации, и создавать условия, при которых вырастают только интересные экспериментатора варианты. Селективные среды широко используют для отбора гибридов между гаплоидными

родителями, маркированными комплементарными рецессивными мутациями ауксотрофности.

Разнообразие жизненных циклов грибов иллюстрирует рис. 8.8, на котором представлены пять основных вариантов. Среди грибов с половым размножением наблюдаются вариации от полностью гаплоидного цикла (рис. 8.8, 1, 2), как, например, у *Neurospora* (см. рис. 7.4), до полностью диплоидного (рис. 8.8, 5), как у гомоталлических штаммов *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 8.9).

Для большинства мицелиальных грибов характерны несколько ядер в общей цитоплазме. Эти ядра могут иметь разные генотипы. В таком случае по аналогии с гетерозиготой говорят о *гетерокарионах* (рис. 8.8, 3).

В общем виде митоз и мейоз у грибов происходят так же, как у высших эукариот, но без разрушения ядерной мембраны и, по-видимому, без плотной компактизации хромосом, поскольку последние обычно неразличимы в световом микроскопе.

Несовместимость у грибов

В зависимости от способа генетической детерминации несовместимость у грибов бывает *гомогенной* и *гетерогенной*. В первом случае возможны скрещивания между различными клетками (мицелиями), а во втором — между одинаковыми, по генам несовместимости. Гомогенная несовместимость, в свою очередь, подразделяется на *биполярную* и *тетраполярную* (рис. 8.10).

Типичный представитель грибов с гомогенной биполярной несовместимостью — дрожжи *Sacch. cerevisiae* (см. рис. 8.9), у которых цитогамия и последующая кариогамия происходит только между клетками (или аскоспорами) противоположных типов спаривания *a* и *α*, детерминируемых аллелями локуса *MAT*. К этому же типу несовместимости принадлежит и *Neurospora crassa* (см. рис. 7.4).

Тетраполярная гомогенная несовместимость характерна для базидиомицетов, в частности для *Shizophyllum commune*. При этом типе несовместимости нормальный половой процесс происходит только между штаммами, неодинаковыми сразу по двум

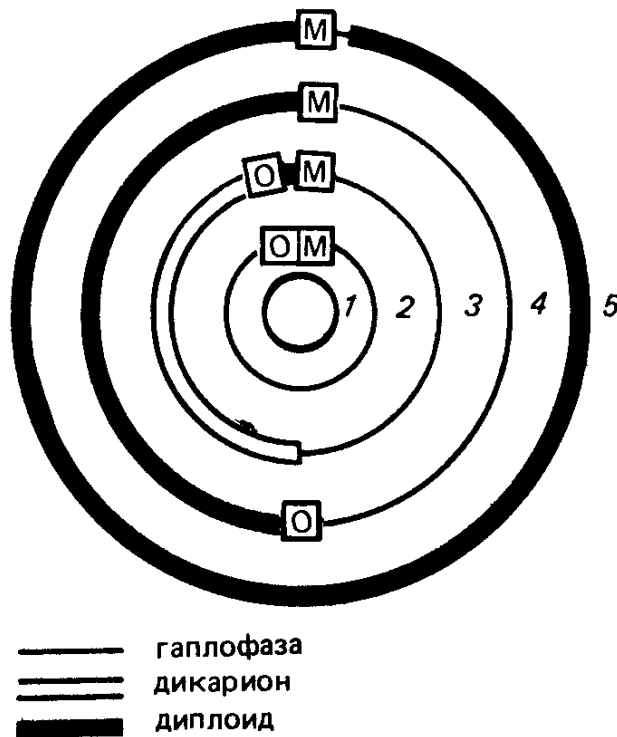


Рис. 8.8. Основные типы жизненных циклов у грибов в схематическом представлении (по I. Barnett, 1983):

1 — асексуальный, 2 — гаплоидный, 3 — гаплоидный с гетерокариотической стадией, 4 — гапло-диплоидный, 5 — диплоидный, М — мейоз, О — оплодотворение

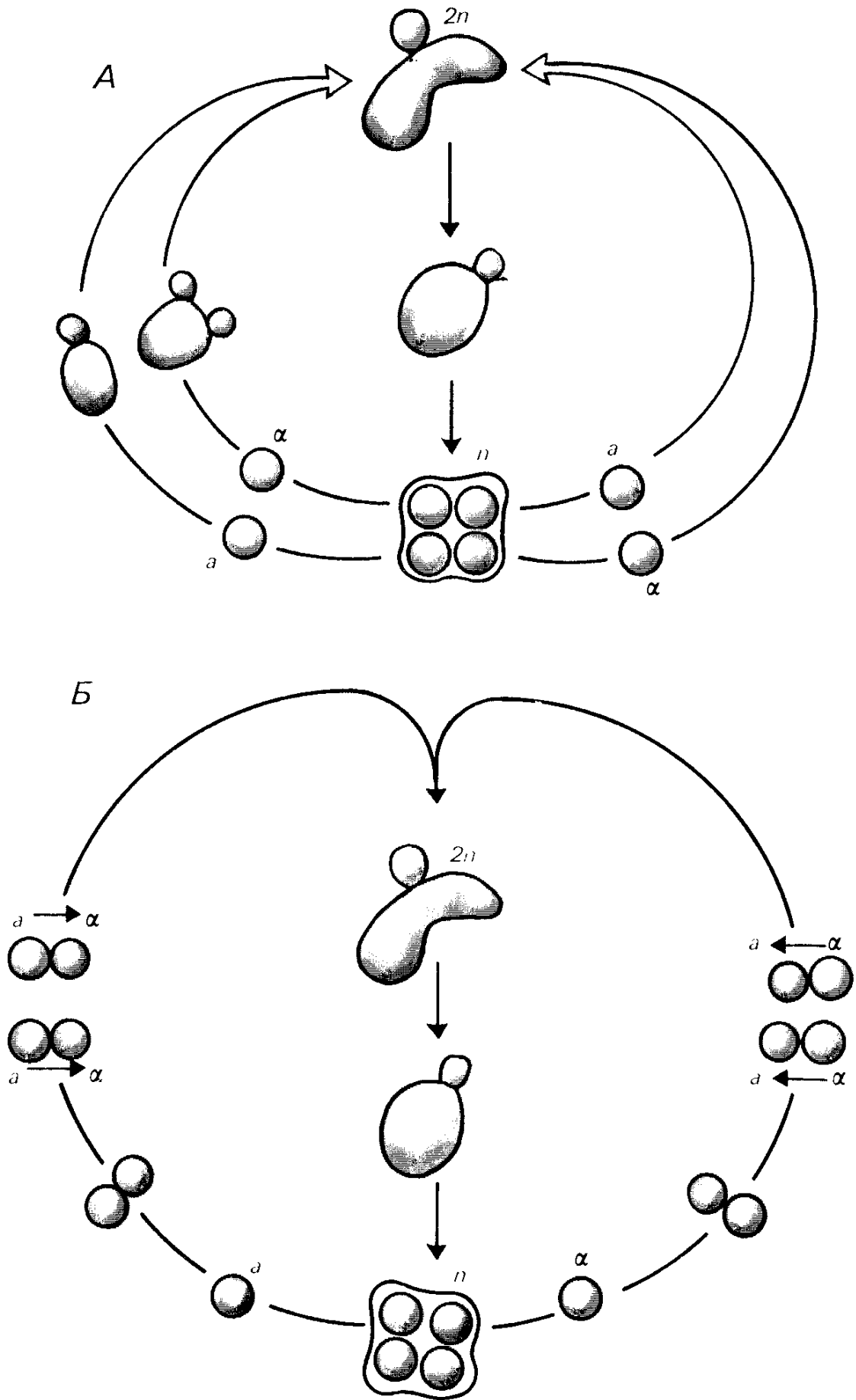


Рис. 8.9. Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: А — гетероталлических; Б — гомоталлических

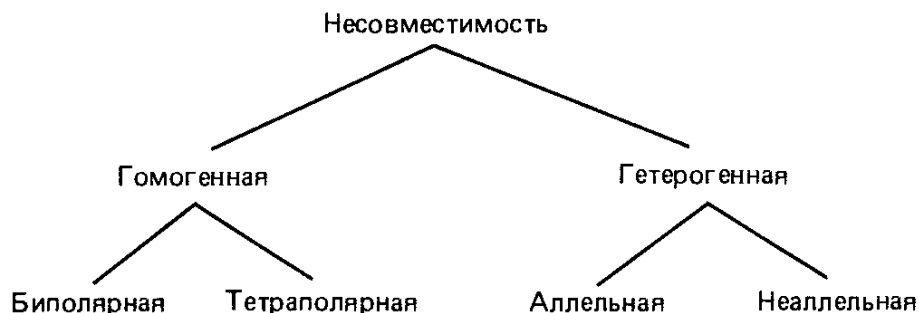


Рис. 8.10. Классификация типов несовместимости у грибов (К. Eeser, 1971)

факторам несовместимости A и B . При различии только по одному из факторов $A=, B \neq$ или $A \neq, B=$ (где $=$ означает одинаковые, а \neq — различающиеся факторы) гифы сливаются и осуществляется лишь часть реакций полового морфогенеза, не завершающаяся слиянием ядер. Гомогенный тип несовместимости у грибов сходен с гомоморфическим типом несовместимости высших растений, который был рассмотрен ранее.

Гетерогенная несовместимость означает, что половой процесс происходит только между штаммами, одинаковыми по факторам несовместимости. При этом (см. рис. 8.10) несовместимость контролируется как аллелями одного гена, так и разными генами. Этот сложный контроль может накладываться на гомогенную несовместимость, как это наблюдается у *Podospora anserina*. В пределах каждой географической расы этого гриба отмечено два типа спаривания: «+» и «—». Нормальный половой процесс завершается только тогда, когда скрещиваемые штаммы «+» и «—» типов спаривания одинаковы по аллелям гена t . У *P. anserina* существует и *неаллельный механизм гетерогенной несовместимости*, исследованный значительно хуже, чем аллельный. При неаллельном механизме несовместимости для нормального скрещивания необходимо, чтобы штаммы были одинаковыми сразу по нескольким генам (не менее четырех).

Разнообразие жизненных циклов и типов несовместимости у грибов накладывает отпечаток и на приемы, используемые при их гибридологическом анализе. У одних грибов половой процесс осуществляется на основе гетерогамии, как у нейроспоры, что позволяет ставить реципрокные скрещивания. У других — на основе изогамии, как у дрожжей сахаромикетов. Наряду с половым размножением существует полный или неполный *парасексуальный цикл* в зависимости от вида грибов. Парасексуальный цикл — это процесс объединения и последующей рекомбинации генов на основе событий, происходящих в митозе, а не в мейозе, без участия оплодотворения половым путем. Остановимся только на двух подходах, внесших существенный вклад в разработку проблем общей генетики: тетрадном анализе и генетическом анализе на основе парасексуального процесса.

Тетрадный анализ

Как уже отмечалось, тетрадный анализ (см. гл. 4) сыграл решающую роль в доказательстве правила чистоты гамет, в изучении кроссинговера на стадии четырех хроматид и в решении других проблем, о которых будет сказано позже (гл. 10).

В отличие от генетического анализа, основанного на случайной выборке продуктов расщепления (у высших растений, животных и большинства микроорганизмов), где единицей варьирования (измерения) служит особь или клетка, в тетрадном анализе такой единицей является тетрада, точнее, само расщепление в тетраде. При моногибридном скрещивании типичное расщепление в тетрадах — соотношение $2A:2a$, если у объекта четырехспоровые аски, как у дрожжей или *Neurospora tetrasperma*, а также тетрады микроспор, как у высших растений. В случае восьмиспоровых асков (октад) это соотношение преобразуется в $4A:4a$, как у *N. crassa* (см. гл. 7) или *Sordaria fimicola*. Далее будут рассмотрены только тетрады при условии идентичности продуктов постмейотического митоза в октадах.

Рассматривают тетрады упорядоченные, как у *N. crassa*, и неупорядоченные, как *Saccharomyces*, где обычно невозможно установить порядок аскоспор относительно направления веретена двух мейотических делений. В обоих случаях (для упорядоченных и неупорядоченных тетрад) при дигибридном скрещивании, например $AB \times ab$, в общем виде рассматривают три типа тетрад — *родительский дитип* (P), *неродительский дитип* (N) и *тетратип* (T):

P	N	T
<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>AB</i>
<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>Ab</i>
<i>ab</i>	<i>aB</i>	<i>aB</i>
<i>ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>

Пусть гены *A* и *B* находятся в разных хромосомах. Тетрады P и N могут появиться, если в первом делении мейоза совпадает расщепление (редукция) по центромерам и по обоим факторам: A/a и B/b . Эти случаи носят название *расщепление при первом делении мейоза*. Тетрады T появляются только в результате кроссинговера на участке ген A/a (и/или B/b) — центромера (рис. 8.11). На этом факте основано картирование генов по отношению к центромерам.

Если гены *A* и *B* не сцеплены между собой и свободно рекомбинируют со своими центромерами, т. е. достаточно удалены от них, то легко убедиться, что соотношение тетрад $P : N : T = 1 : 1 : 4$, поскольку тетрады T возникают в результате четырех вариантов обменов на стадии четырех хроматид на участке ген — центромера.

Если оба гена *A* и *B* сцеплены достаточно тесно со своими центромерами, то *расщепление при втором делении* будет затруднено (кроссинговер редок), что приводит к уменьшению частоты

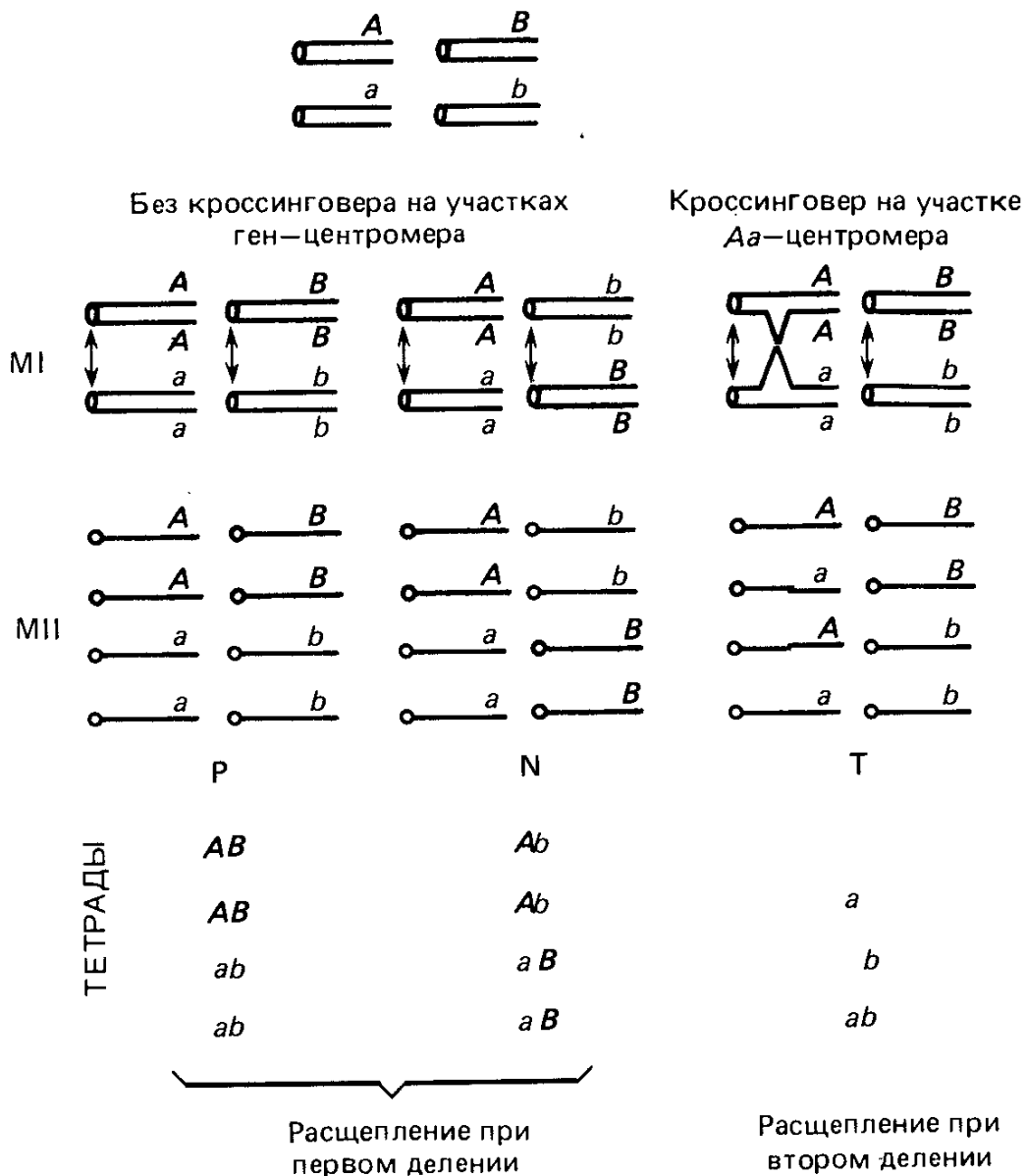


Рис. 8.11. Образование тетрад Р, N и Т в зависимости от наличия или отсутствия кроссинговера между генами и соответствующими центромерами.

MI, MII — первое и второе деления мейоза

тетрад Т. Тогда при $P = N$, $T < \frac{2}{3}$ можно определить расстояние генов от своих центромер по частоте расщепления при втором делении. Реально для неупорядоченных тетрад расстояния ген — центромера определяют при тригибридном скрещивании, при котором все три гена обнаруживают сцепление с разными центромерами. В случае упорядоченных тетрад расстояние ген — центромера можно определить и при моногибридном скрещивании (см. гл. 7) по расположению спор в линейном аске.

Если гены А и В сцеплены между собой, то тетрады Р и N появляются не с равной частотой: $P > N$, а $T < \frac{2}{3}$. В этом случае расстояние между генами можно определить также исходя из частот Т. В общем виде формула для определения расстояния (D) меж-

ду генами: $D = -33,33 \ln [1 - 1,5f(T)]$, где $f(T)$ — частота тетратипов (производная от функции Холдейна, см. гл. 7).

Расстояние между генами и центромерами определяют при тригибридном скрещивании, пользуясь той же формулой, однако теперь величина D — это сумма расстояний двух генов от их центромер. Так определяют D_{AB} , D_{AC} и D_{BC} , далее — расстояние каждого гена от своей центромеры:

$$D_A = \frac{D_{AB} + D_{AC} - D_{BC}}{2}; \quad D_B = \frac{D_{AB} + D_{BC} - D_{AC}}{2}$$

$$\text{и } D_C = \frac{D_{AC} + D_{BC} - D_{AB}}{2}.$$

Расстояние выражается в условных единицах — стрейнах. Наименование «Стрейн» происходит от общего сокращения имен трех генетиков, внесших выдающийся вклад в изучение рекомбинации: Стертеванта, Троу и Холдэйна. Подробное обоснование и вывод этих формул можно найти в специальных руководствах¹.

При гибридологическом анализе у грибов можно использовать случайную выборку гаплоидных сегрегантов при освобождении аскоспор из асков. Конкретная тактика использования приемов генетического анализа диктуется его задачами. Так, расстояние между генами проще определить в случайной выборке аскоспор, а сцепление генов с центромерами — в тетрадном анализе. В дальнейшем будет показано, что сцепление генов с центромерами можно определить и в случайной выборке аскоспор, и даже при моногибридном скрещивании, но для этого следует обратиться к полиплоидам (гл. 14).

Генетический анализ при парасексуальном процессе

У многих грибов возможно слияние вегетативных гиф, в результате чего гаплоидные ядра штаммов оказываются в общей цитоплазме. При генетических различиях между такими ядрами возникают гетерокарионы, которые могут длительно существовать, как, например, у *N. crassa*. Этот прием широко используется для изучения взаимодействия между генами, аллелями, между генами ядра и цитоплазмой. При этом между аллелями одного гена могут устанавливаться рецессивно-доминантные отношения, в общих чертах аналогичные отношениям в гетерозиготе. Однако в тех случаях, где это возможно сравнивать, гетерозиготы и гетерокарионы иногда показывали разный характер аллельных взаимодействий, что, по-видимому, связано минимум с двумя обстоятельствами: 1) количественное соотношение ядер, а значит, и аллелей в гетерокарионе может варьировать; 2) аллели и гены одного ядра пространственно разделены не так, как в гетерокарионе.

У некоторых грибов, например у *N. crassa*, гаплоидные гетеро-

¹ Захаров И. А. Курс генетики микроорганизмов. М., 1978. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. М., 1984.

карионы можно поддерживать неограниченно долго. У других грибов, например у видов *Aspergillus*, этот процесс дальше развивается в форме парасексуального цикла, как назвал его Г. Понтекорво в 1949 г. Ядра гетерокариона иногда сливаются с образованием диплоидных участков мицелия, которые можно селективировать при действии паров *d*-камфоры, как это делается для *Aspergillus nidulans* и *Penicillium chrysogenum*. Далее в ходе митотических делений диплоидные ядра могут претерпевать два независимых процесса: гаплоидизацию и митотический кроссинговер, ведущих к митотическому или соматическому расщеплению.

Гаплоидизация происходит спонтанно. Ее эффективно индуцирует п-фторфенилаланин.

Если при митотических делениях диплоидных ядер теряется одна хромосома ($2n - 1$), то возникающее анеуплоидное ядро становится нестабильным и последовательно теряет все хромосомы одного набора, пока не установится стабильное гаплоидное число. При этом хромосомы разных пар ведут себя независимо, а гены одной хромосомы обнаруживают абсолютное сцепление. Поэтому для локализации неизвестного гена в уже маркированной группе сцепления необходимо установить, с какими из маркеров постоянно ассоциирован исследуемый ген при гаплоидизации.

Локализовать ген уже в пределах группы сцепления можно на основе митотического кроссинговера, спонтанного или индуцированного рекомбинационными факторами (см. гл. 7). Следует помнить, что кроссинговер на участке ген — центромера приводит к гомозиготизации всех генов, расположенных дистальнее точки обмена в половине ядер (клеток) — потомков рекомбинантного ядра (см. гл. 7, рис. 7. 9, Б и рис. 8. 12). Таким образом, митотический кроссинговер можно использовать для локализации генов одного плеча хромосомы по отношению к центромере.

При этом расстояние наиболее удаленного от центромеры маркера (гомозиготизация по которому происходит чаще всего) принимается за 100 %, а расположение остальных маркеров определяют по формуле

$$D = \frac{Nab}{Nb} \cdot 100\%,$$

где D — расстояние ген — центромера, Nb — общее число митотических сегрегантов, гомозиготных по b ; Nab — число сегрегантов, гомозиготных по a и b одновременно, если b — маркер, наиболее удаленный от центромеры.

При изучении рекомбинации с центромерой гены различных плеч одной хромосомы не обнаруживают сцепления, т. е. ведут себя независимо. Сцепление между ними устанавливается при исследовании гаплоидизации.

Рассмотрим картирование на основе митотического кроссинговера на примере данных, полученных Г. Понтекорво и Г. Кейфер (1958) для *Aspergillus nidulans*. Диплоид $\frac{ade+}{+} \frac{pab}{pab} \frac{pro}{pro} \frac{y}{y}$ (ade , pab , pro — потребность в аденине, p -аминобензойной кислоте, проли-

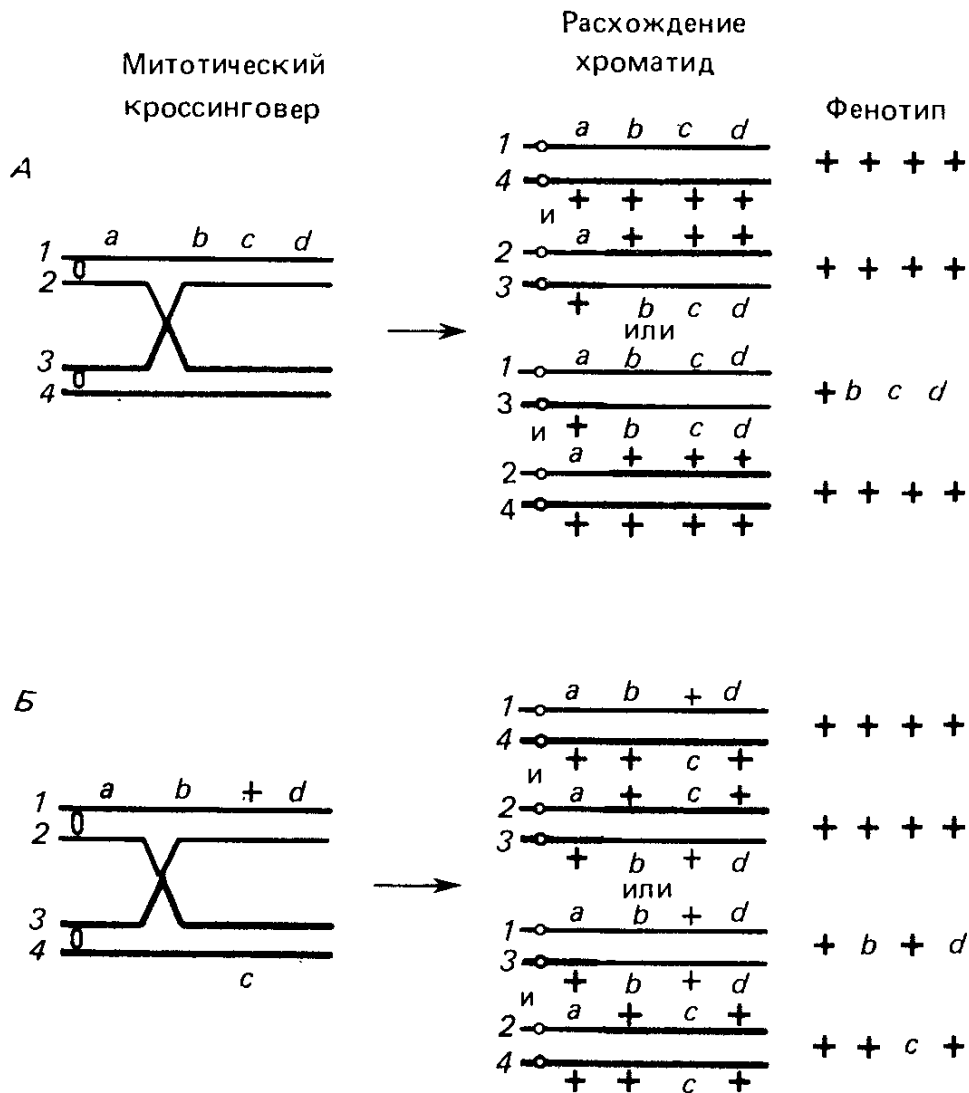


Рис. 8.12. Результат митотического кроссинговера на участке $a-b$ в тетрагетерозиготе по сцепленным генам, когда рецессивная аллель картируемого гена c находится в маркированном гомологе (А) и в немаркированном гомологе (Б) (J. Barnett, 1983):

«+» — доминантные аллели генов a, b, c, d

не, y — желтая окраска конидий), дал следующее соотношение (среди 371 митотических рекомбинантов, гомозиготных по y , который служил в данном случае в качестве маркера-селектора):

+	+	+	y	96
+	rab	+	y	245
+	rab	pro	y	30
ade	rab	pro	y	0

В предварительных опытах по гаплоидизации было показано, что все четыре гена находятся в одной группе сцепления. Самое большое расстояние от центromеры принимается за 100%; расстояние центromера — pro $30:371 \cdot 100\% = 8\%$; центromера — rab $275:371 \cdot 100\% = 74\%$. Таким образом установили порядок расположения генов и их расстояние от центromеры (рис. 8.13). Рекомбинанты, гомозиготные по ade , не были получены, возможно,

из-за очень тесного сцепления *ade* с центромерой либо из-за того, что *ade* находится в другом плече хромосомы, а двойной митотический кроссинговер случается очень редко.

Таким образом, парасексуальный процесс, различные этапы которого имеют низкую частоту, тем не менее дает надежные результаты при генетическом анализе.

На картах групп сцепления, построенных на основе учета мейотической и митотической рекомбинации, т. е. при парасексуальном процессе, гены располагаются в одинаковой последовательности, как это показано для *Aspergillus nidulans*.

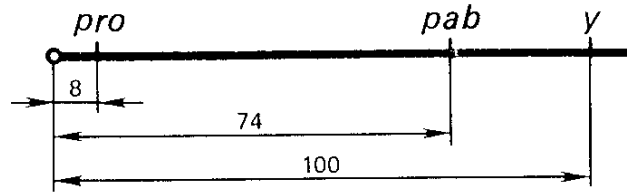


Рис. 8.13. Расположение трех генов по отношению к центромере (светлый кружок) на основе митотического кроссинговера у *Aspergillus nidulans* (по данным G. Pontecorvo, H. Kafer, 1958)

8.7. Одноклеточные зеленые водоросли

У одноклеточных зеленых водорослей как микробиологического объекта известен очень узкий круг пищевых потребностей — ауксотрофность по аргинину и по некоторым витаминам. То же характерно и для всех зеленых растений. Причины такого явления еще не установлены. Водоросли представляют собой удобный объект для изучения генетики фотосинтеза.

Жизненный цикл наиболее изученного в генетическом отношении представителя водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* показан на рис. 8.14. Это гапобионт. В результате копуляции подвижных гамет «+» и «—» типов спаривания образуется зигота, которая после периода созревания делится мейотически и образует четыре или восемь гаплоидных клеток — неупорядоченные тетрады или октады. Тем самым у хламидомонады возможен тетрадный анализ. Половой процесс у хламидомонады осуществляется между морфологически одинаковыми гаметами «+» и «—», которые вносят одинаковое количество цитоплазмы в зиготу. Гаплоидные потомки наследуют тип спаривания в соотношении: 2+ : 2—.

Гибридологический анализ возможен также у *Volvox*.

Наряду с хламидомонадой и вольвоксом в генетических исследованиях используют также ряд агамных, лишенных полового процесса водорослей: *Chlorella*, *Euglena*, *Scenedesmus*. Возможности генетического анализа у них ограничиваются получением мутантов и исследованием их вегетативного потомства.

8.8 Простейшие

В настоящее время простейшие (Protozoa) выделяют в самостоятельное подцарство, включающее 7 типов и насчитывающее более 65 000 видов, из них более 10 000 видов составляют паразитические простейшие. Генетика их почти не разработана. Характерная черта

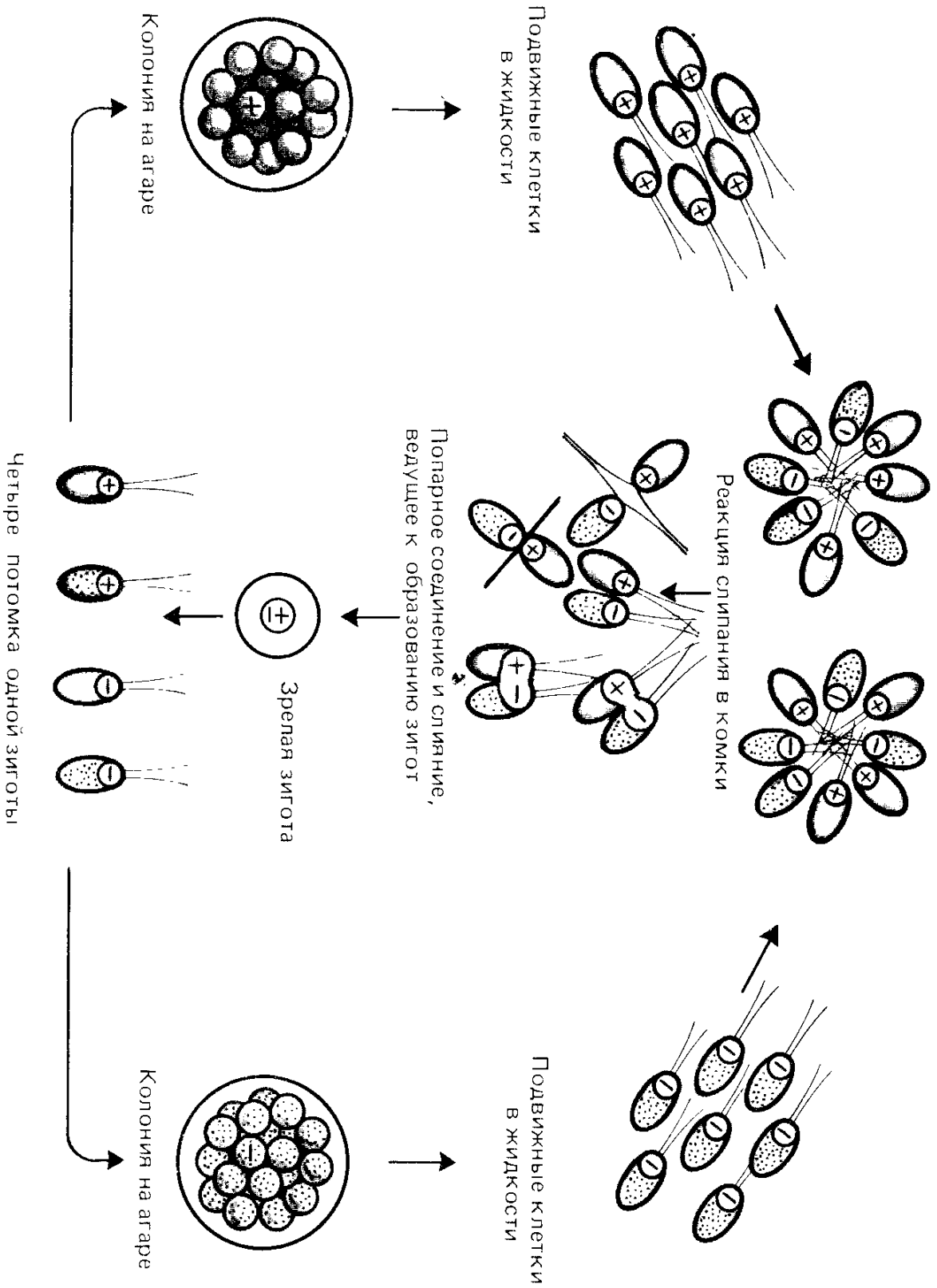


Рис. 8.14. Жизненный цикл *Chlamydomonas reinhardtii* (по Р. Сэджер, 1975)

простейших — ядерный дуализм, т. е. сосуществование в одной клетке-организме так называемого генеративного ядра — диплоидного микронуклеуса (*Mi*), и в высокой степени полиплоидного (до нескольких сот *n*) вегетативного ядра — макронуклеуса (*Ma*). Полиплоидное вегетативное ядро функционирует в ходе вегетативного размножения клона. Высокий уровень плоидности *Ma* создает препятствие для выделения и исследования рецессивных аллелей. Генеративное ядро — хранилище генетической информации — осуществляет свои функции во время полового процесса — конъюгации.

Система половых типов может быть биполярной, как, например, у *Paramecium aurelia*, у которой противоположные половые типы наследуются как рецессивный (*rr*) и доминантный признаки (*Rr*, *RR*), контролируемые аллелями одного гена. Известны случаи множественных половых типов: например, у *P. bursaria* встречается тетраполярная система, контролируемая двумя генами, и система из восьми половых типов, контролируемая тремя генами. В последнем случае различие хотя бы по одному из трех генов определяет принадлежность к отдельному половому типу. У другого рода инфузорий *Euplotes* известна серия множественных аллелей локуса типов спаривания (*mt*), в которой принадлежность к половому типу определяется доминантной аллелью в ряду: $mt^5 > mt^4 > mt^3 > mt^2 > mt^1$, где знак $>$ означает доминирование.

Конъюгацию между клетками разных половых типов рассмотрим на примере *Paramecium caudatum*. У нее вегетативные клетки объединяются в пары (рис. 8.15). *Mi* претерпевает два деления мейоза. Три образовавшихся гаплоидных ядра дегенерируют, а одно еще раз делится митотически. Одно из образовавшихся ядер мигрирует в клетку партнера. Этот процесс происходит реципрокно. Поступившее ядро сливается с собственным ядром клетки-реципиента, образуя синкарион. После обмена пронуклеусами клетки расходятся. После этого синкарион делится несколько раз митотически, и образовавшиеся ядра дифференцируются на *Ma* и *Mi*. При этом в *Ma* происходит эндомитотическая полиплоидизация. Старый *Ma* дегенерирует.

Реорганизация ядерного аппарата простейших может происходить не только при конъюгации, но и в результате автогамии (рис. 8.16). У *Paramecium aurelia*, например, при автогамии реорганизация ядерного аппарата происходит в одной клетке. В результате мейоза и последующего митоза *Mi* образуются восемь гаплоидных ядер, из которых два сливаются. Диплоидный синкарион делится и дифференцируется на *Ma* и *Mi*.

Таким образом, конъюгация — это процесс, аналогичный перекрестному оплодотворению, а автогамия — самооплодотворению.

Процессы, ведущие к рекомбинации у простейших, по-видимому, очень разнообразны. У некоторых из них в отличие от *Paramecium* наблюдается так называемая тотальная конъюгация, у других происходит только обмен ядрами, у третьих — и обмен цитоплазмой и т. д. Многочисленны вариации в осуществлении мей-

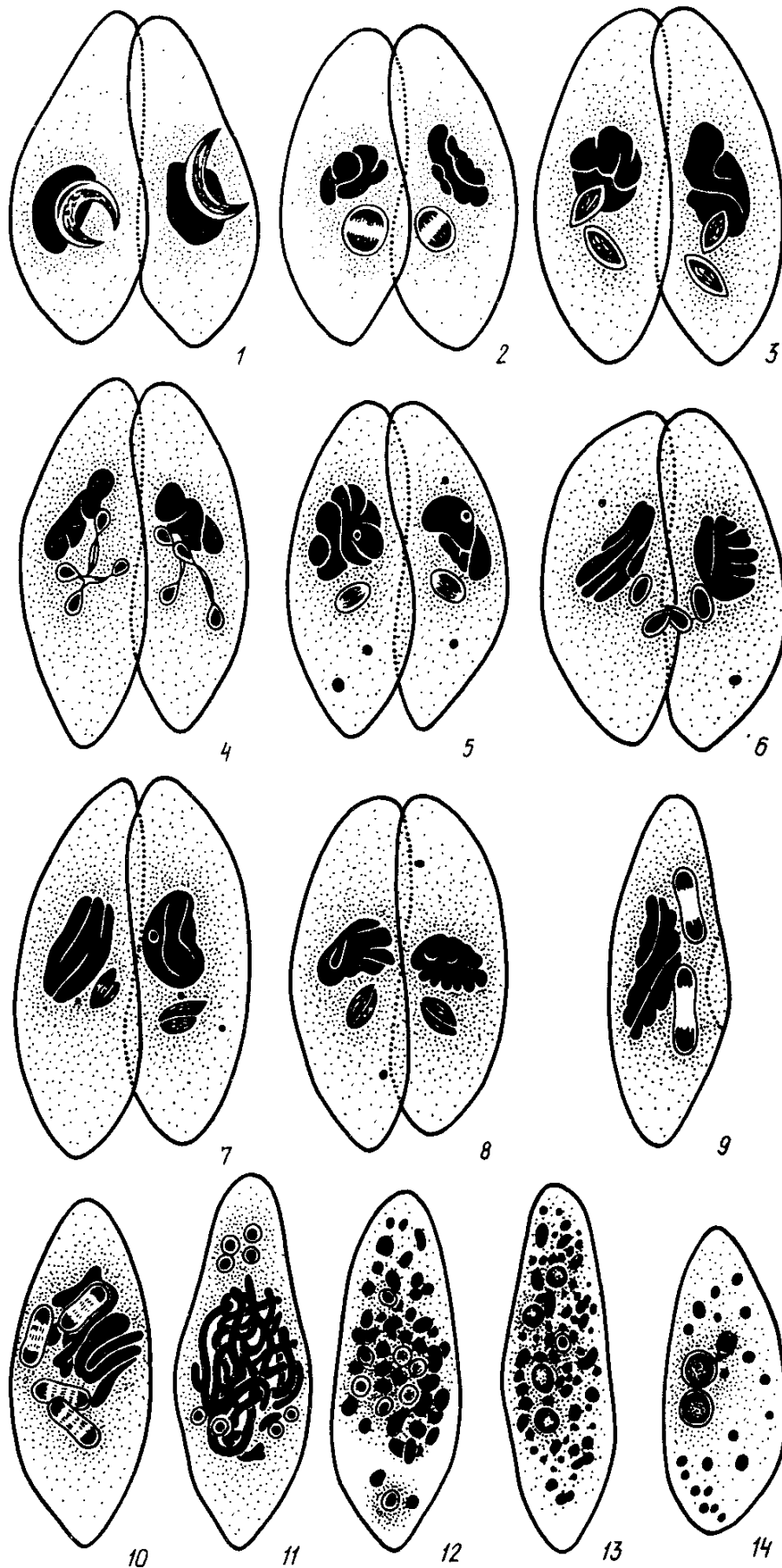


Рис. 8.15. Конъюгация *Paramecium caudatum* (по И. Б. Райкову, 1972):

1, 2 — первое деление мейоза Mu , 3, 4 — второе деление мейоза Mu , 5 — метафаза митотического деления Mu , 6 — обмен пронуклеусами, 7 — слияние пронуклеусов, 8—10 — деление синкариона, 11 — дифференцировка дериватов синкариона на четыре зачатка Ma в передней части клетки и на четыре зачатка Mu в задней части клетки, 12 — фрагментация старого Ma , 13 — начало развития зачатков нового Ma , 14 — потомок первого деления эконъюганта с двумя зачатками Ma и одним Mu

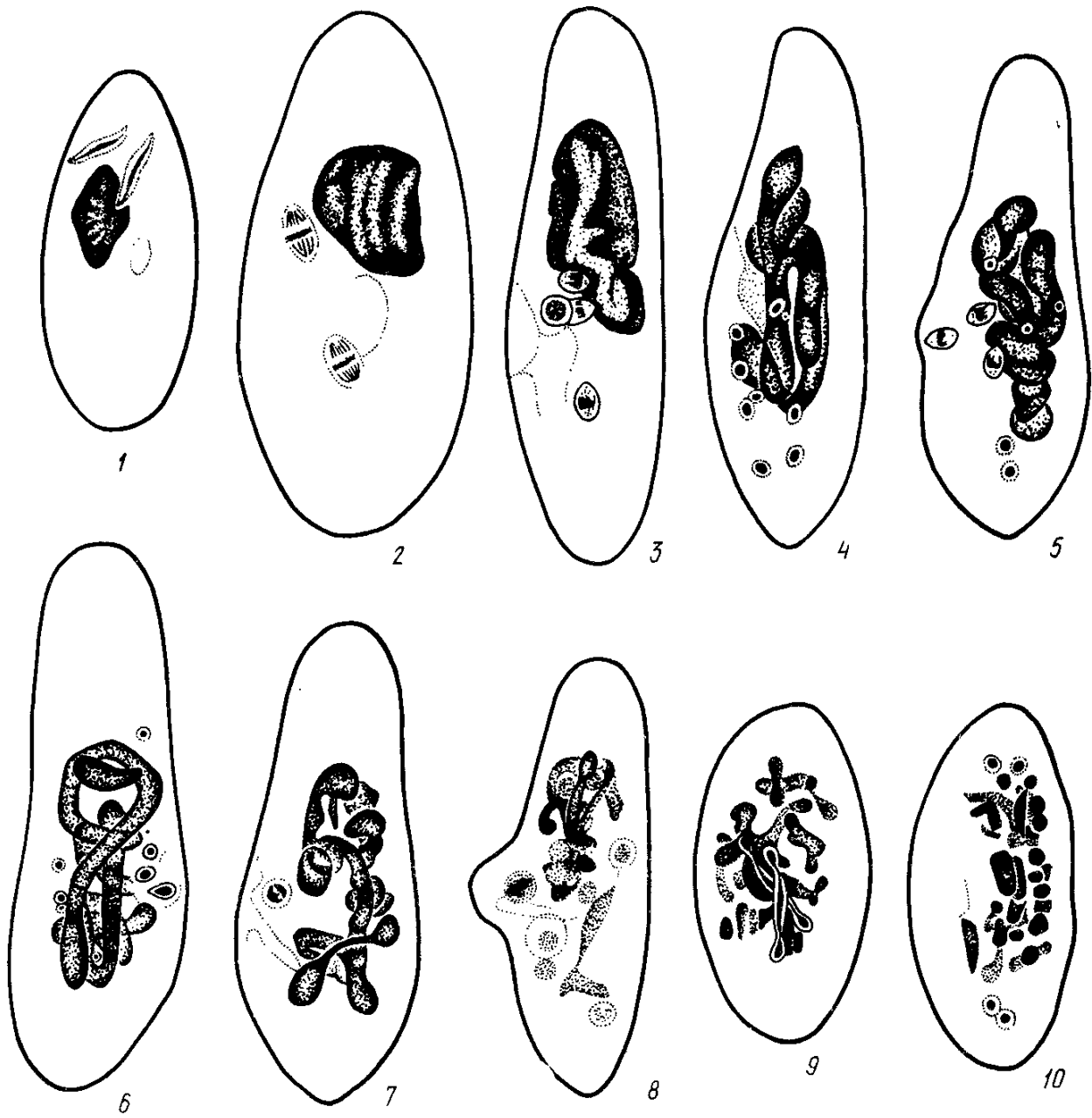


Рис. 8.16. Автогамия у *Paramecium aurelia* (по И. Б. Райкову, 1972):
 1, 2 — первое деление мейоза Ми, 3 — второе деление мейоза Ми, 4 — восемь продуктов второго деления Ми, начало фрагментации Ма, 5 — метафаза третьего — митотического деления Ми, 6 — пронуклеусы в пароральном конусе, 7 — синкарион, 8—9 — первое и второе деления дериватов синкариона; 10 — четыре деривата синкариона перед началом дифференцировки на Ми и Ма

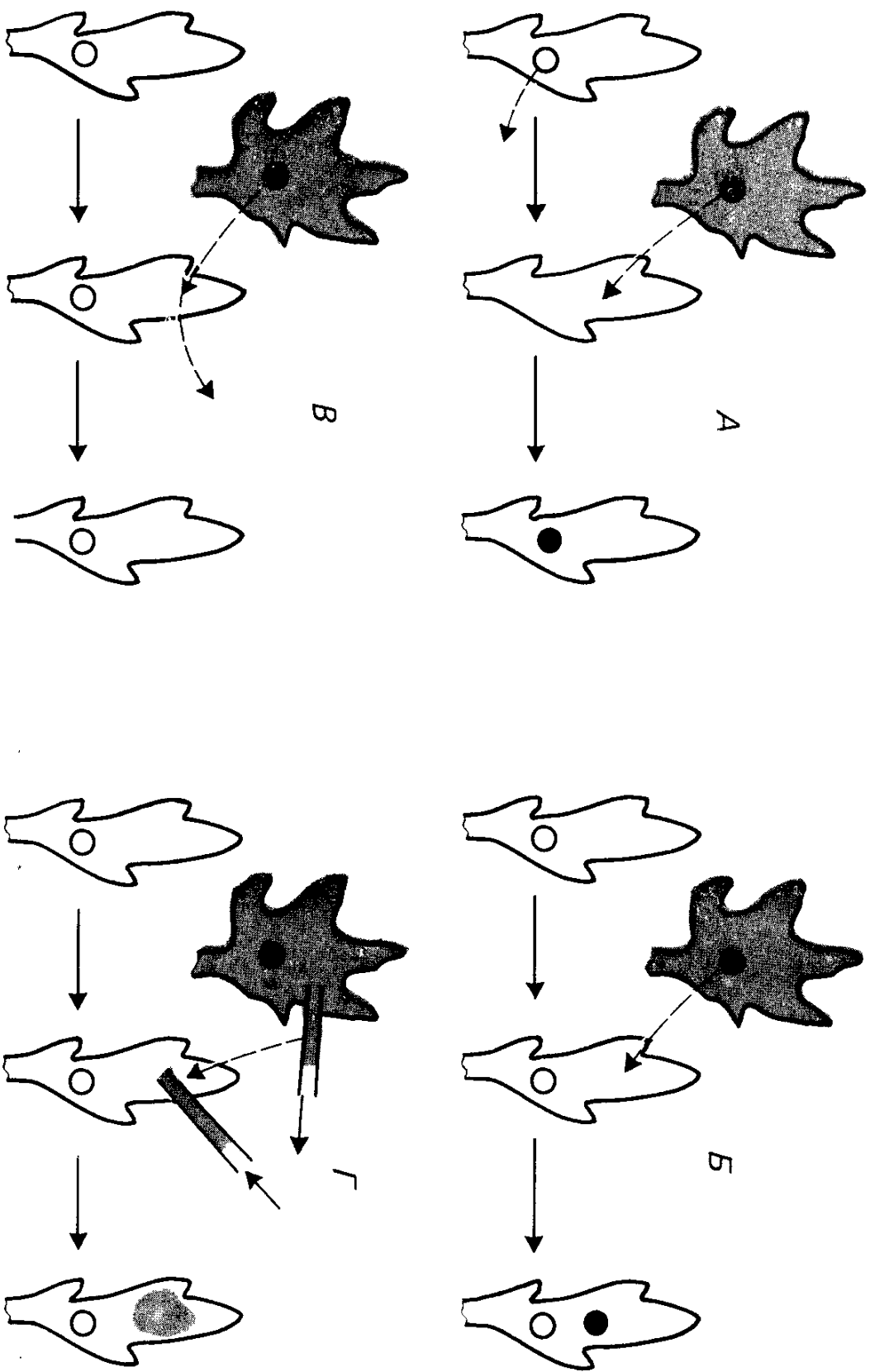


Рис. 8.17. Основные типы микрохирургических операций, применяемые при изучении ядерных и ядерно-цитоплазматических отношений у амёб (А. Л. Юдин, 1982):
 А — получение ядерно-цитоплазматического «гибрида»; Б — получение гетерокариона; В — временная имплантация ядра; Г — трансплантация цитоплазмы

оза вплоть до *одноступенчатого мейоза* у некоторых фораминифер, когда число хромосом редуцируется за одно деление, без предварительной репликации.

Существует большое число видов Protozoa, лишенных полового процесса. К их числу относятся и различные виды амёб. Для генетического анализа у агамной *Amoeba proteus* А. Л. Юдин предложил элегантный метод микрохирургической *пересадки ядер* (рис. 8. 17), позволяющий исследовать ядерно-цитоплазматические отношения и их генетические последствия. Этим методом была обнаружена ядерно-цитоплазматическая несовместимость между разными клонами одного вида, а также была доказана ядерная детерминация целого ряда наследственных признаков у *A. proteus* (устойчивость к метионину, этиловому спирту, форма клетки, теплоустойчивость, скорость прикрепления к субстрату и т. д.).

В последние годы Л. Н. Серавин и А. В. Гудков описали у некоторых видов амёб явление паракопуляции, которое заключается в объединении двух многоядерных особей, затем в их полном слиянии и через некоторое время разделении на две. Генетические последствия такой паракопуляции еще не изучены.

Итак, в этой главе были рассмотрены некоторые наиболее изученные процессы, ведущие к объединению и рекомбинации генетического материала у многоклеточных и одноклеточных эукариот. Эти процессы весьма разнообразны внешне, но по сути своей сводятся к закономерной смене диплофазы на гаплофазу в результате мейоза и смене гаплофазы на диплофазу в результате оплодотворения. Исключение составляет парасексуальный процесс. Знание этих процессов необходимо при исследовании каждого вида для правильного планирования эксперимента по генетическому анализу и для интерпретации его результатов. На этих знаниях основывается обширная отрасль генетики — частная генетика отдельных видов.

Наконец, знание генетического смысла жизненных циклов имеет общебиологическое значение, поскольку позволяет оценить роль тех или иных стадий развития организма в обеспечении стабильности и комбинативной изменчивости вида в природе.

Вопросы к главе 8

1. Сколько гамет образуется из 100 сперматоцитов I порядка? Из 100 сперматид? Из 100 ооцитов II порядка?
2. Проявите на примере генетический эффект двойного оплодотворения.
3. Какие генотипы эндосперма и зародыша семени можно получить при опылении растений *aaVb* пыльцой растений *AAbb*?
4. Если в клетках кончиков корешков гороха насчитывается 14 хромосом, то сколько хромосом содержит: 1) яйцеклетка, 2) микроспора и мегаспора, 3) эндосперм, 4) материнская клетка мегаспоры?

5. Перечислите элементы сходства в процессах оогенеза у животных и мегаспорогенеза у растений.

6. Каковы результаты дигибридного скрещивания у дрожжей при тетрадном анализе, если одна родительская форма является ауксотрофом по метионину, а другая — по лейцину. Гены не сцеплены друг с другом, но полностью сцеплены со своими центромерами.

7. Какие типы тетрад образует диплоидный штамм дрожжей генотипа $\frac{AB}{ab}$, если гены *A* и *B* полностью сцеплены?

8. Как образуются тетрады тетратипа при мейозе у дрожжей? Пояснить схемой.

9. Какие типы тетрад и в каком соотношении возникают в потомстве диплоидного штамма дрожжей, полученного при скрещивании штамма, ауксотрофного по аденину (*ade*), со штаммом, ауксотрофным по гистидину (*his*)? Гены, контролирующие синтез аденина и гистидина, не сцеплены друг с другом и со своими центромерами.

10. У гетерозиготного диплоида *Asp. nidulans ABC/abc* получены митотические сегреганты фенотипа: *aBC* (80), *abc* (20), *abC* (60). В скобках — число полученных сегрегантов. Как можно объяснить эти результаты? Можно ли представить их в виде генетической карты?

11. Что является спорофитом и гаметофитом у высших растений?

12. При изучении каких признаков у высших растений можно анализировать расщепление на гаметическом уровне?

Глава 9

Жизненные циклы. Процессы, ведущие к рекомбинации у бактерий и бактериофагов

Между процессами, ведущими к рекомбинации у эукариот, при всем их разнообразии гораздо больше сходства, чем между аналогичными процессами у эукариот и прокариот. Процессы, предшествующие рекомбинации у прокариот, не столь сложны, что связано с относительной простотой их организации. Прокариоты, к которым относят бактерии, актиномицеты, цианобактерии (синезеленые водоросли) и др., как правило, одноклеточны, дифференцировка их клеток никогда не достигает уровня, характерного даже для примитивных эукариот, у них не бывает ни мейоза, ни митоза, а строение клетки (рис. 9.1) характеризуется отсутствием компартментализации. На электронных микрофотографиях клеток прокариот можно видеть только две структурно различающиеся области: цитоплазму и нуклеоплазму, или *нуклеоид*. Цитоплазма и нуклеоид не разделены мембраной. Внутренние мембраны также отсутствуют. Единственное исключение — фотосинтетический аппарат цианобактерий, располага-

ющийся на уплощенных мембранных мешках, или *тилакоидах*, сходных с тилакоидами пластид. В отличие от растений у цианобактерий они не заключены в специальную органеллу, а лежат непосредственно в цитоплазме.

Основные различия генетической организации прокариот и эукариот представлены в табл. 9.1.

Именно простота организации прокариот объясняет быстрый прогресс в изучении генетического аппарата бактерий, к которым генетики обратились только в начале 40-х годов. С 1944 по 1952 г. у бактерий были расшифрованы три основных процесса, приводящие к объединению и рекомбинации генетического материала: *трансформация, конъюгация и трансдукция*.

Все эти способы «гибридизации» бактерий используют в их генетическом анализе в зависимости от целей, которые ставит перед собой экспериментатор.

9.1. Конъюгация

Конъюгацией называется непосредственный контакт между клетками бактерий, сопровождаемый переносом генетического материала из клеток донора в клетки реципиента.

Процесс конъюгации у бактерий *Escherichia coli* (кишечной палочки) был открыт

Таблица 9. 1 Различия генетической организации прокариот и эукариот (по Р. Стейниеру, Э. Эдельбергу, Дж. Ингрэму, 1979, с изменениями)

Особенность организации	Эукариоты	Прокариоты
Нуклеоплазма окружена мембраной	+	--
Число хромосом ¹	>1	1
Хромосомы содержат гистоны	+	--
Имеется ядрышко	+	--
Митоз	+	--
Мейоз	+	--
ДНК в органеллах	+	--
Слияние гамет	+	--

¹ Часть дополнительной генетической информации может содержаться в плазмидах автономных генетических элементах (см. с 201)

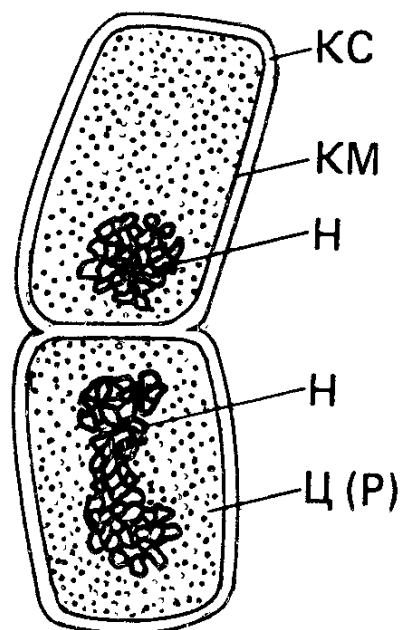


Рис. 9.1. Схема строения делящейся прокариотической клетки:

КС — клеточная стенка, КМ — клеточная мембрана, Н — нуклеоплазма, или нуклеоид, имеющая фибриллярную структуру, Ц(Р) — цитоплазма, заполненная рибосомами и имеющая зернистую структуру

в 1946 г. Дж. Ледербергом и Е. Тэйтумом на основании генетического подхода. При этом исследователи руководствовались следующими принципами, ставшими затем классическими при обнаружении полового процесса у любых микроорганизмов.

1. Необходимо работать со штаммами одного вида бактерий.

2. Следует учитывать различия по нескольким стабильным признакам.

3. Для получения гибридов или рекомбинантов необходимо применять метод селективных сред, для того чтобы регистрировать даже очень редкие события.

В отношении первых двух положений эта методология восходит к правилам менделевского гибридологического анализа (см. гл. 1).

В соответствии с изложенными принципами Дж. Ледерберг и Е. Тэйтум взяли два штамма *E. coli*, маркированные несколькими мутациями ауксотрофности:

I	thr	leu	thi	+	+
II	+	+	+	bio	met

Первый штамм нуждался в треонине, лейцине и тиамине, второй — в биотине и метионине. Реверсию, т. е. восстановление прототрофности по отдельным признакам, наблюдали с частотой около 1×10^{-7} . Следовательно, выбранные штаммы могли бы ревертировать к дикому типу, т. е. к полной прототрофности с частотой $1 \cdot 10^{-14} - 1 \cdot 10^{-21}$, если реверсии по всем признакам происходят независимо друг от друга.

Эти штаммы смешали в жидкой полноценной среде и инкубировали в течение 24 ч. После этого смесь высеяли на так называемую минимальную среду, не содержащую тех соединений, в которых нуждались исследуемые бактерии. Около 100 клеток на каждые 10^9 высеянных образовали колонии, т. е. прототрофы появились с частотой $1 \cdot 10^{-7}$, что значительно превосходит (на 7—14 порядков) частоту спонтанного ревертирования. Следовательно, эффект обусловлен именно совместным инкубированием двух штаммов и представляет собой какой-то вариант полового процесса.

Поскольку трансформация уже была известна, необходимо было выяснить, не имели ли Дж. Ледерберг и Е. Тэйтум дело с трансформацией. Оказалось, что обработка одного штамма фильтратом среды, в которой выращивали другой, не приводила к появлению прототрофов, так же как и выращивание двух штаммов в разных отсеках-U образной трубки, разделенной посередине бактериальным фильтром. Эффект наблюдался только при непосредственном контакте бактерий и не подавлялся ДНКазой.

Обнаружение полового процесса у бактерий вызвало целый ряд вопросов: Что представляют собой продукты гибридизации? Гаплоидны они или диплоидны? Какова роль гибридизуемых штаммов в этом процессе и можно ли говорить о половой дифференцировке? В какой форме осуществляется рекомбинация?

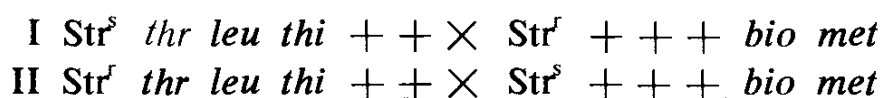
Вскоре были получены ответы на все эти вопросы.

Гаплоидность продуктов гибридизации бактерий. В эксперименте Дж. Ледерберга и Е. Тэйтума могли быть учтены диплоидные гибриды или гаплоидные рекомбинанты. Чтобы решить эту дилемму, в скрещиваемые штаммы ввели еще одно различие: устой-

чивость (V^r) — чувствительность (V^s) к бактериофагу (бактериальному вирусу).

Если продукты гибридизации диплоидны, то у них будет наблюдаться одна и та же реакция на бактериофаг: все они будут устойчивы либо чувствительны, либо обладать каким-то промежуточным уровнем устойчивости в соответствии с законом единообразия гибридов F_1 . В действительности среди прототрофных колоний (продуктов гибридизации) 36 % были устойчивы, а 64 % — чувствительны к бактериофагу. Следовательно, в эксперименте учитывали гаплоидных рекомбинантов, а диплоидная стадия отсутствовала или была очень кратковременна.

Перенос генетического материала от донора к реципиенту. В 1952 г. У. Хейс провел реципрокные скрещивания между штаммами *E. coli*, устойчивыми и чувствительными к стрептомицину (Str^r и Str^s):



Для учета рекомбинантов смесь клеток высевали на две среды: со стрептомицином и без него. При первом скрещивании рекомбинанты появились только на среде без стрептомицина, а при втором — как на среде со стрептомицином, так и без стрептомицина. Следовательно, для образования рекомбинантов необходимо сохранение клеток родителя: *thr leu thi* ++, которого обозначили как *женский* (F^-), а штамм +++ *bio met* — как *мужской* (F^+).

Рекомбинация происходит в клетках F^- — реципиентах, а клетки F^+ — доноры — передают генетический материал в клетки F^- . В 1958 г. Т. Андерсон доказал это прямым методом, скрещивая клетки, различавшиеся морфологически. Клетки F^- круглые, а F^+ — продолговатые, благодаря чему контакт между ними можно наблюдать в микроскоп (рис. 9.2). Кроме того, изолируя клетки после конъюгации, удалось показать, что только в потомстве бактерий F^- появляются рекомбинанты.

Контроль половой дифференцировки. Эписомы и плазмиды. Оказалось, что среди штаммов *E. coli* существует разнообразие по частоте образования рекомбинантов при скрещивании.

1. При совместной инкубации любых двух штаммов F^- рекомбинанты не образуются.

2. При скрещивании F^+ и F^- образуются рекомбинанты с частотой около $1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-6}$. При этом около 90% клеток F^- за 1 ч превращаются в клетки F^+ . Следовательно, *F-фактор* имеет инфекционную природу. Он относится к категории *плазмид* — *нехромосомных генетических детерминант*.

3. В комбинации $F^+ \times F^+$ рекомбинанты образуются с частотой $1 \cdot 10^{-7}$ и реже. В действительности эти события отражают переход F^+ в F^- с последующей конъюгацией между клетками F^+ и F^- .

4. Обнаружены также штаммы, которые при скрещивании с F^- образуют до $1 \cdot 10^{-1}$ рекомбинантов. При этом клетки F^- не

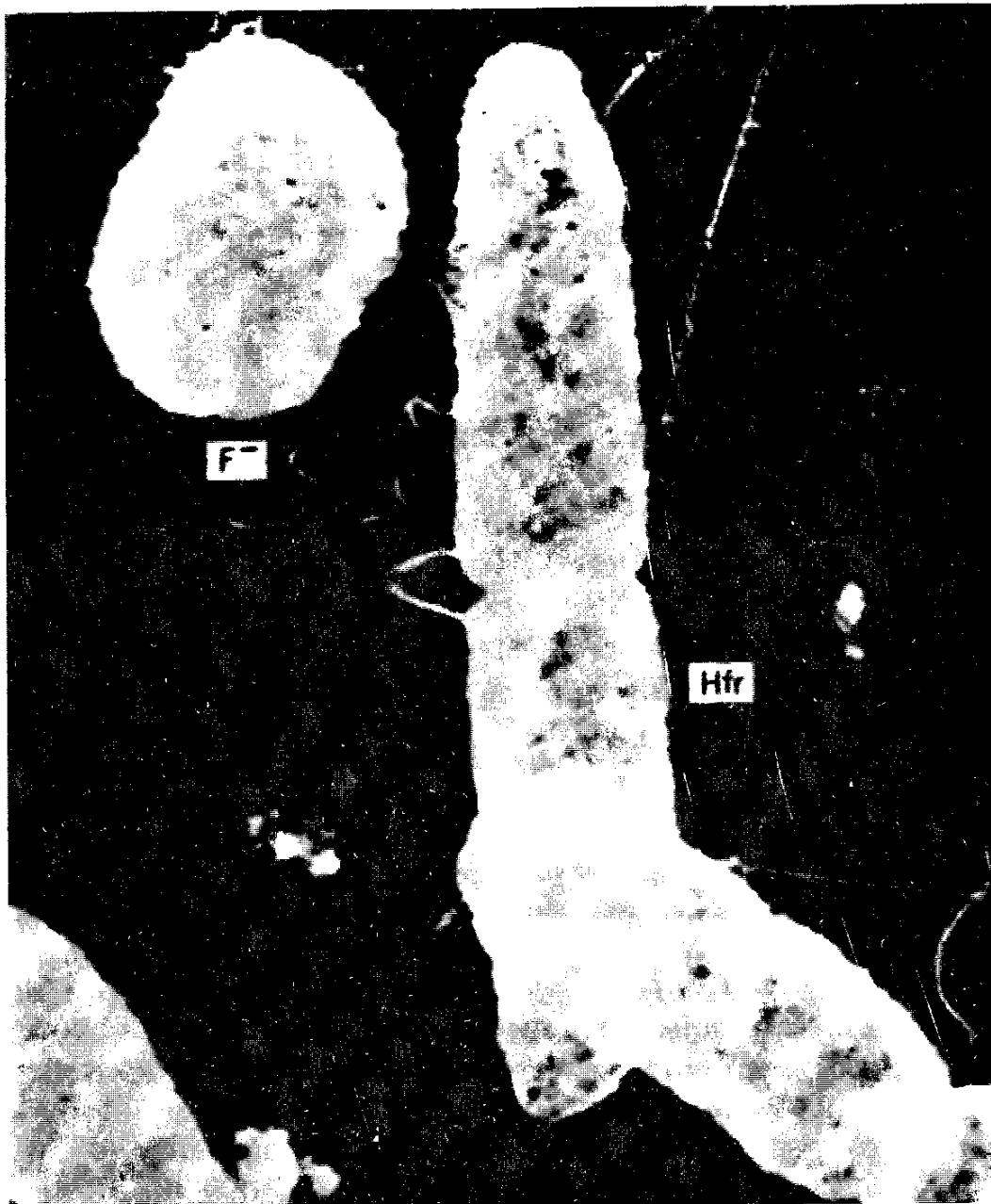


Рис. 9.2. Конъюгация между клетками F^+ (*Hfr* — продолговатая) и F^- (круглая) *E. coli* (по Г. Стенту и Р. Кэлиндару, 1981)

заражаются *F*-фактором. Такие высокоэффективные доноры называются *Hfr* (от англ. high frequency recombination — высокая частота рекомбинации). Оказалось, что клетки F^+ могут превращаться в клетки *Hfr* и обратно. В дальнейшем в большинстве экспериментов по конъюгации бактерий использовали доноры *Hfr*. Способность быть донором если и передается реципиенту при конъюгации со штаммом *Hfr*, то очень редко. В этом случае почти все рекомбинанты сохраняют свойства F^- . На основании этих данных было сделано заключение, что *F*-фактор может объединяться с хромосомой *E. coli*, интегрироваться с ней.

Таким образом, *F*-фактор может существовать в двух состояниях: автономном и интегрированном. Такие генетические детерминанты получили наименование *эписом*. К их числу относятся

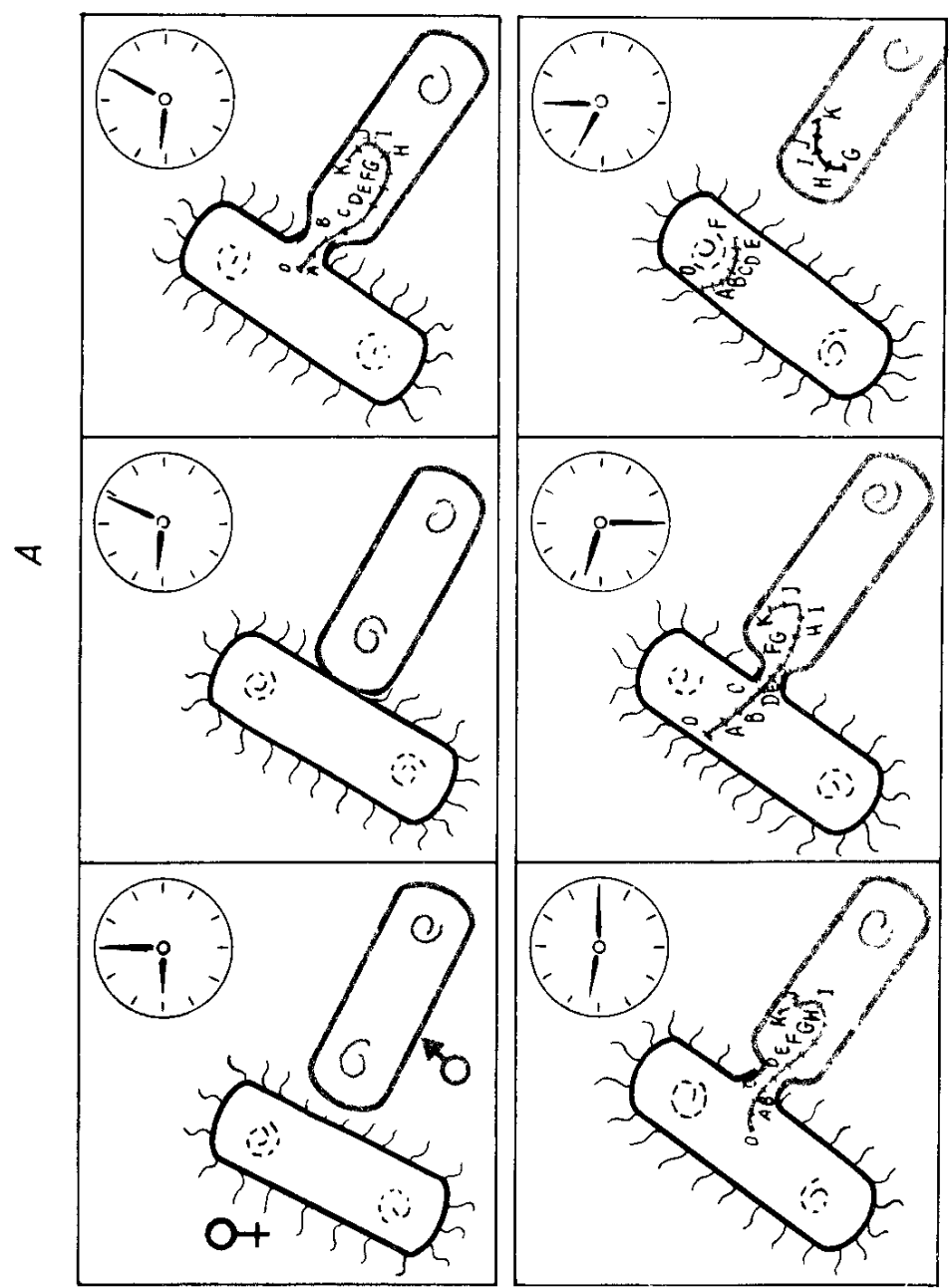
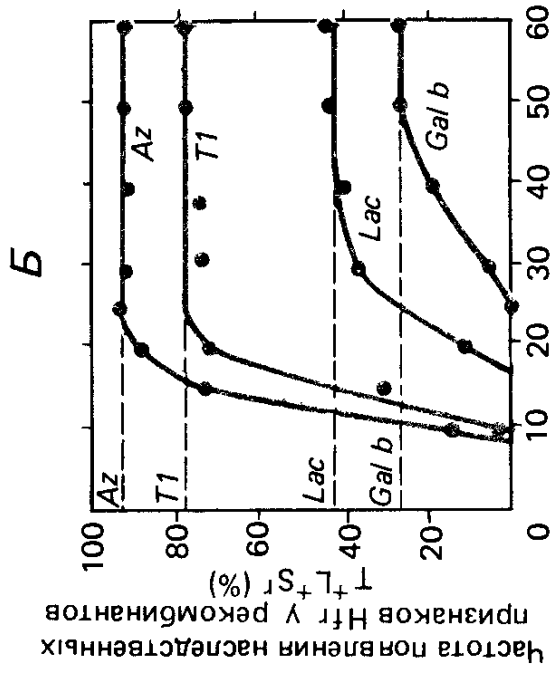


Рис. 9.3. Опыт Ф. Жакоба и Е. Вольмана по прерыванию конъюгации (по Ф. Жакобу и Е. Вольману, 1961):
 А — схема эксперимента; Б — зависимость появления рекомбинантов от времени конъюгации

бактериофаг λ , который или реплицируется автономно и лизирует клетки, или встраивается в геном *E. coli* в виде профага и реплицируется вместе с ним. Существуют эписомы, определяющие устойчивость к антибиотикам. Это *R*-факторы. Они могут «собрать» несколько генов устойчивости к разным антибиотикам и переносить их инфекционным путем между штаммами и видами патогенных бактерий.

R-факторы инфекционны подобно *F*-факторам. Они были открыты в 50-х годах в период увлечения антибиотиками, повлекшими за собой появление бактерий, устойчивых сразу к нескольким ингибиторам.

Нехромосомные генетические детерминанты бактерий и эукариот объединяют в более широкую группу — *плазмиды*. Поскольку *F*-фактор и другие эписомы могут реплицироваться автономно, т. е. независимо от бактериальной хромосомы, их также называют плазмидами.

Перенос генов при конъюгации. Маркеры донора передаются реципиенту в определенной последовательности с убывающей вероятностью. Это указывало на *ориентированный перенос* генетического материала.

Ф. Жакоб и Е. Вольман в 1961 г. провели эксперименты по прерыванию конъюгации у *E. coli*. Они смешивали клетки *F*⁻ и *Hfr* при 37 °С в жидкой среде. Через равные интервалы времени они отбирали пробы и встряхивали их в гомогенизаторе при 4 °С, тем самым прерывая конъюгацию. Затем высевали на среду для учета рекомбинантов по различным маркерам. Первые 8 мин рекомбинантов вообще не было, а затем они стали появляться в характерные для каждого типа рекомбинантов временные интервалы (рис. 9.3). С тех пор этот метод получил широкое распространение, и расстояния на генетической карте *E. coli* измеряются в минутах.

Кольцевая структура генома. Оказалось, что различные штаммы *Hfr* переносят гены в клетки-реципиенты в неодинаковой последовательности. Сопоставление этих последовательностей показало, что все они согласуются с единой круговой генетической картой. Кольцевая структура генома *E. coli* была подтверждена в исследованиях Дж. Кэйрнса, получившего радиоавтографы ее реплицирующейся хромосомы (рис. 9.4). Единая кольцевая молекула генома *E. coli* содержит около 4000 тыс. п. н. Она может дополнительно включать *F*-фактор, имеющий кольцевую форму и состоящий из 60 тыс. п. н., а также другие плазмиды, профаги и иные необязательные элементы.

Интеграция может происходить в разных точках. Тем самым определяется начало и направление передачи генов у разных штаммов *Hfr* (рис. 9.5). Весь геном *E. coli* переносится при конъюгации при 37 °С за 100 мин, однако это осуществляется очень редко. Известно несколько штаммов *Hfr*, способных на это. Они называются также *vHfr* (от англ. very high frequency recombination — очень высокая частота рекомбинации). Только в результа-

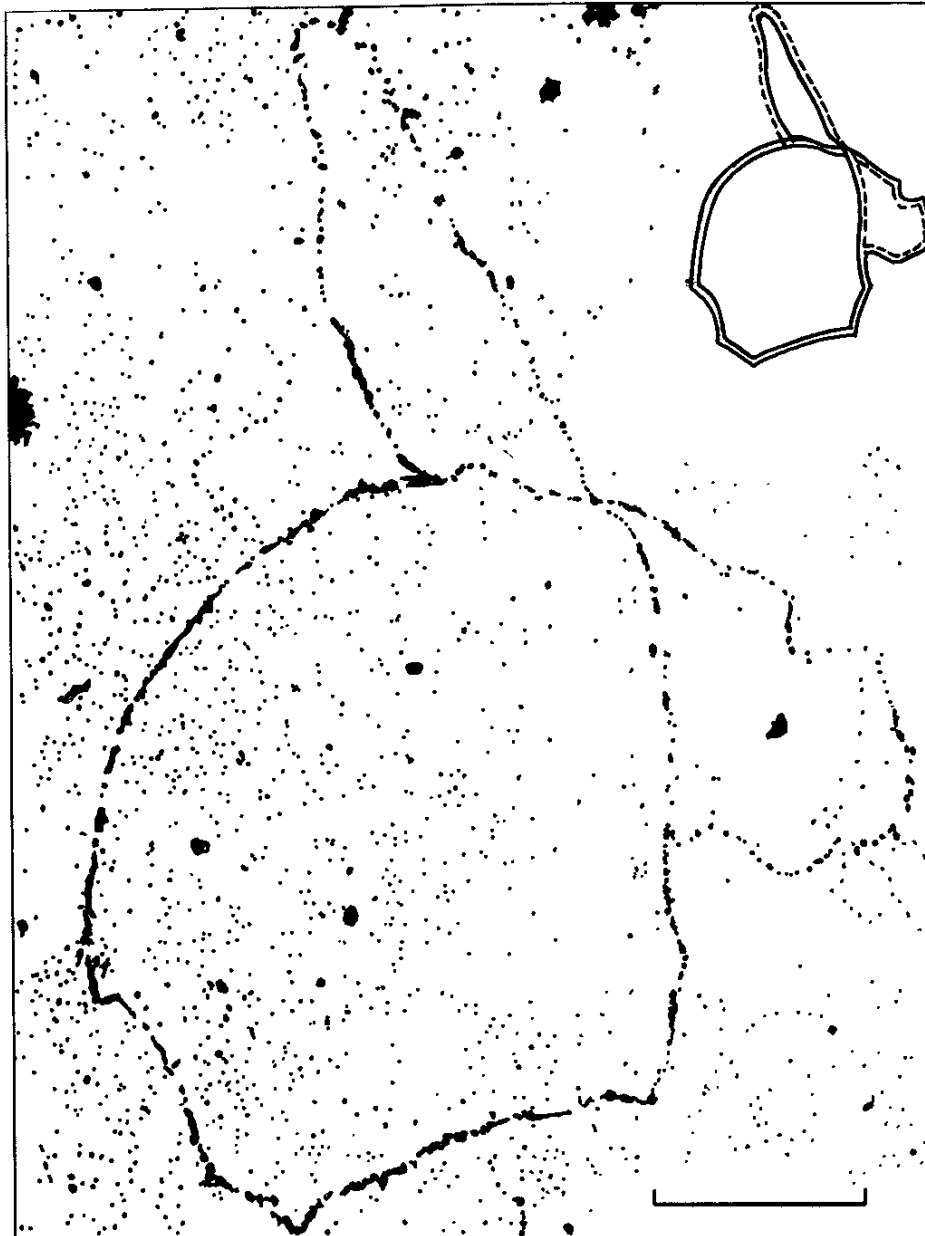


Рис. 9.4. Радиоавтографическое изображение реплицирующейся хромосомы *E. coli*, полученное Дж. Кэйрнсом (по Г. Стенту, 1974) Видны две вилки репликации, движущиеся в противоположных направлениях. Справа сверху — графическая реконструкция

те переноса всей хромосомы клетки-реципиенты приобретают свойства донора.

Репликация при конъюгации. Взаимоотношения *F*-эписомы и бактериальной хромосомы можно представить следующим образом. В клетках F^- отсутствует *F*-фактор. Клетки F^+ , в результате потери *F*-фактора становятся клетками F^- . Перенос *F*-фактора в клетки F^- превращает их в клетки F^+ . Возможна интеграция *F*-фактора с бактериальной хромосомой, и тогда при конъюгации она переносится в F^- -реципиенты. У штаммов *Hfr* *F*-фактор интегрирован с хромосомой. *F*-фактор — представитель более широкого класса *конъюгативных плазмид*, обнаруженных у разных бактерий, способных мобилизовать хромосому при конъюгации и передавать ее реципиентам.

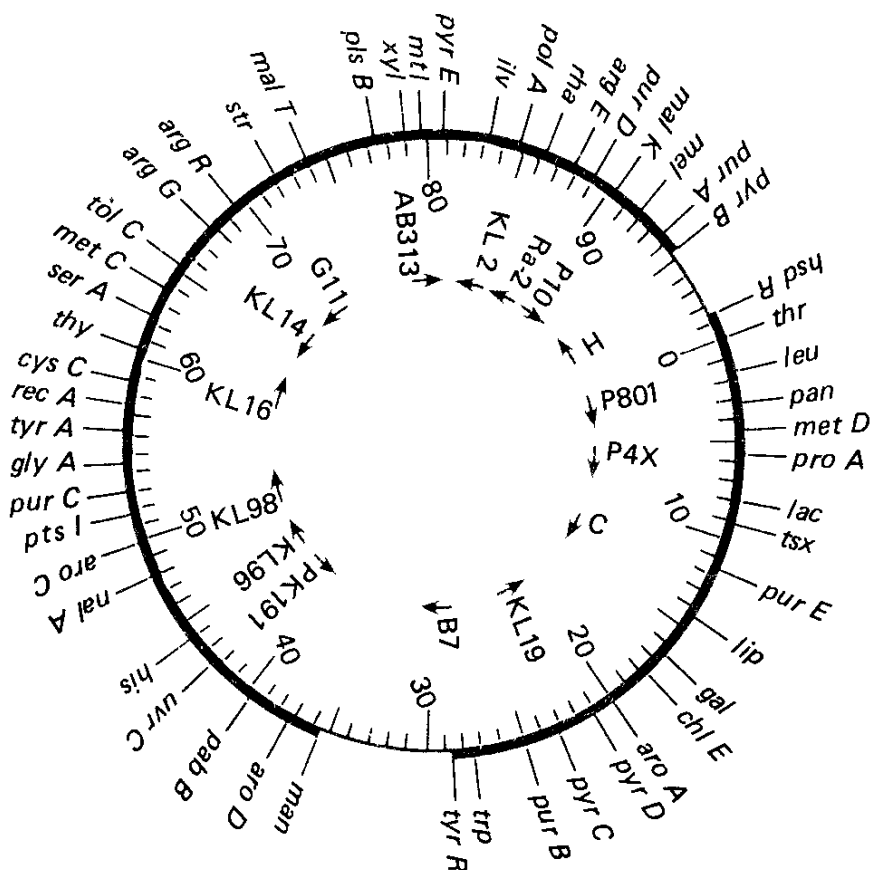


Рис. 9.5. Генетическая карта *E. coli* (Г. Стент и Р. Кэлиндар, 1981)

Стрелки на внутреннем кольце — точки интеграции F-фактора и направление переноса хромосомы

Присутствие *F*-фактора определяет образование на клетках *E. coli* половых ворсинок, или пилей, выполняющих активные функции при конъюгации. Они есть у F^+ и у *Hfr*, но не у клеток F^- . Именно на этих половых ворсинках адсорбируются бактериофаги, специфичные к мужским клеткам, или мужские бактериофаги. Это РНК-содержащие фаги: R17, MS2, Q β , f2, а также фаги с одноцепочечной ДНК: fd, fl, M13. Половые пили, по-видимому, необходимы для удержания конъюгирующих бактерий.

Обычно автономный *F*-фактор при размножении бактерий реплицируется, подобно бактериальной хромосоме (см. рис. 9.4), образуя θ -образные фигуры в качестве промежуточного продукта репликации. Установление конъюгационного контакта между клетками, возможно, служит сигналом для активации или синтеза ферментов, участвующих в переносе ДНК, в частности ферментов, разрывающих одну нить в ДНК *F*-фактора.

Однонитевой разрыв отмечается в точке, отличной от обычной точки инициации репликации *F*-фактора. Если скрещиваются F^+ и F^- , то освобождаемый в результате надреза 5'-конец цепи ДНК начинает «разматываться» и проникает в клетку F^- . Таким образом, в донор попадает одноцепочечная копия *F*-фактора, которая там реплицируется и превращается в двуцепочечную форму, замыкающуюся в кольцо. То, что в F^- -клетки передается только

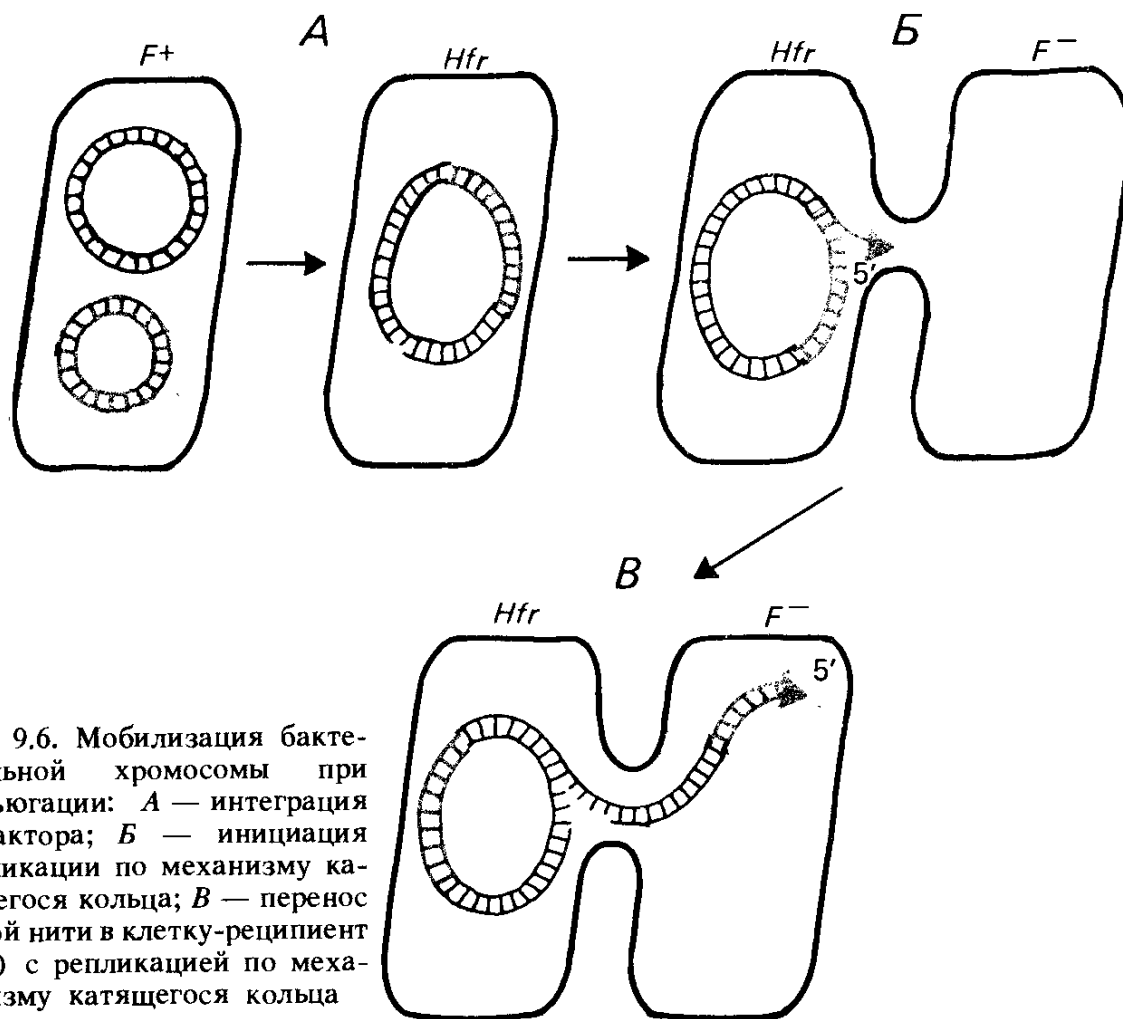


Рис. 9.6. Мобилизация бактериальной хромосомы при конъюгации: А — интеграция F -фактора; Б — инициация репликации по механизму катящегося кольца; В — перенос одной нити в клетку-реципиент (F^-) с репликацией по механизму катящегося кольца

одна цепь F -фактора, показано с помощью так называемых мини-клеток *E. coli*.

У этой бактерии есть F^- -штаммы, в значительном количестве образующие abortивные клетки размером около 10 % от нормальных и лишенные нуклеоида. Это и есть мини-клетки. Они не способны реплицировать ДНК. После конъюгации с клетками F^+ из мини-клеток были выделены одноцепочечные копии F -ДНК.

Если F -фактор интегрирован с хромосомой, то при конъюгации надрез F -фактора инициирует ее репликацию по механизму катящегося кольца и передачу однонитевой копии хромосомы в клетку-реципиент (рис. 9.6). Это также было продемонстрировано с помощью мини-клеток. Таким образом, при конъюгации часть F -фактора передается вместе с первыми маркерами, а часть — с самыми последними, что бывает очень редко из-за разрывов конъюгационного канала и переносимой ДНК.

F' -факторы и сексдукция. Вырезание (эксцизия) F -фактора из хромосомы Hfr -штамма иногда бывает неточным, и тогда участок бактериальной хромосомы замещает участок F -фактора. Образуется так называемый F' - (F -прим) фактор; он становится способным переносить бактериальные гены независимо от хромосомы, но вместе со свойствами донора. Это явление называется *сексдукцией*. Благодаря сексдукции можно получать у *E. coli* частичные диплоиды (меродиплоиды) по тем генам, которые включены в

F^+ -фактор. Таким образом, возможно исследование аллельных отношений и эффектов увеличения дозы гена у бактерий, что в какой-то мере компенсирует отсутствие у них регулярной диплоидной фазы.

Между гомологичными участками на F' -факторе и хромосоме возможна рекомбинация, которая будет приводить к образованию клеток *Hfr* с дубликацией бактериальных генов в случае одиночного кроссинговера или к реципрокному обмену генами между F' и бактериальной хромосомой в случае двойного кроссинговера.

9.2. Трансформация

Трансформация бактерий — это перенос ДНК, изолированной из одних клеток в другие.

О явлении трансформации было сказано в гл. 6. При трансформации ДНК, выделенную из клеток одного штамма, поглощают клетки другого штамма — реципиента. С помощью генетических маркеров об этом можно судить по изменению фенотипа реципиента.

Трансформация возможна у целого ряда бактерий: *Diplococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, а также у актиномицетов, цианобактерий и других и имеет общие закономерности. Лучше всего она изучена у таких бактерий, как *D. pneumoniae*, *B. subtilis*, *H. influenzae*. В процессе трансформации рассматривают следующие стадии.

Для того чтобы ДНК проникла в бактериальные клетки, они должны находиться в состоянии *компетентности*. Возникновению компетентности, приобретаемой лишь частью клеток культуры обычно в середине логарифмической стадии роста, способствует особый белок. В присутствии хлорамфеникола — ингибитора белкового синтеза — состояние компетентности не развивается. В то же время антибиотик, добавленный к компетентной культуре, компетентности не подавляет. Следовательно, белок, стимулирующий компетентность, вырабатывается в ходе роста культуры.

Сначала ДНК связывается с поверхностью компетентных клеток. Обычно трансформирующая ДНК имеет молекулярную массу около $1 \cdot 10^7$ Д, что составляет около 0,5 % бактериальной хромосомы. ДНК, связанная с компетентными клетками, расщепляется специальными нуклеазами до фрагментов с молекулярной массой $4—5 \cdot 10^6$ Д. После этого фрагменты ДНК проникают в клетку. Некоторые бактерии, в частности пневмококки, могут неспецифически поглощать ДНК из разных источников. В то же время, например *Neisseria*, поглощает только свою, гомологическую ДНК.

Фрагменты менее $5 \cdot 10^5$ Д в клетку не проникают.

После попадания в бактерию двуцепочечная ДНК превращается в одноцепочечную: одна нить ДНК деградирует. На заключительной стадии происходит интеграция одноцепочечного транс-

формирующего фрагмента с ДНК клетки-реципиента. При этом репликация не требуется, и включаемый фрагмент физически объединяется с ДНК реципиента. Весь процесс трансформации завершается в течение 10—30 мин. Частота трансформации разных бактерий составляет около 1 %.

Для некоторых бактерий показана трансформация в естественных условиях, например в организме инфицированного животного — для *Diplococcus pneumoniae*, а также в условиях культуры — для *Bacillus subtilis*. Это означает, что трансформация — не экзотический прием генетического анализа, а естественный биологический процесс.

В то же время в последние годы в связи с развитием генной инженерии широко применяется *плазмидная*, или *векторная*, трансформация, которая заключается во введении в клетки бактерий, а также эукариот генов, интегрированных в естественные или искусственные плазмиды (см. гл. 11).

9.3. Трансдукция

Трансдукцией называют перенос генов из одних бактериальных клеток в другие при помощи бактериофага.

Это явление в 1951 г. открыл Н. Зиндер — ученик Дж. Ледерберга. Прежде чем обратиться к трансдукции, необходимо рассмотреть взаимоотношения между бактериями и бактериофагами.

Вирулентные и умеренные бактериофаги. Бактериофаги, или вирусы бактерий, делят на две категории: *вирулентные* и *умеренные*. Вирулентный бактериофаг (или просто — фаг), проникая в клетку, вызывает *литическую реакцию*, т. е. размножается и лизирует бактерию. Умеренные бактериофаги могут вызывать как литическую, так и *лизогенную реакцию*. В последнем случае инфицирующий фаг переходит в состояние *профага*, который воспроизводится синхронно с хромосомой бактерии. Бактерии, несущие профаг, называют *лизогенными*. Лизогенные бактерии приобретают иммунитет, т. е. устойчивость к дополнительному заражению тем же бактериофагом, который их лизогенизировал.

Лизогенное состояние устойчиво воспроизводится. Профаг при этом теряется с частотой около 1 на 10^5 — 10^6 клеточных делений. В лизогенных культурах может происходить *индукция бактериофага*, в результате чего наблюдается массовый лизис бактерий. Такое явление происходит спонтанно и стимулируется целым рядом агентов, повреждающих ДНК: ультрафиолетовыми и рентгеновскими лучами, алкилирующими соединениями, азотистым ипритом, органическими перекисями и т. д. Следует подчеркнуть, что, заражая бактериальную клетку, умеренный фаг может вызвать как литическую, так и лизогенную реакцию. Вероятность того и другого варианта зависит от физиологического состояния культу-

ры. Кроме того, умеренные бактериофаги могут мутационным путем превращаться в вирулентные, что подчеркивает относительность классификации.

Общая, или неспецифическая, трансдукция. Трансдукцию осуществляют умеренные бактериофаги. К их числу относится и фаг P22, при помощи которого Н. Зиндер впервые обнаружил трансдукцию у *Salmonella typhimurium*.

Два штамма этой бактерии, нуждавшиеся в аминокислотах (один — *phe trp tyr*++, другой — +++ *met his*), высевали в смешанной культуре на минимальную среду. В результате появились прототрофные колонии с частотой около 1×10^{-4} . Как видно, логика эксперимента была та же, что и при поисках конъюгации у *E. coli* (см. с. 200). На сей раз, правда, иными оказались результаты выращивания двух названных штаммов *S. typhimurium* в разных отростках U-образной трубки, разделенных бактериальным фильтром. Рекомбинанты были получены и в этом случае. Следовательно, для их образования не нужен контакт между клетками, как при конъюгации.

Оказалось, что фильтрующийся агент, переносящий гены, — это умеренный бактериофаг P22, по которому был лизогенным один из штаммов, изученных Н. Зиндером и Дж. Ледербергом. Поскольку фаг P22 мог трансдуцировать любые гены сальмонеллы, это явление назвали *общей* или *неспецифической трансдукцией*. Как показал в 1955 г. Е. Леннокс, такой же способностью обладает и бактериофаг P1 *E. coli*. Этот фаг переносит очень небольшой фрагмент хромосомы *E. coli*. Например, совместная трансдукция генов *thr* и *leu* наблюдалась только в 1% случаев, т. е. одна фаговая частица из 100, трансдуцирующих ген *thr*, несла и ген *leu*, хотя на генетической карте *E. coli*, построенной при конъюгации, эти локусы тесно сцеплены и находятся на расстоянии около 2% общей длины генома.

Общая трансдукция оказалась следствием включения фрагментов ДНК *E. coli*, зараженной фагом P1, в инфекционные частицы бактериофага. Причем такие частицы вообще не содержат или содержат очень мало фаговой ДНК. Вследствие этого трансдуктанты, возникающие при множественности инфекции, равной 1 (одна частица на одну клетку), оказываются нелизогенными и не обладают иммунитетом к фагу P1. Дефектность трансдуцирующих частиц P1 подтверждает и то, что трансдукцию могут осуществлять даже вирулентные мутанты P1. Это показывает, что трансдуцирующие частицы действительно не способны инициировать нормальный цикл развития фага. Иначе клетки, зараженные вирулентным мутантом фага P1, должны были бы погибнуть.

Перенос генов при общей трансдукции может привести к двум различным состояниям трансдуктантов. В одних случаях привнесенный ген наследуется стабильно, поскольку интегрирует с хромосомой реципиента. Это *полная трансдукция*. В других случаях при *абортивной трансдукции* внесенный фагом фрагмент генома не реплицируется и передается по одной линии при размножении

трансдуктанта, т. е. из двух клеток — потомков каждого деления — лишь одна получает трансдуцированный ген. Так, в частности, можно трансдуцировать ген, определяющий наличие жгутика у *S. typhimurium*. В этом случае во всем клоне — потомстве трансдуктанта — жгутик, а следовательно, подвижность сохраняет только одна клетка.Abortивная трансдукция происходит чаще, чем полная, иногда в 10 раз.

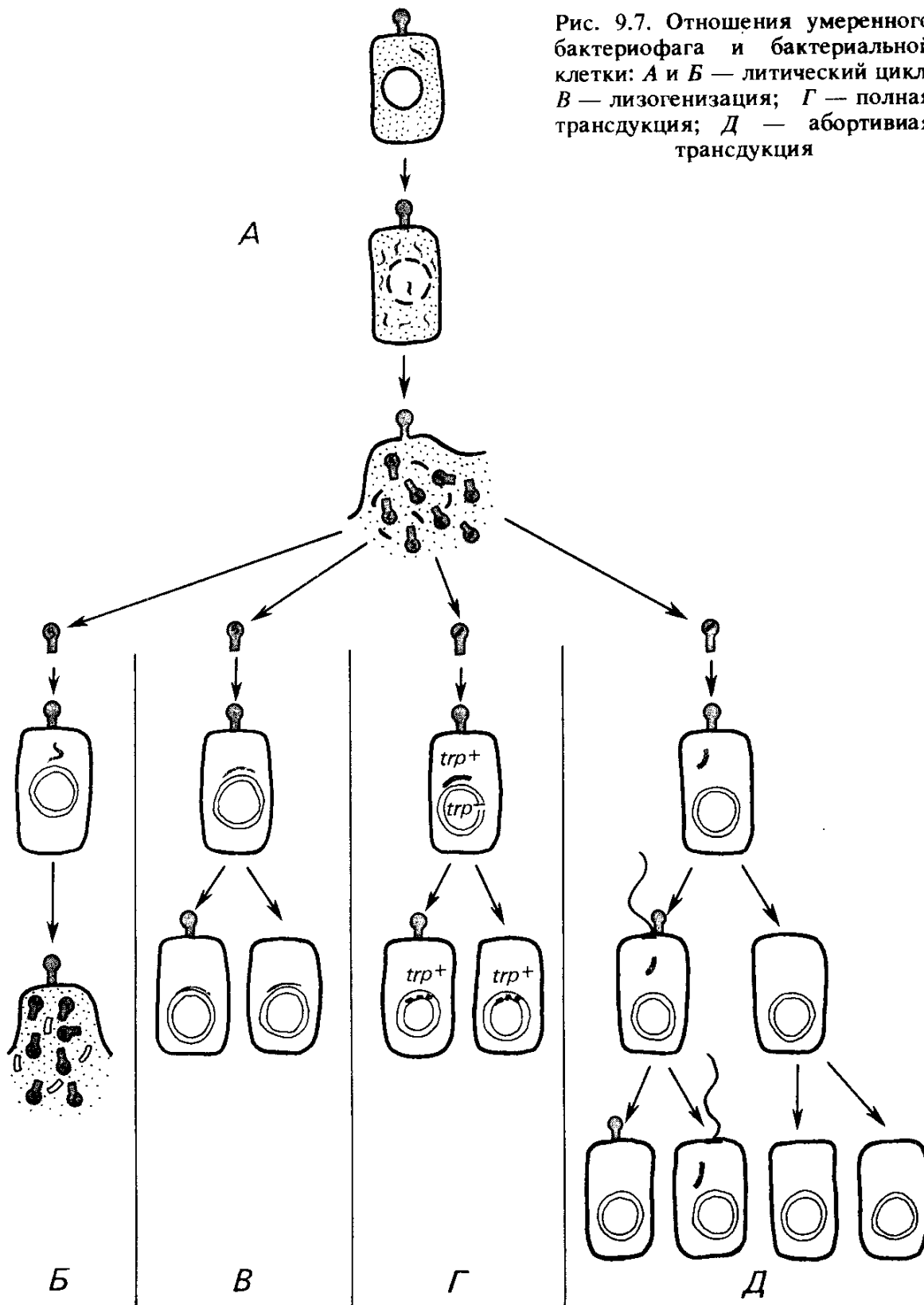


Рис. 9.7. Отношения умеренного бактериофага и бактериальной клетки: А и В — литический цикл; В — лизогенизация; Г — полная трансдукция; Д — abortивная трансдукция

Возможные варианты отношений между умеренным бактериофагом и клеткой при общей трансдукции показаны на рис. 9.7.

Специфическая трансдукция отличается от неспецифической тем, что бактериофаг может переносить только определенные гены, как это характерно для фага λ *E. coli*, который может трансдуцировать только гены локуса *gal*, ответственного за усвоение галактозы, и *bio* — гены синтеза биотина. Явление специфической трансдукции открыли в 1956 г. М. Морзе и супруги Э. и Дж. Ледерберг.

Умеренный бактериофаг λ при лизогенизации *E. coli* интегрирует в ее хромосому на участке между локусами *gal* и *bio*. Это было показано в конъюгационных скрещиваниях лизогенных *Hfr* и нелизогенных F^- -бактерий. Gal^+ -трансдуктанты возникают обычно с частотой $1 \times 10^{-5} - 10^{-6}$ и, как правило, генетически нестабильны. Они выщепляют клетки Gal^- с частотой около 2×10^{-3} на клеточное деление. Это явление объясняется тем, что трансдуктанты Gal^+ частично гетерозиготны *gal/gal⁺*, т. е. несут дополнительный фрагмент *gal⁺* вместе с участком *gal* реципиента. Такое состояние называется *гетерогенотой*.

При облучении гетерогенот ультрафиолетовым светом удалось получить фаголизаты, способные к трансдукции с очень высокой частотой.

Почти половина всех частиц λ могла передавать признак Gal^+ при трансдукции. Изучение фагов из таких лизатов, названных *HFT* (от англ. high frequency transduction), показало, что гены *gal* переносят так называемые дефектные фаги λ , т. е. такие, которые, лизогенизируя бактерии, сообщают им устойчивость к суперинфекции λ , но в дальнейшем лизогенные бактерии не способны продуцировать инфекционные частицы бактериофага. Дефектные трансдуцирующие частицы λ , обозначаемые λgal , не образуют стерильных пятен на газоне *E. coli*. Они не могут самостоятельно размножаться. Для этого им требуется фаг-помощник: нормальный, не способный к трансдукции.

У дефектных фагов λgal от $1/4$ до $1/3$ собственного генома замещены на *gal* — участок бактериальной хромосомы. Общая схема лизогенизации *E. coli* бактериофагом λ и образования трансдуцирующих частиц представлена на рис. 9.8.

Сайт-специфическая рекомбинация. Геном фага λ проникает в бактериальную клетку в линейной форме, однако на концах линейной молекулы ДНК есть так называемые липкие концы — односторонние участки по 12 нуклеотидов, комплементарные друг другу. В клетке ДНК λ замыкается в кольцо. В таком виде она интегрируется в геном бактерии. Принцип этой интеграции предло-

¹ В обозначении генотипа и фенотипа микроорганизмов приняты трехбуквенные сокращения. При изображении генотипа рецессивные аллели — строчные, а доминантные — прописные буквы или строчные со знаком «+». При изображении фенотипа первая буква прописная, остальные две — строчные; при этом знак «+» или «—» означает наличие или отсутствие изучаемого свойства. Так, символ Gal^- показывает, что клетки бактерии не способны утилизировать галактозу.

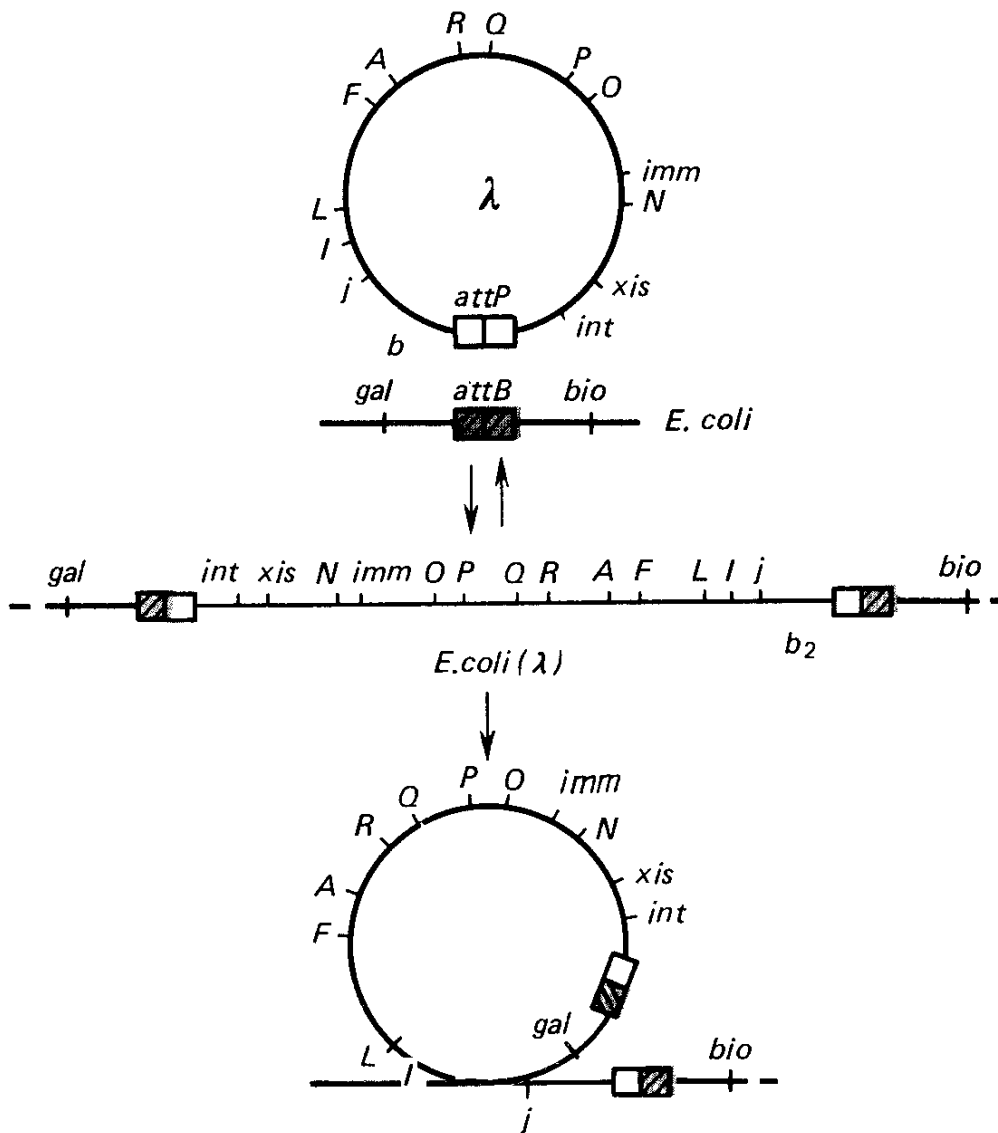


Рис. 9.8. Схема интеграции и эксцизии генома бактериофага λ за счет сайт-специфической рекомбинации с хромосомой *E. coli* и образование трансдуцирующих частиц

жен А. Кэмпбеллом в 1962 г.: кольцо генома λ реципрокно рекомбинирует с кольцом бактериальной хромосомы. Один обмен приводит к интеграции ДНК фага λ с ДНК бактериальной хромосомы.

В дальнейшем оказалось, что интеграция профага может происходить только в одном месте на хромосоме *E. coli*, названном *att* λ (attachment site λ). Аналогичный участок есть в геноме бактериофага. При этом рекомбинация происходит в отсутствие протяженной гомологии. Общим у фага и бактерии оказался участок всего в 15 п. н.:

...GCTTTTТТАСТАА...

(показана только одна цепь ДНК)

Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы осуществляется по тому же механизму реципрокной, сайт-специфической рекомбинации (рис. 9.8). Как интеграцию, так и эксцизию профага λ контролируют два фаговых гена: *int* и *xis*.

Сайт-специфическая рекомбинация происходит точно, но не безошибочно. Приблизительно один раз на 1 млн. при эксцизии профага рекомбинация осуществляется не в *att*-сайте, а захватывает участки *gal* или *bio*. Так возникают трансдуцирующие частицы, у которых часть генетического материала профага замещена генами бактерии (рис. 9.8). Во всех этих случаях в рекомбинацию вовлекаются те же последовательности из 15 пар нуклеотидов, которые встречаются в генах *gal* и *bio*. За пределами этих 15 п. н. гомология отсутствует. Очевидно, что механизм сайт-специфической рекомбинации резко отличается от механизма кроссинговера, рассмотренного в гл. 7. Сайт-специфическую рекомбинацию проводит фермент *интеграза*, кодируемый локусом *int* фага λ .

9.4. Генетический анализ у бактерий

Генетический анализ у бактерий основан на использовании процессов, ведущих к рекомбинации: конъюгации, трансформации, трансдукции, а также на переносе генетического материала с помощью плазмид — *F*-факторов, факторов устойчивости и др.

При конъюгации в клетку-реципиент переносится обычно меньше половины бактериального генома, и очень редко весь геном. При трансдукции размеры переносимого фрагмента определяются емкостью оболочки бактериофага, но они не превышают 1/100 длины хромосомы *E. coli*, т. е. составляют участки до $3,2 \times 10^4$ п. н. При трансформации фрагменты, включаемые в геном бактерий, имеют сопоставимую длину: от 1,5 до 20×10^3 п. н. Таким образом, «зигота» бактерий всегда является частичной зиготой или *мерозиготой*.

Конкретные задачи генетического анализа диктуют выбор того или иного метода введения генетического материала в клетки-реципиенты. Так, прерываемая конъюгация позволяет установить последовательность генов на хромосоме. Однако этот метод неудобен при картировании маркеров, разделяемых 1—2 мин карты. В этих случаях необходимо картирование по трем точкам, которое проводят как на основе конъюгации, так и на основе трансдукции или трансформации. Для интеграции линейного фрагмента, внесенного в клетку, требуется двойной кроссинговер с кольцевой хромосомой.

При конъюгационном картировании предварительные данные о грубой локализации исследуемого гена с помощью прерываемой конъюгации позволяют выбрать селективный маркер, по которому отбирают рекомбинантов. Такой маркер должен находиться за пределами исследуемого участка — дистально по отношению к точке начала переноса бактериальной хромосомы. При этом исследуемый ген или гены вводятся с фрагментом хромосомы *Hfr*. Клетки *F⁻* должны также иметь селективный маркер (например, устойчивость к стрептомицину), для того чтобы отбирать клетки-реципиенты, в которых и происходит рекомбинация.

Предположим, что при скрещивании *Hfr ABC* \times *F⁻abc* селек-

тивным маркером служит ген *A* и при этом неселектируемый ген *B* обнаружен у 95 % рекомбинантов, а ген *C* — у 60 %. Это указывает, что частота рекомбинации между *A* и *B* составляет 5 %, а между *A* и *C* — 40 %. Так же можно установить частоту совместного наследования *B* и *C* среди рекомбинантов по гену *A* — 35 %. Таким образом, порядок расположения генов *A—B—C* и расстояния между ними аддитивны.

Сравнение физической карты *E. coli*, построенной в опытах по прерыванию конъюгации, и рекомбинационной карты показывает, что 1 мин соответствует 20 единицам рекомбинации. Поскольку вся хромосома передается за 100 мин, ее общая рекомбинационная длина составляет 2000 единиц, а с учетом общего количества ДНК в хромосоме ($4 \cdot 10^6$ п. н.) единица рекомбинации соответствует ок. 2 тыс. п. н. Расчеты показывают, что рекомбинационное картирование разумно применять на расстояниях не более 3 мин, поскольку на больших расстояниях маркеры будут наследоваться независимо. При использовании конъюгационного метода трудно ставить реципрокные скрещивания. В связи с этим картирование на коротких участках обычно проводят с использованием трансдукции при помощи умеренного фага P1.

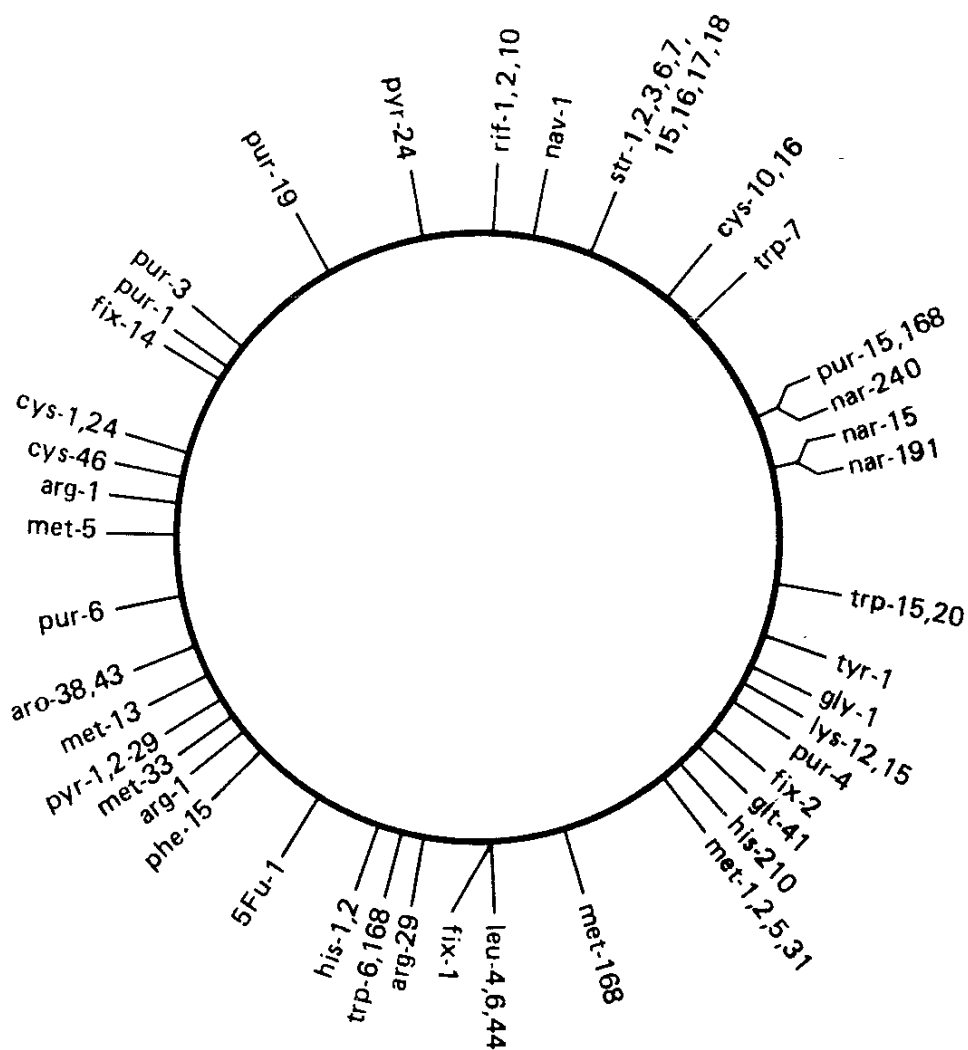


Рис. 9.9. Генетическая карта *Rhizobium leguminosarum* (по J. Beringer et al., 1978)

Об относительном расположении маркеров при трансдукции судят по частоте совместного включения маркеров в частицу бактериофага (*котрансдукции*) при селекции трансдуктантов по одному из них. Аналогичные данные можно получить при трансформации.

Трансформацию и трансдукцию, а также учет частот рекомбинации при конъюгации обычно применяют для картирования на коротких участках бактериальной хромосомы. Общее расположение генов на хромосоме обычно определяют в опытах по прерываемой конъюгации.

На основе этих принципов построены карты бактерий кишечной группы — *E. coli* и *S. typhimurium*. Бактерия *E. coli* в генетическом отношении наиболее изученный объект. На ее хромосоме картировано около 1000 генов, что составляет 30—40 % генома. На карте сальмонеллы локализовано более 420 генов. Особенность этих карт (см., например, рис. 9.5) — тесное сцепление между генами, контролирующими близкие функции: синтез триптофана, биотина, гистидина, усвоение галактозы, арабинозы и др. Эти пучки, или кластеры, генов отражают существенный момент генетической организации бактерий и связаны со способом регуляции действия гена (см. гл. 16).

Для многих бактерий не все три перечисленных подхода к генетическому анализу применимы, поскольку не у всех известна, например, конъюгация. Тем не менее уже построены генетические карты *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Shigella*. В связи с повышенным интересом к азотфиксирующим бактериям начаты генетические исследования *Azotobacter*, *Clostridium*, цианобактерий. Построены первые генетические карты симбиотических с растениями азотфиксирующих бактерий *Rhizobium* (рис. 9.9).

9.5. Генетика бактериофагов

Бактериофаги, или вирусы бактерий, весьма разнообразны. Лучше всего изучены мелкие мужские бактериофаги *E. coli*. Они представляют собой фаги, содержащие РНК: R17, f2, MS2, Q β . Их геном включает всего 4—5 генов и упакован в белковую оболочку в форме многогранника. Такую же форму имеют частицы бактериофагов ϕ X 174, генетическим материалом которых служит однонитевая ДНК размером в 5375 нуклеотидов. Эти вирусы имеют всего 10 генов. Другие однонитевые (ДНК) фаги — f1, fd, M13 — имеют нитевидную форму. Крупные бактериофаги — λ , T2, T4 — содержат двунитевую ДНК, на которой располагается около 100 генов. Молекула ДНК фага λ состоит из около 49 тыс. п. н., а ДНК так называемых Т-четных фагов (T2, T4) состоит из 182 тыс. п. н. Они имеют многогранную головку и хвостовой отросток, на конце которого находится аппарат адсорбции и впрыскивания ДНК в бактериальную клетку (рис. 9.10).

Специфическая особенность бактериофагов, как и вирусов, — та, что вне клетки они представляют собой инертные образования.



Рис. 9.10. Электронная микрофотография фагов Т4, адсорбированных на поверхности *E. coli* (L. D. Simon, T. F. Anderson, 1967)

Их специфическая активность проявляется только при инфицировании клеток. Поэтому генетика бактериофагов связана с генетическими особенностями бактерий-хозяев. Признаки бактериофагов, доступные генетическому анализу, — это прежде всего скорость и полнота лизиса инфицированных клеток и круг бактерий-хозяев, поражаемых фагами. Широкое распространение в генетическом анализе бактериофагов получили мутанты с условным проявлением. Это мутанты, чувствительные к повышению и понижению температуры, — так называемые термочувствительные (*ts*) и холодочувствительные (*cs*). Они нормально размножаются и лизируют клетки только при перmissive температуре (37°C).

В качестве условных используют также мутанты, чувствительные к действию определенных супрессоров, находящихся в геноме бактерий. Это класс так называемых *sus* (от англ. suppressor sensitive) мутантов. *Sus*-мутанты можно получить практически по любому гену, кодирующему белок. (О природе супрессоров с широким спектром действия, используемых в этих исследованиях, подробнее изложено в гл. 15.)

Генетический анализ бактериофагов основан на совместном заражении клетки генетически различающимися частицами бактериофага. Полные фаговые геномы, проникая в клетку, экспрессируют заложенную в них информацию подобно гомологичным хромосомам, и таким образом становится возможным исследование взаимодействия аллелей и неаллельных генов. Если два темпе-

ратурочувствительных мутанта, проникших в бактериальную клетку, несут изменения, способные взаимодействовать комплементарно (см. гл. 3), то в непермиссивных условиях клетки лизируются. В ходе репликации геномов возможна рекомбинация, в результате

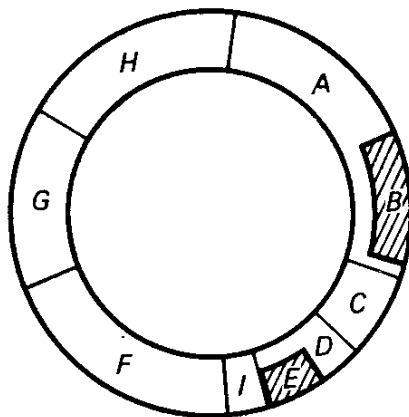


Рис. 9.11. Генетическая карта бактериофага φX 174 (из F. Ayala, J. Kiger, 1980). Обратите внимание на то, что ген E находится в пределах гена D, а ген B — в пределах гена A

чего появятся рекомбинанты дикого типа. Их можно учесть, высевая фаговое потомство на чувствительные бактерии в условиях непермиссивных для родительских бактериофагов.

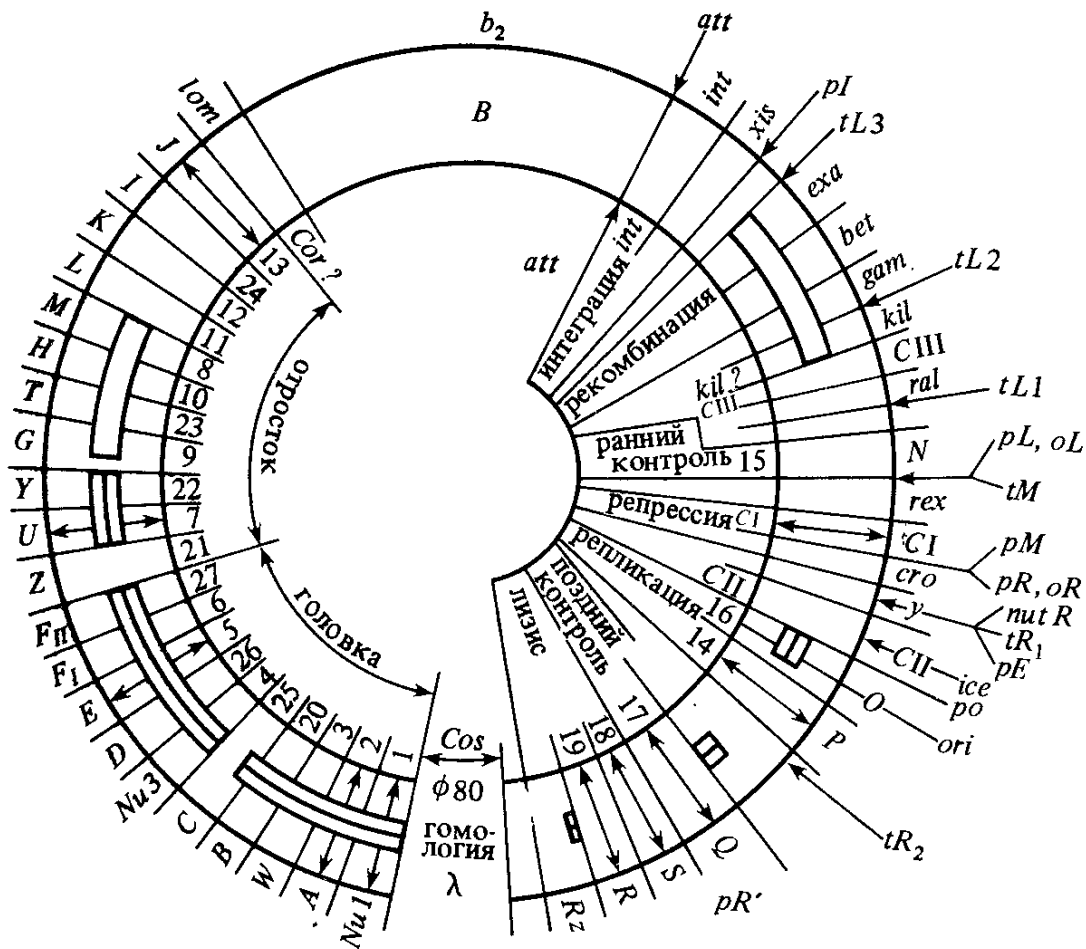


Рис. 9.12. Генетическая карта бактериофагов λ (снаружи) и φ 80 (внутри) (по В. Н. Рыбчину, 1982)

Генетический анализ бактериофагов сопряжен с рядом трудностей, определяемых особенностями их развития в клетке. Репликация геномов Т-четных фагов идет экспоненциально со временем генерации 2—3 мин. Вплоть до образования количества фаговой ДНК, эквивалентного 50 полным геномам, зрелые частицы фага в клетке не обнаруживаются. Затем из общего фонда синтезируемой ДНК фаговые геномы начинают расходоваться на образование зрелых частиц. При лизисе клетки в ней остается еще столько же ДНК, сколько включилось в головки фагов.

В процессе репликации фаговые геномы претерпевают неоднократные циклы спаривания, рекомбинации и репликации. В результате наблюдаемая частота рекомбинации всегда выше ожидаемой. В подобных многократных циклах репликации фаговых геномов генетические события должны быть проанализированы с позиций популяционной генетики (см. гл. 18). Такой подход разработали Н. Висконти и М. Дельбрюк. При этом они исходили из следующих основных положений: 1) в общем фонде ДНК родительские геномы фагов полностью перемешаны; 2) каждый геном фага аналогичен целой хромосоме; 3) при репликации происходят неоднократные спаривания и рекомбинации.

В соответствии с этими допущениями получается, что геномы Т-четных бактериофагов проходят около 5 циклов спаривания и рекомбинации. Однако вызывает сомнение универсальность и надежность исходных допущений. Так, множественность инфекции одной клетки (соотношение родительских частиц) может колебаться до 10 раз. Лизис индивидуальных зараженных клеток обнаруживает неравенство реципрокных классов рекомбинантов.

Тем не менее все эти трудности преодолимы, если жестко контролировать соотношение вводимых в клетку геномов фага и время репликации и рекомбинации. При этом можно применять стандартную логику анализа рекомбинации в двух- и трехмаркерных скрещиваниях.

На основе этого подхода построены генетические карты бактериофагов ϕ X174, ϕ 80, λ , которые представляют собой кольцо, соответствующее кольцевой структуре генома этих бактериофагов (рис. 9.11 и 9.12).

Благодаря знанию генетики двух близких умеренных бактериофагов λ и ϕ 80 (рис. 9.12) удалось получить их гибриды, совмещающие свойства как λ , так и ϕ 80. Так, ϕ 80 в отличие от λ интегрирует с хромосомой *E. coli* вблизи гена *trp* (синтез триптофана). Получены гибриды, интегрирующие как в сайте *att* λ — между *gal* и *bio*, так и в сайте *att* ϕ 80 — около *trp*.

При сопоставлении генетической карты ϕ X174 и его полной нуклеотидной последовательности согласно принципам, которые будут изложены позднее (см. гл. 15 и гл. 19), удалось установить, что два гена этого бактериофага (*B* и *E*) полностью перекрываются с двумя другими генами (*A* и *D*).

Кольцевая карта рекомбинации построена и для Т-четного фага Т4 (рис. 9.13), у которого геном в действительности представ-



Рис. 9.13. Генетическая карта бактериофага Т4 (по W. Wood and, H. Revel, 1976)

лен линейной молекулой ДНК. Этот парадокс объясняется тем, что геномы Т4, упакованные в частицы фага, имеют так называемую *концевую избыточность*, что допускает *кольцевые перестановки*, или *кольцевые пермутации генов*. Дело в том, что в головке Т4 заключено ДНК примерно на 1 % больше, чем соответствует одному геному фага. Дополнительные, концевые, участки фаговой ДНК и составляют физическую основу концевой избыточности. При заражении клетки между молекулами такой ДНК происходят рекомбинации с объединением нескольких геномов в *конкатемеры*. Длинные молекулы ДНК, состоящие из нескольких геномов, далее реплицируются и рекомбинируют вновь. При созревании бактериофага Т4 работает принцип «наполнения головки». При этом нарезаются молекулы ДНК, в которых наблюдаются концевая избыточность и кольцевые пермутации генов (рис. 9.14).

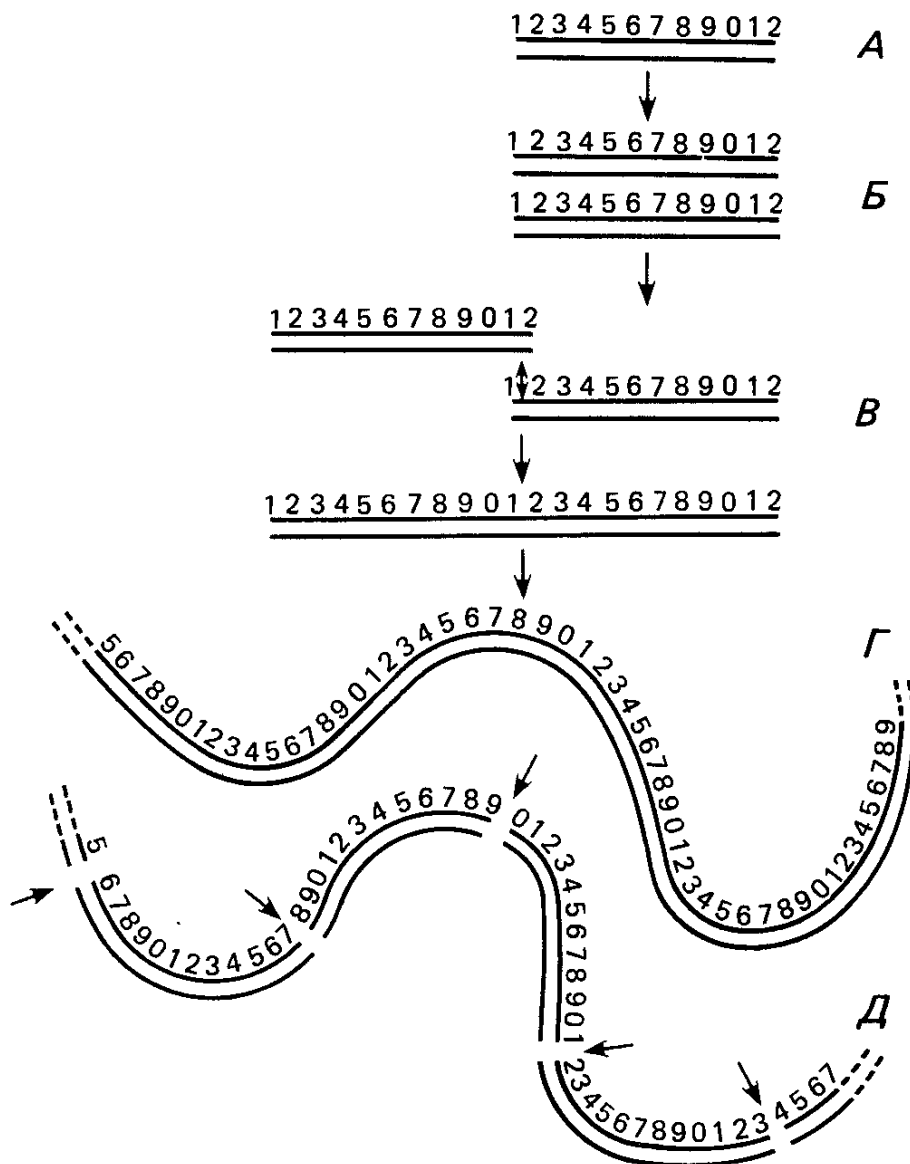


Рис. 9.14. Конкатемеры — промежуточные продукты синтеза ДНК фага Т4, которые, созревая, дают концевую избыточность и кольцевые перестановки генов.

А — инфицирующий геном; Б — репликация; В — рекомбинация; Г — дальнейшая репликация и рекомбинация с образованием конкатемеров; Д — упаковка ДНК, сопровождающаяся нарезанием геномов с концевой избыточностью и кольцевыми перестановками генов

9.6. Рестрикции и модификации ДНК бактериофагов

В молекулах ДНК, полученных из разных источников, встречаются модифицированные основания, например, 5-метилцитозин, 6-метиламинопурин и др. Они не включаются в ДНК при репликации как таковые, а появляются в результате ферментативной *модификации* синтезируемых молекул, начиная со стадии фрагментов Оказакки. При этом модифицируются основания, занимающие определенное положение в молекуле. Эти реакции осуществляют ферменты, представляющие собой часть единой *системы рестрик-*

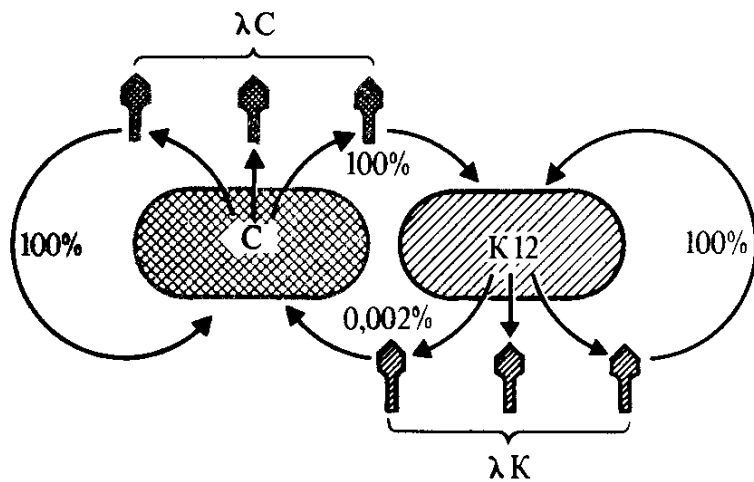


Рис. 9.15. Рестрикция и модификация бактериофага λ , контролируемая клеткой-хозяином (по Г. Стенту, 1974)

ции — модификации. Модификация определенных оснований предохраняет ДНК от разрушения рестриктирующими эндонуклеазами, которые имеют средство к тем же последовательностям нуклеотидов, что и ферменты модификации.

Рестрикция — модификация фагов была открыта в начале 50-х годов С. Луриа, Г. Бертани и Дж. Уэйглом при изуче-

нии способности бактериофага λ размножаться на различных штаммах *E. coli*. Это явление затем было подробно исследовано В. Арбером (рис. 9.15). Если заразить штамм *E. coli* К12 выращенным на штамме *E. coli* С бактериофагом λ (назовем его λ С), то в этом случае фаг размножается с низкой эффективностью, составляющей 0,002 % от эффективности размножения на *E. coli* С. В то же время бактериофаг λ из штамма *E. coli* К12 (назовем его λ К) одинаково хорошо размножается на обоих штаммах. Редкие потомки λ С, развившиеся на *E. coli* К12, также способны высокоэффективно размножаться на *E. coli* К12 и С. Разная эффективность размножения на *E. coli* К12 была единственным отличием фагов λ К и λ С. По всем другим характеристикам они были идентичны. Редкие частицы λ С, развившиеся на *E. coli* К12, не были мутантами. В противном случае, снова пройдя цикл размножения на штамме *E. coli* С, они не должны были утратить способности эффективно размножаться на *E. coli* К12 (рис. 9.15). Кроме того, было отмечено, что частота появления редких частиц бактериофага из клеток *E. coli* К12 при заражении их λ С варьирует в зависимости от физиологического состояния культуры.

Эти факты указывали на то, что сами клетки *E. coli* К12 ограничивают размножение λ С, и в то же время модифицируют частицы λ С таким образом, что они становятся способными эффективно размножаться на *E. coli* К12.

В дальнейшем выяснилось, что один и тот же штамм может осуществлять несколько типов рестрикции и модификации. Из клеток, способных к рестрикции, были выделены эндонуклеазы, специфичные к определенным нуклеотидным последовательностям неадекватно модифицированной ДНК. Эти ферменты широко применяются в работах по генной инженерии (см. гл. 11).

Ферменты модификации защищают ДНК хозяина от действия *эндонуклеаз рестрикции*. При этом одна и та же молекула может

претерпевать разные типы модификации ДНК. Так, можно заразить мутант штамма *E. coli* В, потерявший способность к рестрикции, но сохранивший способность к модификации, фагом λ К, несущим утяжеляющую метку. Методом центрифугирования в градиенте плотности в лизатах таких клеток можно обнаружить частицы бактериофага, несущие одну из родительских цепей ДНК и совмещающие типы модификации, характерные для штамма К и для штамма В.

Существенную роль в модификации ДНК играет метионин. Если индуцировать лизогенный по фагу λ и ауксотрофный по метионину штамм *E. coli* на среде без метионина и добавить эту аминокислоту лишь в конце латентного периода, то ДНК значительной части фагов оказывается немодифицированной. Выяснилось, что в ходе модификации донором метильных групп служит S-аденозилметионин.

При изучении очищенных эндонуклеаз рестрикции, или рестриктаз, *E. coli* К и бактериофага Р1 выяснилось, что они переносят метильные группы с S-аденозилметионина на немодифицированную ДНК, после чего она становится устойчивой к рестрикции. Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях, функции рестрикции и модификации совмещены в одном ферменте.

Структура многих сайтов рестрикции — модификации в настоящее время расшифрована. Эти сайты представлены короткими

Таблица 9.2. Последовательности ДНК, узнаваемые некоторыми рестриктирующими эндонуклеазами (по F. Ayala, J. Kiger., 1980)

Источник	Фермент	Узнаваемая последовательность ¹	
<i>E. coli</i> KY 13	EcoRI	5' GAA* CTT	T TC 3' A*AG
<i>H. influenzae</i> Rd	Hind II	5' GT Py CA*Pu	PuA*C 3' PyT G
	Hind III	5' A*AG T TC	CTT 3' GAA*
<i>H. parainfluenzae</i>	Hpa I	5' GTT CAA	AAC 3' TTG
	Hpa II	5' CC* GG	G G 3' C*C
<i>H. aegyptius</i>	Hae III	5' GG CC	CC 3' GG

* Основания, модифицируемые метилированием. Маленькими стрелками показаны разрезы, наносимые эндонуклеазой. Длинная вертикальная стрелка — ось симметрии. Pu — пурин, Py — пиримидин.

нуклеотидными последовательностями, характерная черта которых — их симметричность (см. табл. 9.2). Система рестрикции — модификации — это своеобразный барьер, охраняющий клетку от включения в ее генетический материал чужеродных молекул ДНК. Возникновение мутантов, лишенных способности к рестрикции, открывает дополнительные возможности для изменчивости за счет ассимиляции клеткой чужеродной генетической информации. Кроме того, некоторые рестриктазы (например, Eco R I) могут осуществлять сайт-специфическую рекомбинацию плазмид в клетках *E. coli*.

Успехи генетического анализа у микроорганизмов, особенно у бактерий и бактериофагов, сыграли революционизирующую роль в методах изучения структуры и функций генетического материала. Организация геномов бактерий и пути, ведущие к их рекомбинации, оказались, на первый взгляд, совершенно отличными от того, к чему привыкли генетики, работавшие с эукариотами. У бактерий были открыты дополнительные (к хромосоме) генетические элементы: плазмиды и эписомы. Некоторые эписомы существуют в свободной форме. Это бактериофаги, вся структура которых приспособлена к переносу генома между клетками. Другие плазмиды способны только к репликации в бактериальной клетке. Между этими крайними формами есть промежуточные варианты. Само существование таких дополнительных элементов генома поставило вопрос о возможности их использования для переноса генетического материала и не только между клетками бактерий.

Применение методологии генетики бактерий к изучению эукариот (клонирование клеток, применение трансформации, использование рестриктирующих эндонуклеаз и т. д.) стало основой нового синтетического направления в биологии — генетической инженерии, о которой подробнее сказано в гл. 11.

Вопросы к главе 9

1. Почему при конъюгации бактерий требуется разное время для образования рекомбинантов по разным маркерам?
2. Частота котрансформации по устойчивости к стрептомицину и пенициллину приблизительно равна произведению частот трансформации по каждому из этих маркеров. Частота котрансформации по устойчивости к стрептомицину и по способности сбрасывать маннит превосходит в 17 раз произведение частот трансформации по каждому из этих маркеров. Как объяснить эти факты?
3. Какие типы трансдукции вам известны?
4. Может ли клетка F^- превратиться в клетку F^+ ? Hfr ?
Каким образом?
5. Почему генетическая карта *E. coli* имеет кольцевую форму?
6. Почему генетическая карта бактериофага T4 имеет кольцевую форму?
7. Что такое мерозигота? Что такое гетерогенота?
8. Можно ли исследовать комплементарное взаимодействие генов у бактерий?
Если да, то каким образом?
9. Возможна ли трансдукция при помощи литического бактериофага?
10. Чем и почему генетические карты различных штаммов Hfr *E. coli* отличаются друг от друга?
11. Что такое эндонуклеазы рестрикции?
12. В чем сходны и чем отличаются явления трансформации и трансдукции?

Нехромосомное наследование

Со времени переоткрытия законов Менделя генетика неоднократно сталкивалась с их «нарушениями»: появлением различных результатов в реципрокных скрещиваниях, расщеплениями в первом гибридном поколении, нарушением свободного комбинирования генов (см. гл. 5).

Даже правило чистоты гамет, которое У. Бэтсон сформулировал как основу представлений о генетической дискретности, оказалось неабсолютным (см. гл. 7). Тем не менее анализ всех этих исключений служил развитию основной тенденции — развитию ядерной, а затем хромосомной теории наследственности. Многочисленные эксперименты, доказывавшие исключительную роль ядра и хромосом в наследственности, начиная с Т. Бовери (см. гл. 1), казалось, не оставляли места для иных детерминант наследственных признаков. Тем не менее представления о генах вне хромосом в конце концов получили фактическое обоснование и развились в самостоятельный раздел генетики, исследующий нехромосомное наследование и так называемое цитоплазматическое наследование.

10.1. Генетика хлоропластов

Любители комнатного цветоводства хорошо знают декоративные *пестролистные* формы аукубы, герани, плюща, хлорофитума, традесканции и других растений. У них зеленые листья испещрены белыми или желтыми пятнами, полосами — участками тканей, не содержащих пластид или имеющих дефектные пластиды, лишенные хлорофилла (рис. 10.1). Такие же формы встречаются в природе и у культурных растений: львиного зева, ночной красавицы, примулы, кукурузы и др.

Наследование пестролистности в начале столетия изучали К. Корренс (1908) у ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*) и Э. Баур (1909) у герани (*Pelargonium zonale*). Наиболее характерный пример — наследование пестролистности у ночной красавицы. Пестролистные формы этого растения образуют целые побеги, лишенные хлорофилла.

Если в качестве материнской формы взять цветки бесхлорофильного побега и опылить их пыльцой зеленого растения, то в F_1 появятся только бесхлорофильные формы, которые вскоре погибают, так как не способны к фотосинтезу. При реципрокном скрещивании в F_1 все растения оказываются нормальными — зелеными. При опылении цветков пестролистного побега пыльцой зе-



Рис. 10.1. Пестролистные и зеленые формы комнатных растений: хлорофитума (А), традесканции (Б), плюща (В)



Рис. 10.1. Продолжение



Рис. 10.1. Продолжение

ленной формы в F_1 образуются бесхлорофилльные, пестролистные и зеленые растения. При реципрокном скрещивании — только зеленые. Это пример так называемого *материнского типа наследования*. Для него характерно контрастное различие между результатами реципрокных скрещиваний.

Сходные различия в реципрокных комбинациях наблюдаются при скрещивании зеленых и пестролистных форм и у других растений, например у кипрея (*Epilobium*). В последнем случае если материнская форма зеленая, а отцовская пестролистная, то в F_1 подавляющее большинство гибридов зеленые, но изредка (с частотой около 1 на 1000) встречаются и пестролистные формы.

Бывают и иные различия при реципрокных скрещиваниях, например, у герани: если цветки пестролистного растения опыляются пыльцой зеленого, то до 30 % гибридов будут пестролистными, а 70 % — зелеными. При реципрокном скрещивании 70 % гибридов оказываются пестролистными, а 30 % — зелеными. Это пример *наследования по отцовскому типу*.

Как известно (см. гл. 8), реципрокные скрещивания у растений различаются количеством цитоплазмы, привносимым в зиготу яйцеклеткой и спермием. При этом пластиды передаются только от материнской формы, как в случае ночной красавицы, или изредка от отцовской формы, как у кипрея, могут передаваться от обоих родителей или, наконец, преимущественно от отцовской формы, как у герани. Этим и объясняются различия результатов при реципрокных скрещиваниях.

Пластиды — самовоспроизводящиеся органеллы клетки. В отличие от хромосом ядра при распределении между дочерними клетками они не подчиняются строгим законам митоза и мейоза. Аппарат, управляющий распределением пластид, в настоящее время неизвестен и считается, что они попадают в дочерние клетки случайно при делении цитоплазмы, благодаря тому, что содержатся в клетке во множестве экземпляров (до нескольких сотен).

Если в цитоплазме, как это показано для пестролистных растений, имеются нормальные хлоропласты, содержащие хлорофилл, и дефектные — лишенные хлорофилла, то при митозе в некоторые клетки могут попасть только нормальные, а в некоторые — только дефектные пластиды. Большая часть клеток получает оба типа пластид. Этим и объясняются появление окрашенных и неокрашенных участков ткани у пестролистных растений и сложные картины расщеплений, наблюдаемые порой при реципрокных скрещиваниях.

В хлоропластах высших растений и водорослей обнаружена ДНК. Из клеток фотосинтезирующего простейшего *Euglena gracilis* выделена кольцевая молекула хлоропластной ДНК, которая, судя по ее длине, имеет молекулярную массу $8,3 \times 10^7$ Д (около 126 тыс. п. н.). Плотность этой ДНК, равная $1,685 \text{ г/см}^3$, отличается от плотности ядерной ДНК ($1,707 \text{ г/см}^3$), благодаря чему ее можно идентифицировать в качестве отдельного пика при равновесном центрифугировании в градиенте плотности. Этот пик отсут-

ствуется у мутанта эвглени, потерявшего хлоропласт. Сравнительная характеристика плотности ядерной и хлоропластной ДНК разных организмов представлена в табл. 10.1.

Таблица 10.1. ДНК хлоропластов водорослей и высших растений (по Р. Сэджер, 1975)

Организм	Плотность ДНК, г/см ³	
	ядро	хлоропласт
<i>Chlamydomonas</i>	1,724	1,695
<i>Chlorella</i>	1,716—1,724	1,692—1,695
<i>Euglena</i>	1,707	1,685
<i>Porphyra tenera</i>	1,720	1,696
<i>Nicotiana tabacum</i>	1,690—1,698	1,697—1,698
<i>Spinacia oleracea</i>	1,694—1,695	1,696
<i>Brassica rapa</i>	1,692	1,695
<i>Allium cepa</i>	1,689—1,691	1,696
<i>Triticum aestivum</i>	1,702	1,698
<i>Lathyrus odoratus</i>	1,695	1,697
<i>Lactuca sativa</i>	1,694	1,697

Примечание. Цифры через тире указывают на крайние значения, полученные разными авторами.

Обнаружение ДНК в хлоропластах стимулировало их изучение как полуавтономной самовоспроизводящейся системы. В пластидах обнаружен самостоятельный аппарат белкового синтеза, во многом отличающийся от цитоплазматического, характерного для эукариот, и сходный с аппаратом белкового синтеза прокариот (см. гл. 15).

Основные сведения о строгих закономерностях пластидной наследственности получены в экспериментах с зеленой одноклеточной водорослью *Chlamydomonas*. Жизненный цикл хламидомонады рассмотрен в гл. 8 (см. рис. 8.14). У этой водоросли в клетке находится один хлоропласт, где обнаружены два фельген-положительных тельца. Наличие двух молекул ДНК в хлоропласте (диплоидность хлоропласта) подтверждают данные генетического анализа *Chlamydomonas reinhardtii*. В ее пластидной ДНК, или *пластоме*, локализованы гены, перечисленные ниже.

Мутантные гены *Chlamydomonas reinhardtii*, локализованные в хлоропластной группе сцепления (по Р. Сэджер, 1975)

Ген	Фенотип мутанта
<i>tm</i>	Не растет при 35 °С
<i>ac1</i>	Нуждается в ацетате
<i>ac2</i>	То же
<i>sm4</i>	Нуждается в стрептомицине
<i>sm3</i>	Устойчив к стрептомицину (500 мкг/мл)
<i>sm2</i>	То же к стрептомицину (50 мкг/мл)
<i>nea</i>	—»— к неамицину (1 мкг/мл)

<i>ery</i>	Устойчив к эритромицину (5 мкг/мл)
<i>car</i>	—»— к карбомицину (50 мкг/мл)
<i>spi</i>	—»— к спирамицину (100 мкг/мл)
<i>cle</i>	—»— к клеоцину (50 мкг/мл)
<i>ole</i>	—»— к олеандомицину (50 мкг/мл)
<i>spc</i>	—»— к спектиномицину (50 мкг/мл)
<i>csd</i>	Условная потребность в стрептомицине

Мутации этих генов имеют следующие фенотипические проявления:

1) неспособность к фотосинтезу; для роста на свету и в темноте необходим источник восстановления углерода — ацетат; 2) чувствительность к повышенной или пониженной температуре; 3) устойчивость к антибиотикам или потребность в них.

Все эти мутации обычно наследуются только по материнской линии, т. е. от родителя mt^+ . Это связано со сложным биогенезом хлоропласта зигот, в результате которого сохраняется только ДНК хлоропласта, полученная от родителя mt^+ . Такое правило имеет исключение, на котором строится весь рекомбинационный анализ хлоропластной группы сцепления: иногда спонтанно (не чаще чем 1% случаев) зигота получает оба пластома (*хлоропластных генома*) — от mt^+ и mt^- . Тогда все четыре (или восемь) зооспоры, образующиеся при созревании зиготы (см. гл. 8), оказываются гетерозиготными по генам хлоропласта. Такие гетерозиготы называют *цитогетами* — цитоплазматическими гетерозиготами. Частоту появления цитогет можно повысить до 50%, облучая женские гаметы (mt^+) ультрафиолетовым светом непосредственно перед копуляцией.

При образовании цитогет все хлоропластные маркеры, вводимые в скрещивание, наследуются не по материнской линии, а от обоих родителей, т. е. mt^+ и mt^- . В отличие от ядерных генов, обнаруживающих мейотическое расщепление в тетрадах (октадах) 2:2 (4:4), хлоропластные гены у цитогет расщепляются не в мейозе, а при каждом митотическом делении зооспор, пока не выйдут в гомозиготу. Расщепление происходит в результате обменов на стадии четырех нитей, т. е. в момент, когда молекулы хлоропластной ДНК уже удвоены, но еще не разошлись в дочерние клетки. При этом наблюдаются реципрокная рекомбинация, как при митотическом кроссинговере на участке ген — центромера, и конверсия (см. гл. 8). Роль центромеры при этом играет точка прикрепления хлоропластной ДНК к мембране, управляющая расхождением нитей ДНК при делении пластиды.

Картирование генов у цитогет ведется тремя способами: 1) по частоте реципрокных обменов на участке ген — точка прикрепления (она рассматривается как центромера); 2) по частоте реципрокных обменов на участках между генами и 3) по частоте коконверсии генов (см. гл. 7). Карта, построенная таким образом, имеет кольцевую форму (рис. 10. 2).

Генетический анализ цитогет у хламидомонады основан не только на повышении частоты исключительных зигот при облуче-

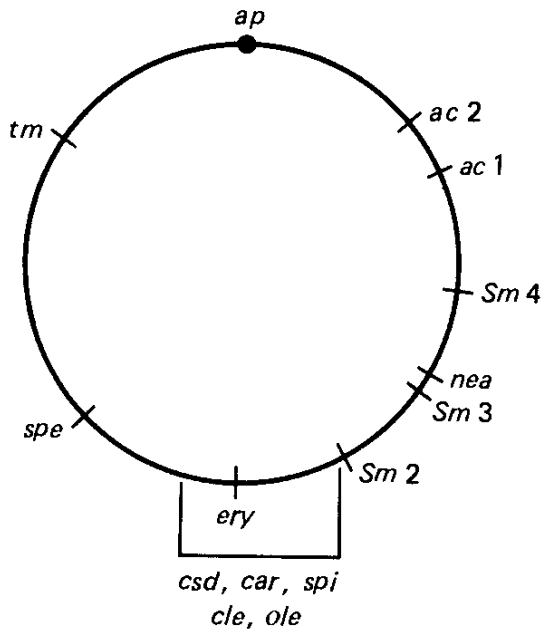


Рис. 10.2. Кольцевая группа сцепления хлоропласта *Chlamydomonas reinhardtii*: *ap* — точка прикрепления хлоропластной ДНК к мембране, играющая роль центромеры. Обозначения генов см. в табл. 10.2. Квадратная скобка объединяет гены, последовательность которых не установлена

ляются в мейозе, а гаплоидные зооспоры далее расщепляются в митозе по маркерам цитогеты (рис. 10.3).

нии ультрафиолетовым светом родителя mt^+ , но и на селекции исключительных зигот, дающих начало цитогетам. Для этого используют доминантный хлоропластный маркер родителя mt^+ . Например, mt^+ -стрептомицинзависимый — *sd* (рецессив), а mt^- - стрептомицинчувствительный — *SS* (доминант). Зиготы помещают на среду без стрептомицина, на которой не могут прорасти регулярные зиготы, наследующие признак хлоропласта по материнской линии — от mt^+ . На этой среде прорастают только исключительные зиготы, поскольку цитогеты не нуждаются в стрептомицине.

Такие исключительные зиготы, если они были гетерозиготны по ядерным генам, расщеп-

10.2. Цитоплазматическая мужская стерильность у растений

У многих растений, диких и культурных, встречаются формы, не образующие пыльцы или образующие пыльцу, не способную к оплодотворению. Это явление называется *мужской стерильностью*. Оно может определяться одним рецессивным геном в хромосоме. Известны формы мужской стерильности, наследуемые по материнскому типу и получившие название *цитоплазматической мужской стерильности* (ЦМС). Материнское наследование стерильности пыльцы впервые было обнаружено в 30-х годах у кукурузы М. Родсом в США и М. И. Ханджиновым в СССР.

При опылении кукурузы с мужской стерильностью пыльцой нормальных растений получалось потомство со стерильной пыльцой. При повторных возвратных скрещиваниях с растениями, имеющими нормальную пыльцу, вновь возникало потомство с мужской стерильностью, даже если все хромосомы материнской линии замещали на хромосомы отцовской, нормальной линии (рис. 10.4). Таким образом, наследование по материнскому типу и непричастность к этому процессу хромосом позволили локализовать в цитоплазме детерминант, определяющий мужскую стерильность у кукурузы.

Благодаря тому, что у кукурузы в основной массе стерильной

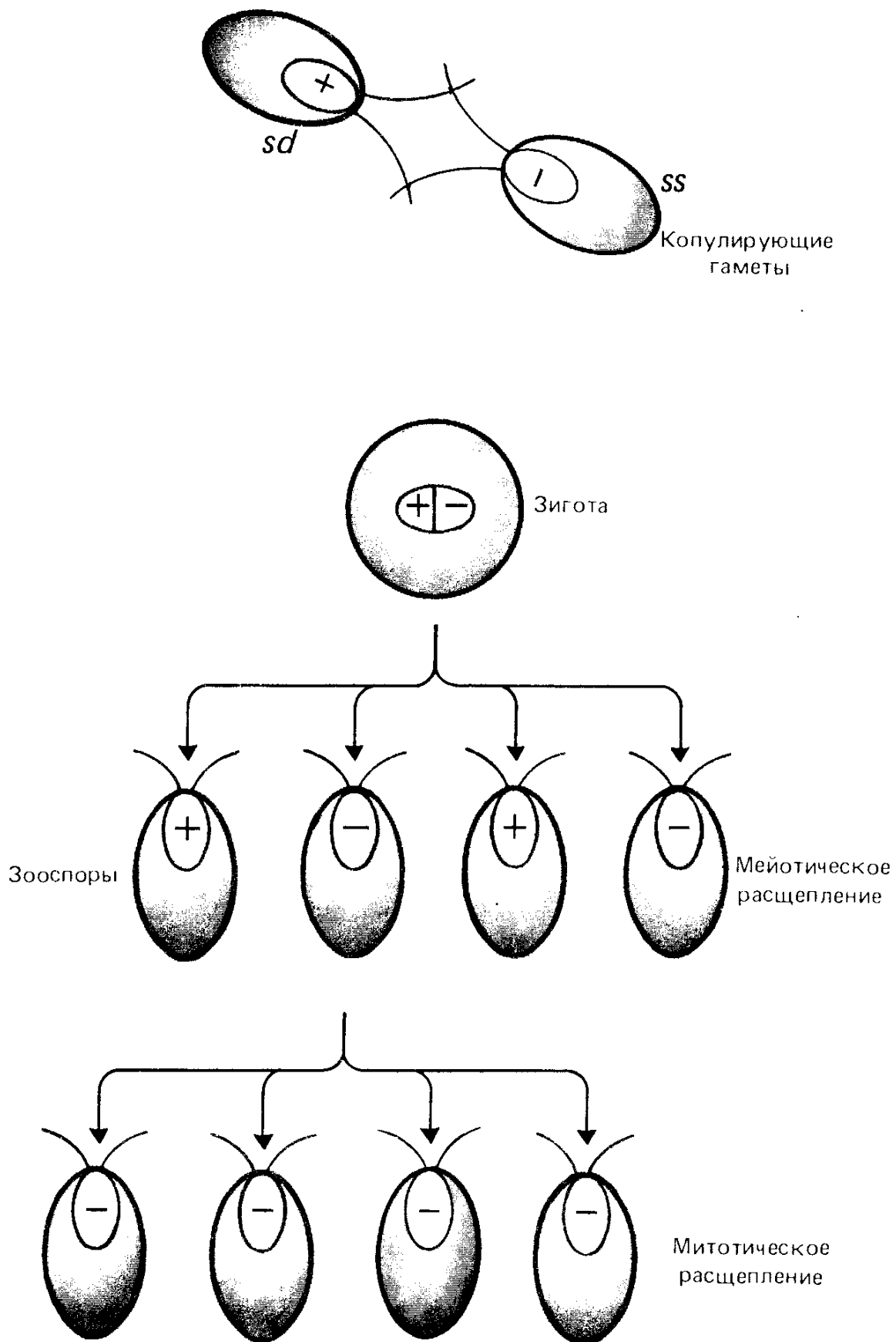


Рис. 10.3. Расщепление в потомстве исключительной зиготы, дающей цитогеты «+» и «-» — типы спаривания, SS — чувствительность к стрептомицину, sd — зависимость от стрептомицина (по Р. Сэджер, 1975):

«+» и «-» — типы спаривания, SS — чувствительность к стрептомицину, sd — зависимость от стрептомицина

пыльцы встречаются редкие пыльцевые зерна, способные к нормальному опылению, оказалось возможным реципрокное скрещивание. В первом же гибридном поколении были получены полностью фертильные растения (рис. 10.4), что вполне согласуется с выводом, сделанным ранее.

У кукурузы известно несколько типов цитоплазматической мужской стерильности, например *техасский* (Т), при котором полностью стерильные пыльники не выступают наружу, и *молдавский* тип, или *USDA* (S), при котором часть или все пыльники выступают наружу. Эти два типа стерильности различаются также по характеру взаимодействия с генами — *восстановителями фертильности*. В частности, фертильность у растений с цитоплазмой *техасского* типа восстанавливают два гена в хромосоме II и ряд генов в хромосомах III, IV, VII и X.

Если обозначить цитоплазматический фактор стерильности как Cyt^S и нормальную цитоплазму как Cyt^N , а доминантную ядерную аллель — *восстановитель фертильности* как *Rf* (рецессив — *rf*), то признак цитоплазматической мужской стерильности разовьется только у растений $rfrfCyt^S$, в то время как $RfRfCyt^S$, $RfrfCyt^S$, $RfRfCyt^N$, $RfrfCyt^N$, $rfrfCyt^N$ будут фертильными.

Это явление — восстановление фертильности пыльцы — широко используется на практике для получения *гетерозисных двойных межлинейных гибридов* кукурузы (рис. 10.5). Для этого рядом высевают по две линии кукурузы со стерильной и фертильной пыльцой. Это обеспечивает только перекрестное опыление, что очень существенно, поскольку кукуруза самосовместима при опылении (см. гл. 8). Линии по генам *Rf* подбирают таким образом, что при одном скрещивании гибриды имеют стерильную, а при другом — фертильную пыльцу. При высеве этих гибридов на следующий год таким же образом получают двойные гибриды. При этом в половине случаев опыление дает фертильные по пыльце растения, как и следует при анализирующем скрещивании (рис. 10.5).

Этот прием экономически очень выгодный, поскольку позволяет избежать кастрации — обламывания метелок у кукурузы, что требует большой затраты труда. Широкое распространение *техасского* типа стерильности имело и негативные последствия, поскольку растения с такой цитоплазмой оказались восприимчивыми к грибковым заболеваниям — *гельминтоспориозу* листьев, возбудителем которого является *Helminthosporium maydis*, уничтоживший в 1970 г. более половины урожая кукурузы в южных районах США. Токсин, выделяемый этим плесневым грибом, разрушает внутренние мембраны митохондрий у линий кукурузы с *техасским* типом мужской стерильности. Это заставило искать другие типы ЦМС у кукурузы, чтобы использовать их в селекции вместо *техасского* типа.

Связь чувствительности к *гельминтоспориозу* с митохондриями, по-видимому, оказалась, не случайной. Митохондрии, как и хлоропласты, имеют собственную ДНК. В митохондриях Cyt^S отсутству-

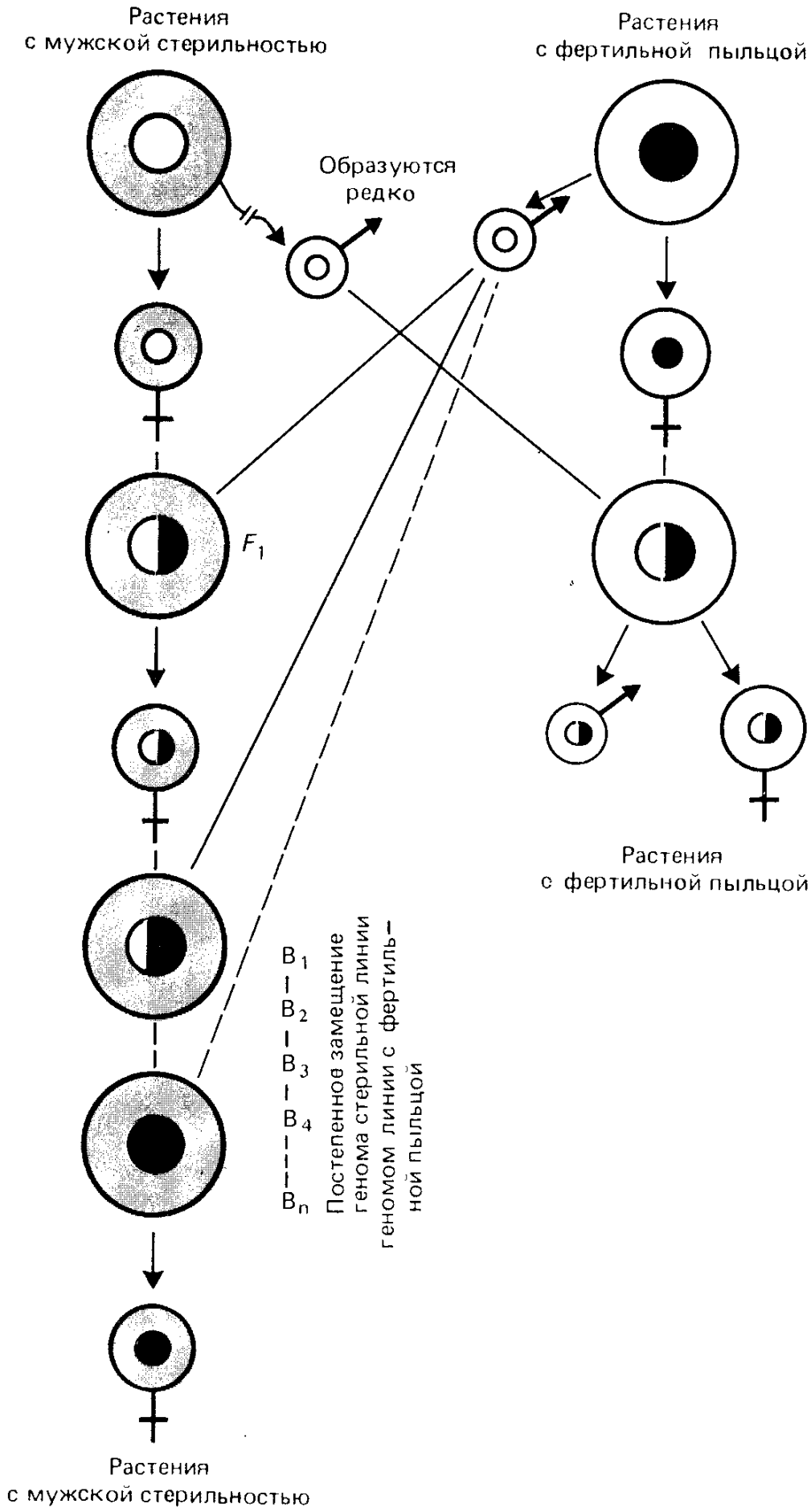


Рис. 10.4. Наследование мужской стерильности у кукурузы по материнской линии (из Джинкса, 1966)

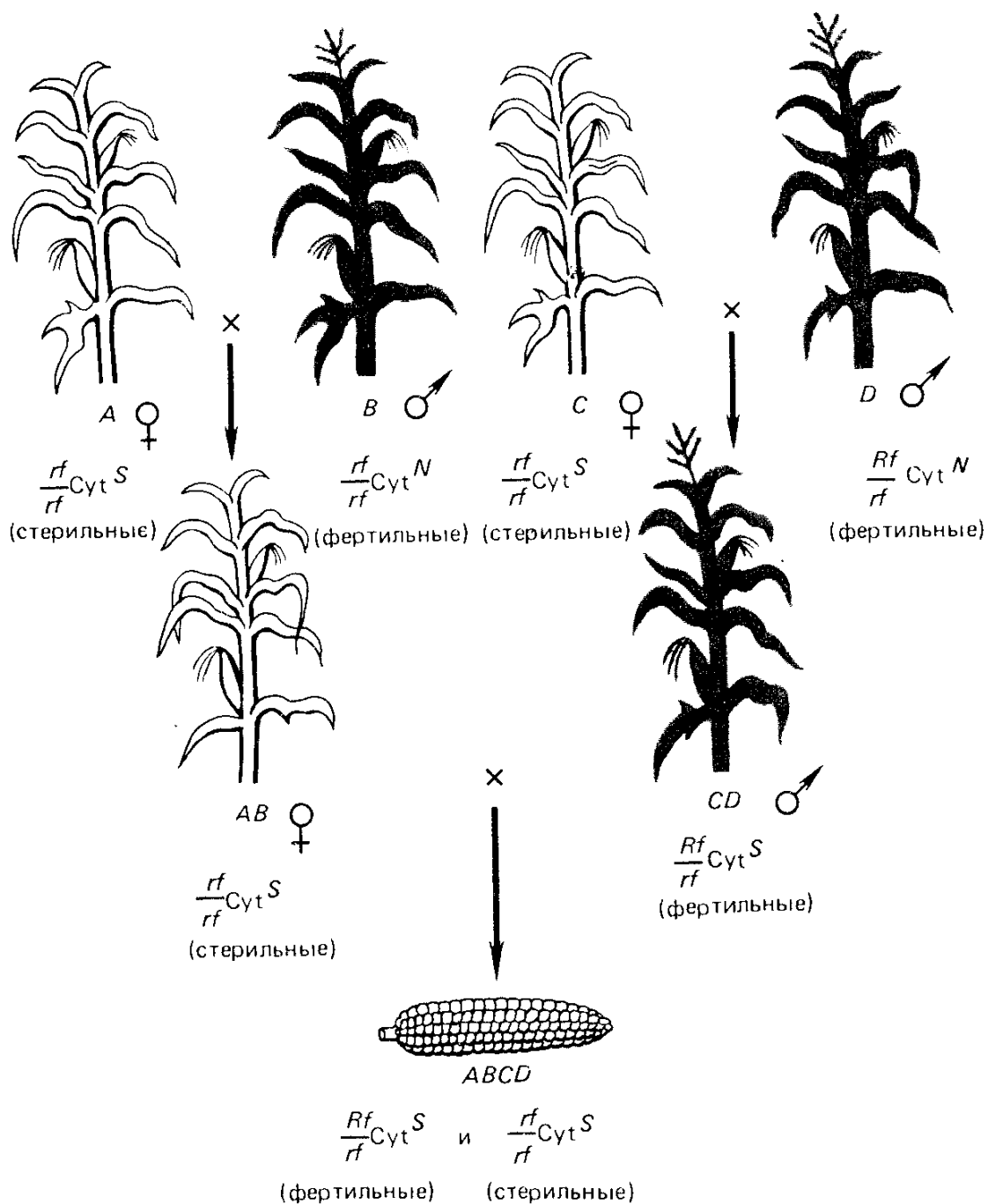


Рис. 10.5. Получение двойных гибридов у кукурузы (из Р. Сэджер, 1975)

ет участок длиной около 10 000 п. н., присутствующий в митохондриях Cyt^N . Этот фрагмент обнаруживает гомологию с ДНК хлоропласта.

10.3. Генетика митохондрий

Митохондрии обеспечивают дыхание клеток растений, животных и эукариотических микроорганизмов. Подобно хлоропластам, это самовоспроизводящиеся полуавтономные органеллы клетки, содержащие кольцевые молекулы ДНК (рис. 10.6) с различной контурной длиной. ДНК митохондрий по нуклеотидному составу и вследствие этого по плотности отличается от ДНК ядра (табл. 10.3). Митохондрии имеют собственный аппарат белкового синте-

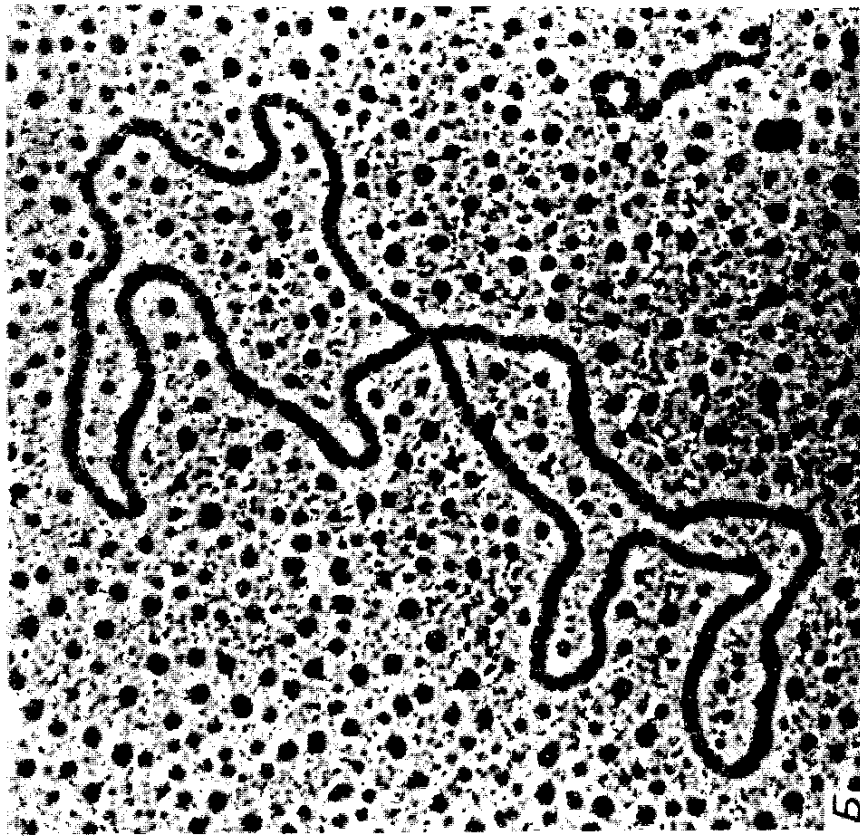
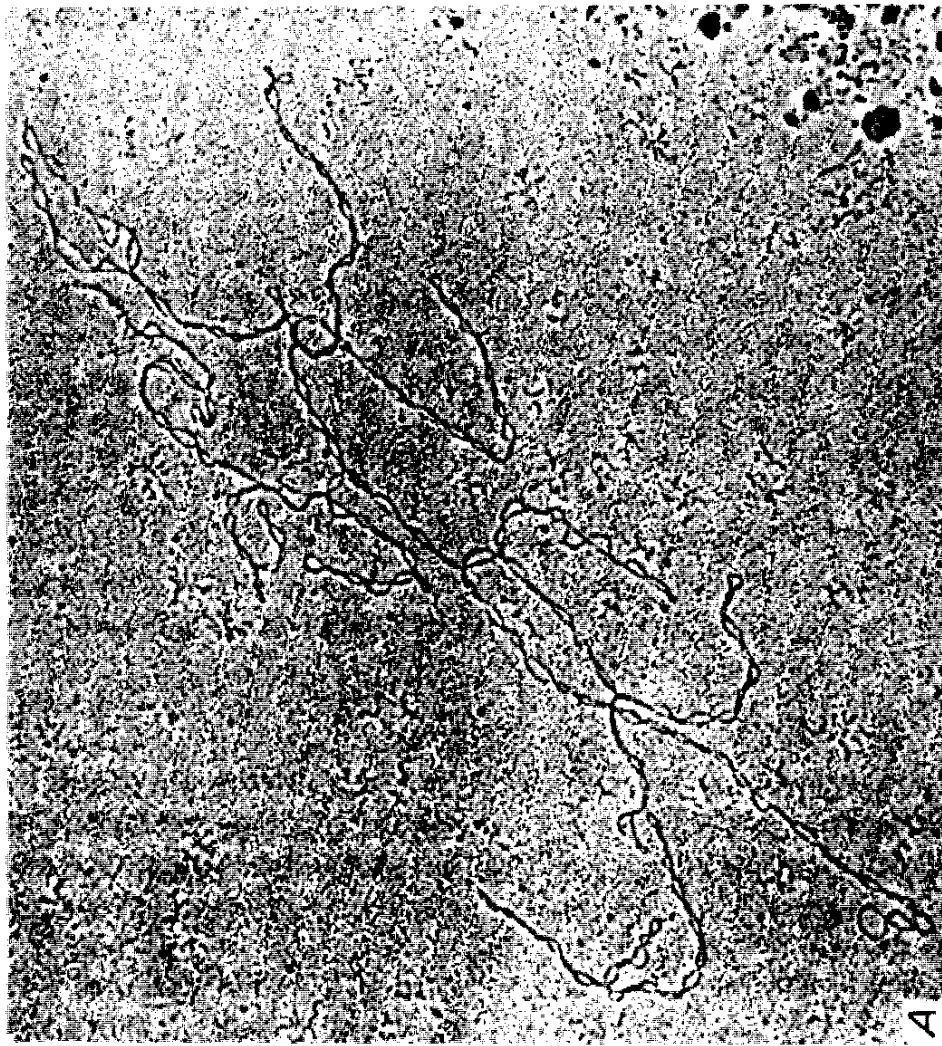


Рис. 10.6. Митохондриальная ДНК: А — из клеток дрожжей *Sacch. carlsbergensis* в состоянии сверхспирализации (по Р. Сэджер, 1975); Б — из печени крысы на стадии репликации в релаксированной форме (В. С. Михайлов, Ю. Г. Гаузе, 1974, по Н. О. Озернюку, 1978)

Таблица 10.3. ДНК митохондрий микроорганизмов, растительных и животных клеток (по Р. Сэджер, 1975)

Организм	Плотность ДНК, г/см ³	
	ядро	митохондрии
Дрожжи — <i>Sacch. cerevisiae</i>	1,698	1,684
Простейшие:		
<i>Tetrahymena</i>	1,685—1,692	1,684—1,686
<i>Leishmania henrietti</i>	1,721	1,699
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1,710	1,699
Слизевик <i>Physarum polycephalum</i>	1,700	1,686
Животные:		
Лягушка — <i>Rana pipiens</i>	1,702	1,702
Карп — <i>Cyprinus carpio</i>	1,697	1,703
Куриный эмбрион	1,701	1,707
Голубь — <i>Calumba livia</i>	1,700	1,707
Утка — <i>Anas domestica</i>	1,700	1,711
Морская свинка — <i>Cavia porcellus</i>	1,700	1,702
Печень мыши	1,701	1,701
Печень быка	1,703	1,703
Человек (лейкемические лейкоциты)	1,695	1,705
Водоросли:		
<i>Chlorella</i>	1,717	1,712
<i>Euglena</i>	1,707	1,690
Высшие растения:		
Репка — <i>Brassica rapa</i>	1,692	1,706
Лук — <i>Allium cepa</i>	1,698	1,706

за, отличающийся от цитоплазматического и близкий к аппарату белкового синтеза прокариот (см. гл. 15).

Многочлеточные эукариоты неудобны для изучения генетики митохондрий, поскольку их клетки — облигатные аэробы, которые не могут существовать при нарушении основной функции митохондрий — дыхания. В то же время дрожжи-сахаромицеты являются факультативными аэробами. При подавлении дыхания они могут существовать за счет брожения, используя для этого глюкозу и некоторые другие сахара в качестве источников углерода. На неферментируемых источниках углерода, например, на этаноле, глицерине, лактате кальция и др., в отсутствие дыхания дрожжи не растут.

Первые сведения о признаках, контролируемых митохондриями, были получены у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в конце 40-х годов в лаборатории Б. Эфрусси. Жизненный цикл дрожжей-сахаромицетов представлен на рис. 8.9. У этих грибов известны мутантные формы, образующие на глюкозе мелкие колонии, так называемые *Petite*-мутанты, фенотип которых обозначают *Pet*⁻ в отличие от дикого типа *Pet*⁺. Мутанты *Pet*⁻ не растут на неферментируемых источниках углерода, поскольку не способны к дыханию. Скрещивая гаплоидные клетки *Pet*⁻ × *Pet*⁺, можно получить гибриды дикого типа, способные к дыханию. Тетрадный анализ

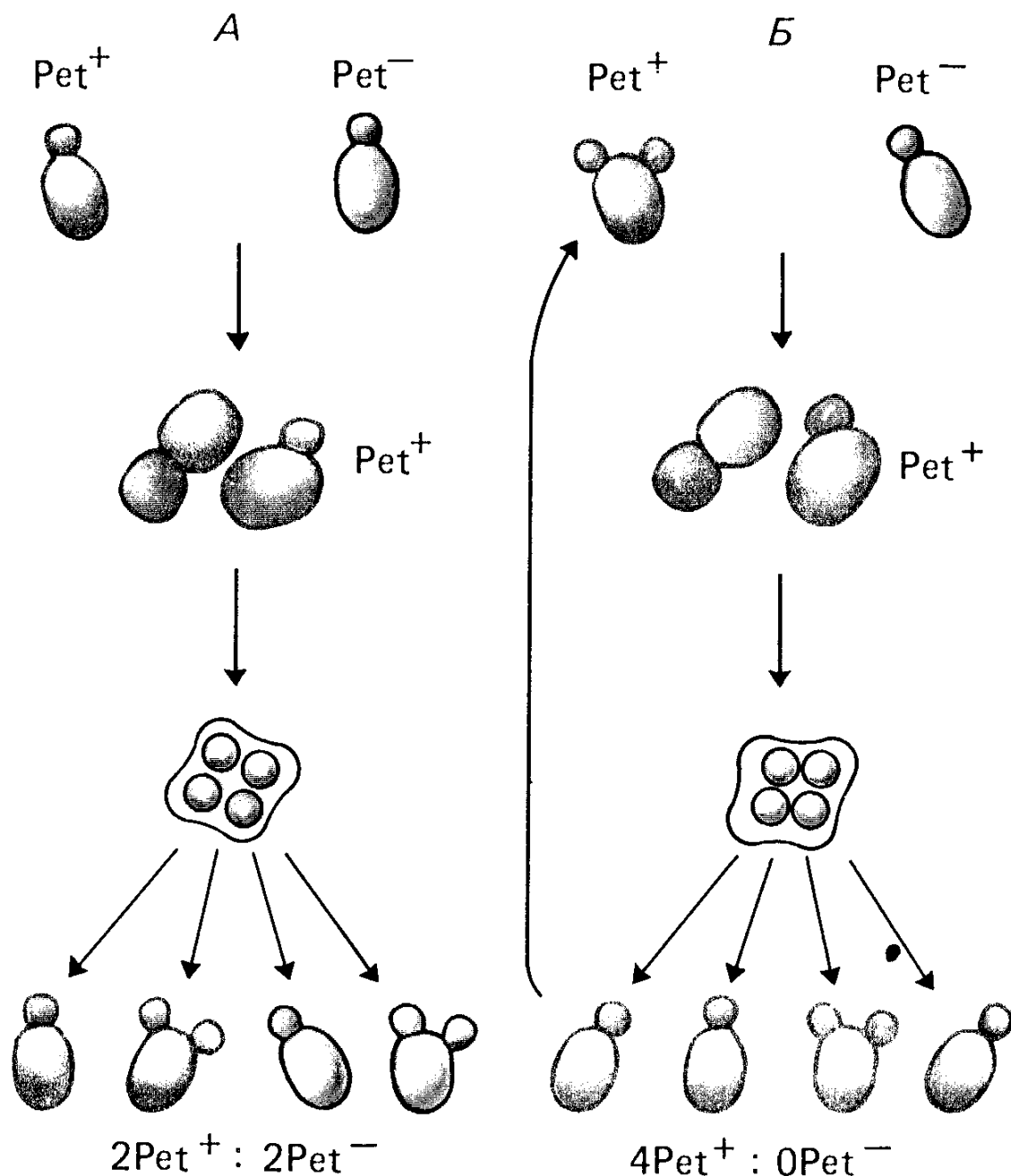


Рис. 10.7. Тетрадный анализ способности к дыханию у гибридов между гаплоидами дикого типа и А — генеративными (ядерными) и Б — вегетативными (неядерными) Pet⁻-мутантами

таких гибридов (рис. 10.7) показывает, что признак Pet⁻ от независимо полученных мутантов наследуется по-разному. Одни гибриды показывают нормальное расщепление (2Pet⁺:2Pet⁻), а другие не обнаруживают расщепления в тетрадах (4Pet⁺:0Pet⁻). Очевидно, в первом случае неспособность к дыханию определяется хромосомной мутацией, а во втором — нехромосомной, по-видимому, цитоплазматической. Эти два типа мутантов Pet⁻ были названы соответственно *генеративными* и *вегетативными*.

Нехромосомную природу вегетативных Pet⁻-мутантов подтвердили и многократные возвратные скрещивания сегрегантов Pet⁺ с родителем Pet⁻. Во всех случаях признак Pet⁻ в тетрадах не

проявлялся (рис. 10.7, Б), в то время как по ядерным маркерам, введенным в скрещивание, наблюдали регулярное расщепление 2:2. При скрещивании вегетативных и генеративных мутантов Pet^- образуются гибриды Pet^+ , в тетрадах которых происходит расщепление $2Pet^+ : 2Pet^-$.

Вегетативные Pet^- -мутанты возникают спонтанно. Иногда они составляют до 1% культуры. Их появление стимулируют высокая температура, акрифлавин, бромистый этидий в одинаковой степени у гаплоидов и диплоидов. При пересевах эти мутанты никогда не ревертируют к фенотипу Pet^+ в отличие от генеративных Pet^- . Указанные воздействия не индуцируют генеративных мутантов Pet^- . Все это заставило предположить, что вегетативные Pet^- — результат потери некоего детерминанта, находящегося в цитоплазме. Подозрение падало на митохондрии. Открытие митохондриальной ДНК (мтДНК) позволило проверить это предположение.

Сравнение мтДНК из штаммов дикого типа и из вегетативных мутантов Pet^- показало, что последние несут делеции мтДНК различной протяженности вплоть до полной ее утраты. В дальнейшем в качестве генотипического символа обозначение *pet* сохранили только для рецессивных аллелей ядерных генов, которых теперь известно более 20. Митохондриальные мутации стали обозначать [*rho*⁻ (ρ^-)]. Позже мтДНК дрожжей была маркирована мутациями устойчивости к ряду антибиотиков (эритромицин, хлорамфеникол), подавляющих синтез белка у бактерий, а также устойчивости к агентам, подавляющим дыхание (олигомицин).

При генетическом анализе признаков, контролируемых мтДНК, обнаружился ряд особенностей поведения митохондриальных генов. При спаривании гаплоидных клеток, различающихся по аллелям какого-либо митохондриального гена, образуется популяция диплоидов, состоящая из клеток, получивших ту или другую аллель, причем в соотношении, характерном для скрещиваемых штаммов. Процент диплоидов, получивших определенную аллель, обозначают как частоту *трансмиссии* данной аллели.

При исследовании рекомбинации митохондриальных геномов нужно учитывать, что в зиготе создается популяция молекул мтДНК, вступающих в многократные спаривания и обмены, аналогично тому, что известно о рекомбинации ДНК бактериофагов (гл. 9). При первых делениях зиготы эта популяция довольно быстро расщепляется, так что диплоидные вегетативные клетки содержат только один тип молекул мтДНК: один из родительских или рекомбинантный. При этом для некоторых маркеров наблюдается явление *полярности* рекомбинации, выражающееся в том, что нарушается равенство реципрокных рекомбинантных классов.

Явления разной трансмиссии и полярности рекомбинации маркеров осложняют количественную оценку частоты рекомбинации и картирование генов. Эффективным способом построения генетической карты митохондрий оказался метод, основанный на использовании *rho*-мутаций, представляющих собой делеции. При этом исследуют частоту совместной потери или сохранения исследуе-

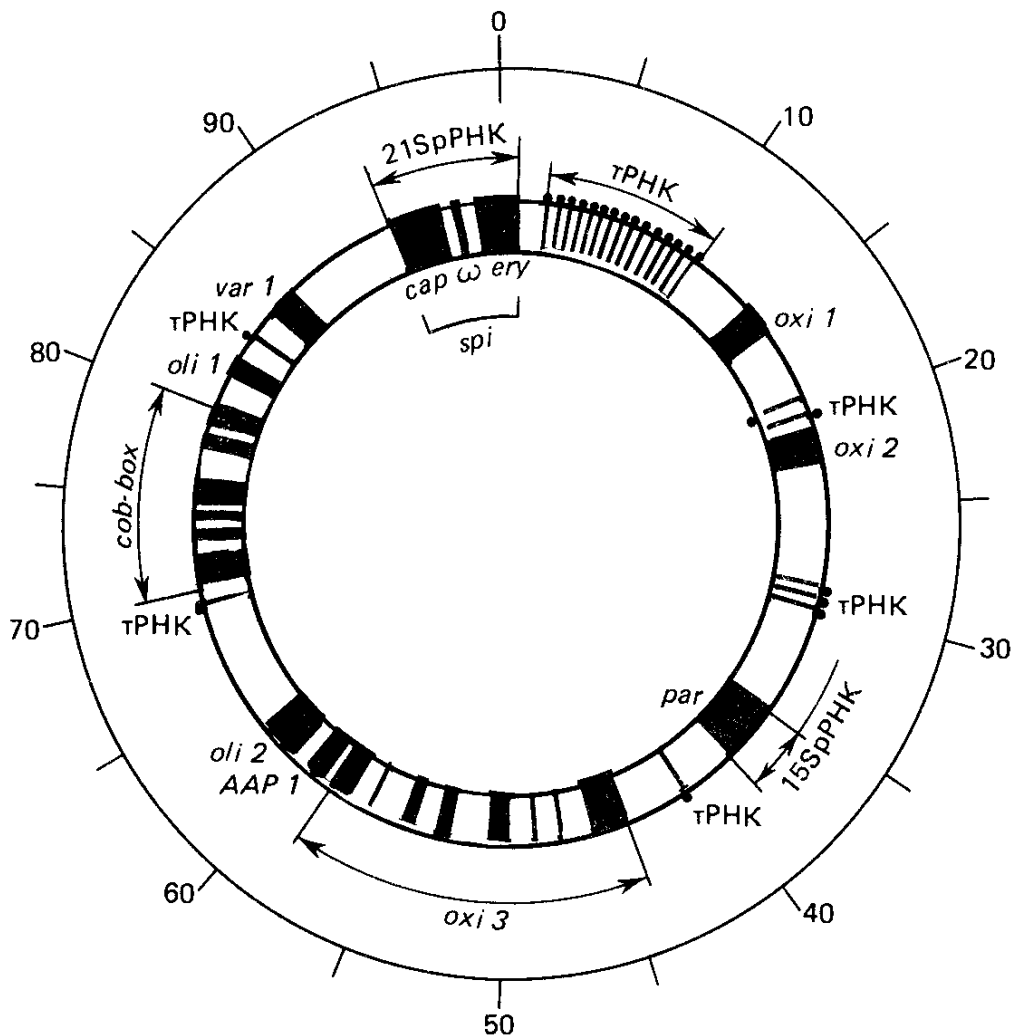


Рис. 10.8. Карта митохондриальной группы сцепления *Sacch. cerevisiae*.

Цифры внешнего круга маркируют участки общей шкалы в 100 единиц, которая соответствует 75 000 п. н. Значения генетических символов см. в табл. 10.4

мых маркеров у независимо полученных мутантов rho^- . Таким способом определяют чередование маркеров на карте. Кроме того, существуют наборы штаммов дрожжей rho^- с физически охарактеризованными делециями мтДНК. Исследуемую мутацию и делецию объединяют при скрещивании и проверяют, возникают ли по исследуемому гену рекомбинанты дикого типа в постзиготических митозах. Отсутствие рекомбинантов означает, что делеция захватывает изучаемый ген.

Если есть тестеры с *перекрывающимися* делециями, захватывающими как разные, так и одинаковые участки мтДНК, в сумме составляющими весь митохондриальный геном, то в качественном тесте можно картировать любую мутацию мтДНК. Карта митохондриального генома имеет кольцевую форму (рис. 10.8). Ниже дан перечень картированных генов (см. стр. 242).

Выделение и исследование мтДНК позволило разрешить еще одну загадку вегетативных Pet^- -мутантов, с которой столкнулись Б. Эфрусси и его коллеги (1955). При скрещивании клеток некоторых rho^- -мутантов с клетками дикого типа с разной частотой

Гены, картированные в митохондриальной группе сцепления у дрожжей

Ген	Контролируемый признак
ω	Фактор полярности рекомбинации
21S	РНК большой субъединицы рибосом
	Устойчивость к:
<i>cap</i>	хлорамфениколу
<i>spi</i>	спиромицину
<i>ery</i>	эритромицину
15S	РНК малой субъединицы рибосом
<i>tRNA</i>	тРНК
(25 генов)	
<i>cob</i>	Апоцитохром b
<i>oxi1</i>	Субъединицы цитохром-с- оксидазы
<i>oxi2</i>	
<i>oxi3</i>	
<i>oli1</i>	Субъединицы АТФазы, мутации устойчивости к олигомицину
<i>oli2</i>	
<i>aap1</i>	Субъединица АТФазы
<i>var1</i>	Белок малой субчастицы рибосом

(до 99 %) образуются диплоиды, не способные к дыханию. Это свойство, названное *супрессивностью*, стабильно наследовалось при вегетативном размножении и при скрещиваниях.

У зигот дрожжей можно индуцировать мейоз (что достигается простым перенесением их на среду с ацетатом калия или натрия) сразу после их образования от скрещивания клеток супрессивных *rho⁻*-мутантов и клеток дикого типа. В этом случае мейоз происходит нормально и возможен тетрадный анализ (рис. 10.9), хотя после вегетативного почкования зигот и образования диплоидных клеток последние в 99 % случаев имеют фенотип *Pet⁻* и уже не способны к мейозу и спорообразованию.

Тетрадный анализ признака «супрессивности» показывает отсутствие расщепления в подавляющем большинстве тетрад (0 *Pet⁺*: 4 *Pet⁻*). Оказалось, что у высокосупрессивных мутантов сохраняется небольшой участок мтДНК с точкой начала репликации. Такие мини-кольца реплицируются быстрее нормальной мтДНК и быстро вытесняют ее при вегетативном делении клеток. Так называемые нейтральные *rho⁻*-мутанты, не обладающие свойством супрессивности, вообще не содержат мтДНК. Это *rho⁰*-мутанты.

Генетика митохондрий лучше всего разработана для дрожжей-сахаромицетов, однако ряд примеров митохондриального наследования получен и у других объектов.

У *Neurospora crassa* мутация *roky* (убогий, хилый) приводит к изменению морфологии митохондрий, нарушению в них белкового синтеза, отсутствию некоторых митохондриальных ферментов. Внешне это выражается в медленном росте штамма. Признак наследуется по материнской линии. Это можно установить благодаря доступности реципрокных скрещиваний у нейроспоры. Роль мужских гамет, практически не вносящих цитоплазму при оплодотворении, играют микроконидии (см. рис. 7.4). Мутация *roky*, по видимому, результат изменения митохондриального генома.

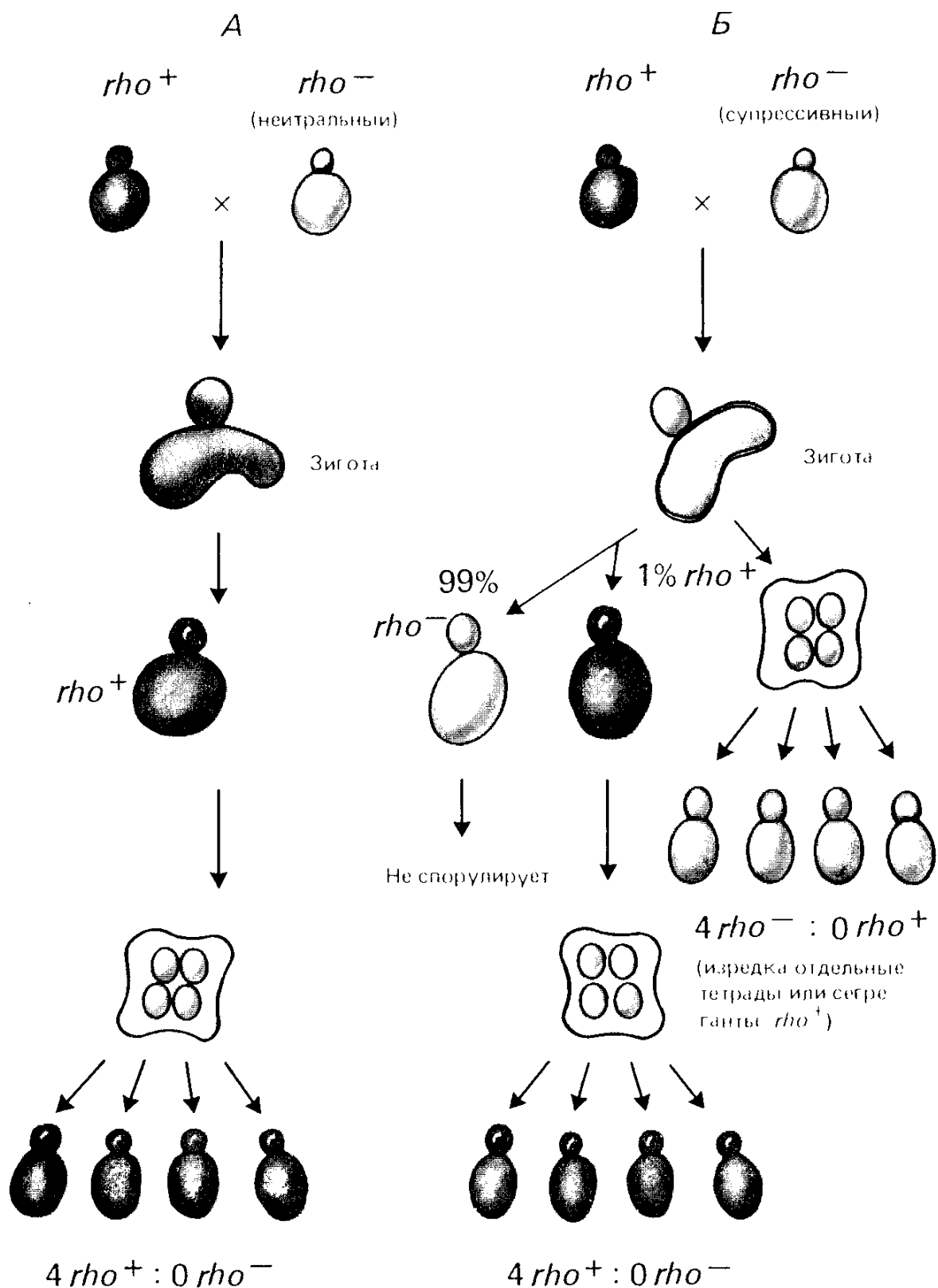


Рис. 10.9. Наследование признака Pet^- у дрожжей *Sacch. cerevisiae* в скрещивании $[rho^-] \times [rho^+]$: А — нейтральный; Б — супрессивный

У другого аскомицета — *Podospora anserina* (жизненный цикл *P. anserina* и *N. crassa* сходен) хорошо известен признак «старение мицелия», т. е. постепенное снижение жизнеспособности при непрерывном выращивании. Длительность жизни различных штаммов варьирует от 9 до 106 дней. Старение наследуется по материн-

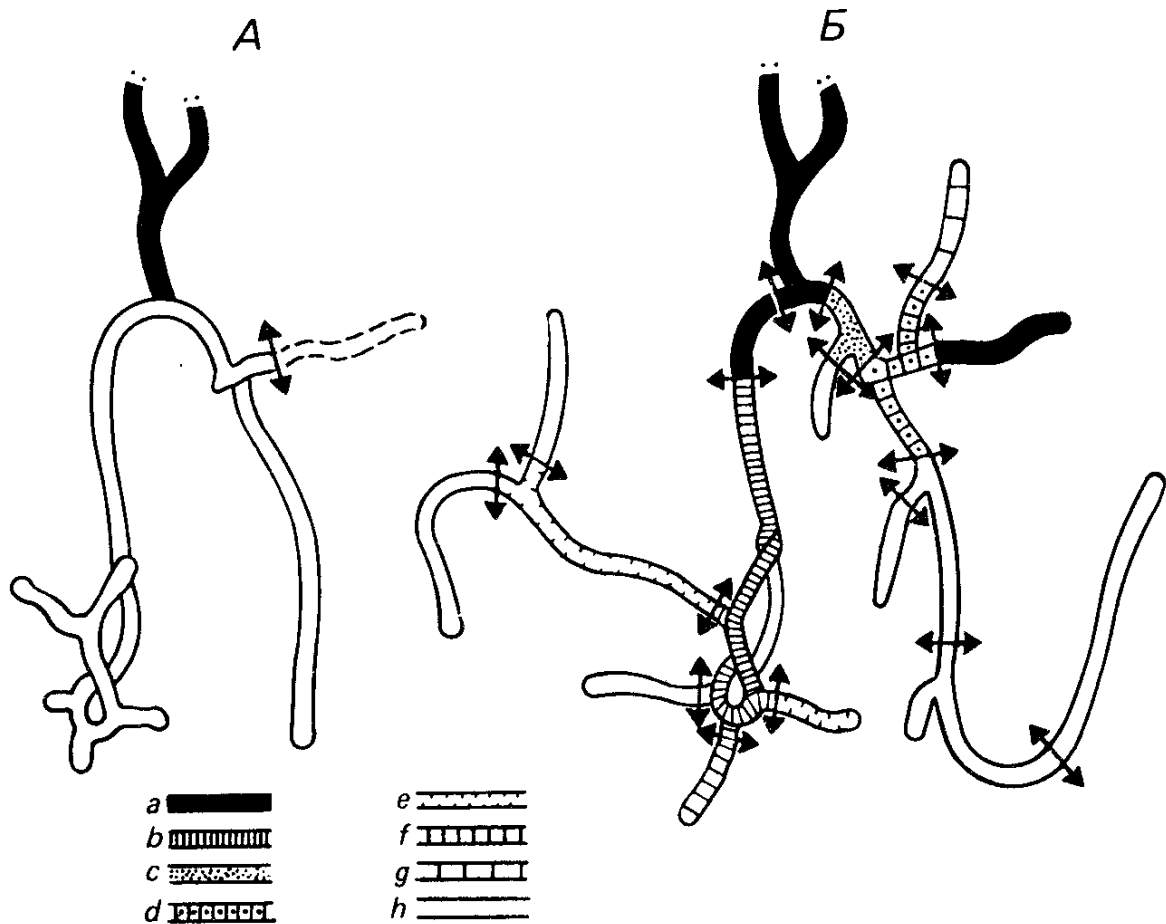


Рис. 10.10. Изучение заражения нормального мицелия при слиянии его со стареющей гифой (черная) *Podospora anserina* (Р. Сэджер, 1975):
 А — состояние мицелия непосредственно после слияния; Б — состояние мицелия через 12 ч, когда его разделили на фрагменты (показано стрелками).
 Показан фенотип культур, полученных из фрагментов: а — отсутствие роста, б — рост только в микрокапле, с — рост менее 2 см, д — рост до 2—4 см, е — рост до 4—6 см, ф — рост до 6—8 см, г — рост до 10—20 см, h — нормальная продолжительность жизни

ской линии. Его определяет инфекционное начало, как показали опыты по заражению нормального мицелия в результате его слияния со стареющей гифой (рис. 10.10). Ускоренное старение наблюдали в участках мицелия, непосредственно прилегающих к точке анастомоза. По мере удаления от нее выраженность признака ослабевала. Старение гиф *P. anserina* обусловлено распространением плазмиды, инфицирующей митохондрии.

10.4. Новый аспект парасексуального цикла. Цитодукция

Парасексуальный процесс рассмотрен в гл. 8, где акцентировалось внимание на поведении генов и хромосом ядер, объединяемых в гетерокарионах. Существование полуавтономных клеточных органелл со своими генетическими детерминантами, а также присутствие в клетке других генетических детерминант, локализованных вне ядра, побуждает обратиться еще к одной стороне парасексу-

ального процесса. В ходе этого процесса, инициируемого слиянием гиф и образованием гетерокарионов, могут объединяться различные по генетической характеристике неядерные элементы. Они по-разному комбинируются друг с другом и с ядрами, что отражается на общей картине вегетативного расщепления. Примеры такой перекombинации ядер и неядерных элементов получены у мицелиальных грибов *Neurospora*, *Aspergillus*, *Podospora* и др. Однако само естественное состояние многоядерного мицелия у этих объектов создает трудности в изучении процесса такого вегетативного расщепления.

Более строгий подход к изучению перекombинации ядер и неядерных элементов разработан для дрожжей-сахаромицетов, у которых при гибридизации также образуется, хотя и кратковременная, стадия гетерокариона (Р. Фоуэлл, 1951). Р. Райт и Дж. Ледерберг (1957) использовали это явление для изучения рекомбинации неядерных детерминант признака *Pet* и ядерных маркеров. Они показали, что первые почки зиготы дрожжей, полученные от скрещивания клеток $rho^- \times rho^+$, иногда могут оказаться гаплоидными и нести ядра того или другого родителя, судя по рецессивным маркерам, в цитоплазме rho^+ . Это явление образования *ядерно-цитоплазматических гибридов* И. А. Захаров назвал (1969) *цитодукцией*.

Цитодукция оказалась удобной для локализации генов в ядре или цитоплазме, особенно в тех случаях, когда они обнаруживают неменделевское наследование в мейозе. Цитодукция обычно происходит с частотой менее 1 %, т. е. менее 1 % всех образующихся зигот отпочковывает *цитодуктанты* — гаплоидные клетки со смешанной цитоплазмой. В экспериментах по цитодукции используют клетки одного родителя, маркированные по митохондриям нейтральной (не супрессивной) мутацией [rho^0]. Этот же штамм обычно несет какую-нибудь рецессивную ядерную мутацию устойчивости, например к канаванину (*can I'*) — аналогу аминокислоты аргинина, или другой рецессивный маркер, по которому легко вести селекцию. Эти клетки — реципиенты цитоплазмы. Второй родитель имеет нормальные митохондрии [rho^+] и несет ядерную доминантную аллель чувствительности к тому же агенту (*CAN I^s*). Эти клетки — доноры цитоплазмы. Кроме того, ядра обоих гаплоидов маркируют несколькими неселективными рецессивными мутациями, чтобы можно было следить за поведением хромосом при последующем анализе.

Цитодуктанты отбирают на среде с этанолом (или другим неферментируемым источником углерода) и канаванином при скрещивании (рис. 10.11) донора и реципиента цитоплазмы. На этой среде не может расти ни донор (он чувствителен к канаванину), ни реципиент [rho^0] цитоплазмы, ни нормальный гибрид, который тоже чувствителен к канаванину (*CAN I^s/can I'*). Вырастают только гаплоидные цитодуктанты, сохраняющие рецессивную устойчивость и приобретающие нормальные митохондрии [rho^+]. Для повышения частоты цитодукции используют ядерные мутации, за-

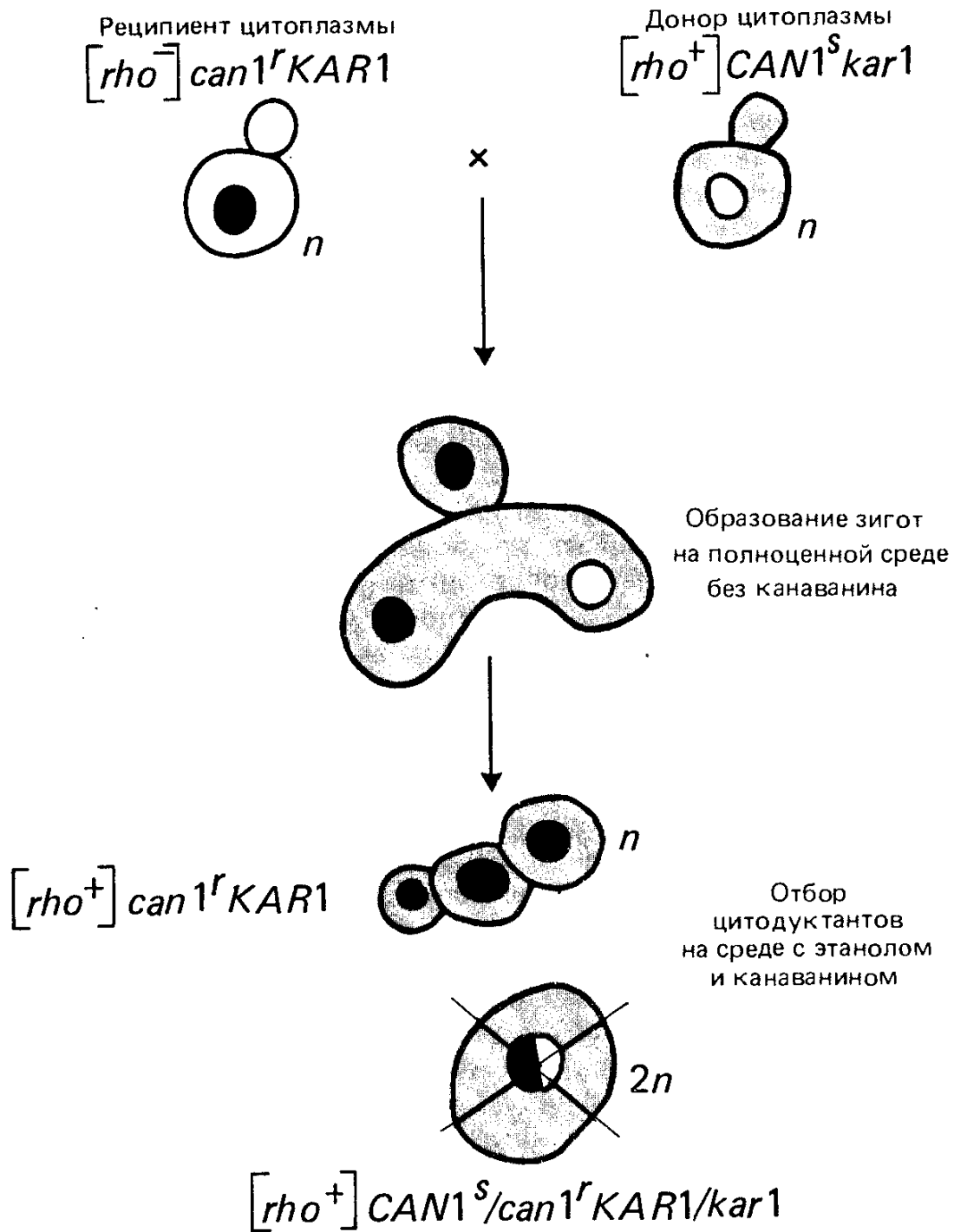


Рис. 10.11. Образование и селекция цитодуктантов при задержке кариогамии у дрожжей (пояснения в тексте)

держивающие кариогамии. Например, ядерная мутация *kar 1* повышает частоту цитодукции до 80 % и более.

Уже в опытах Р. Райта и Дж. Ледерберга с помощью цитодукции показана неядерная природа $[rho^+]$ детерминантов. В дальнейшем этот подход был использован для установления ядерной локализации криптической (не имеющей своего фенотипического проявления) плазмиды с контурной длиной 2 мкм у дрожжей, а также для установления ядерной локализации сконструированных на ее основе искусственных плазмид с ядерными генами (см.

гл. 11). Эти плазмиды при цитодукции с митохондриями не передаются и сопровождают ядерные гены того родителя, с которым они введены в скрещивание. При обычном гибридологическом анализе по доминантным плазмидным генам наблюдается резкое преобладание доминантного фенотипа: тетрады 4A:0a или 3A:1a. Это объясняется большим числом копий плазмиды в ядре и соответственно большим числом копий доминантной аллели.

Данное обстоятельство следует подчеркнуть особо, так как оно показывает, что нарушение типичного хромосомного наследования еще не доказывает неядерной природы исследуемого гена.

Применяя цитодукцию, доказывают цитоплазматическую локализацию двунитевой РНК — вирусоподобного детерминанта убивающей активности, обнаруженного у некоторых штаммов дрожжей-сахаромицетов. Такие дрожжи при совместном выращивании убивают клетки чувствительных штаммов.

Прием генетического анализа, основанный на цитодукции, широко используется у дрожжей и может быть распространен на другие объекты.

10.5. Наследование паразитов и симбионтов

В предыдущем разделе было упомянуто, что в клетке могут присутствовать некоторые не обязательные для нее элементы: вирусоподобные частицы, плазмиды. Если их присутствие сопровождается фенотипическими отличиями клетки или организма-носителя, то при гибридологическом анализе можно проследить наследование этих отличий и тем самым наследование паразита или эндосимбионта. В действительности к этим выводам пришли противоположным путем.

Присутствие эндосимбионтов может быть причиной появления признаков, придающих их носителям известное селективное преимущество. Так, у *Paramecium aurelia* существуют линии-убийцы, выделяющие токсин парамецин, безвредный для его продуцентов, убивающий туфельки того же вида, но принадлежащих к чувствительным линиям. В цитоплазме парамеций-убийц находятся так называемые каппа-частицы, обычно не передающиеся при конъюгации (см. гл. 8), поскольку при этом происходит только обмен ядрами, но не цитоплазмой. При задержке расхождения конъюгирующих клеток, когда они обмениваются цитоплазмой, каппа-частицы могут передаваться чувствительным партнерам. Тогда эксконъюганты тоже становятся убийцами. Сохранение каппа-частиц в цитоплазме и устойчивость к парамецину зависит от доминантного состояния трех ядерных генов. Каппа-частицы представляют собой бактерии *Caudobacter taeniospiralis* — эндосимбионты туфельки. Их можно даже культивировать вне клетки, на искусственных средах, и заражать ими *P. aurelia*, лишенных этих бактерий.

Эндосимбионты широко распространены у простейших, причем экологической нишей для них может быть не только цито-

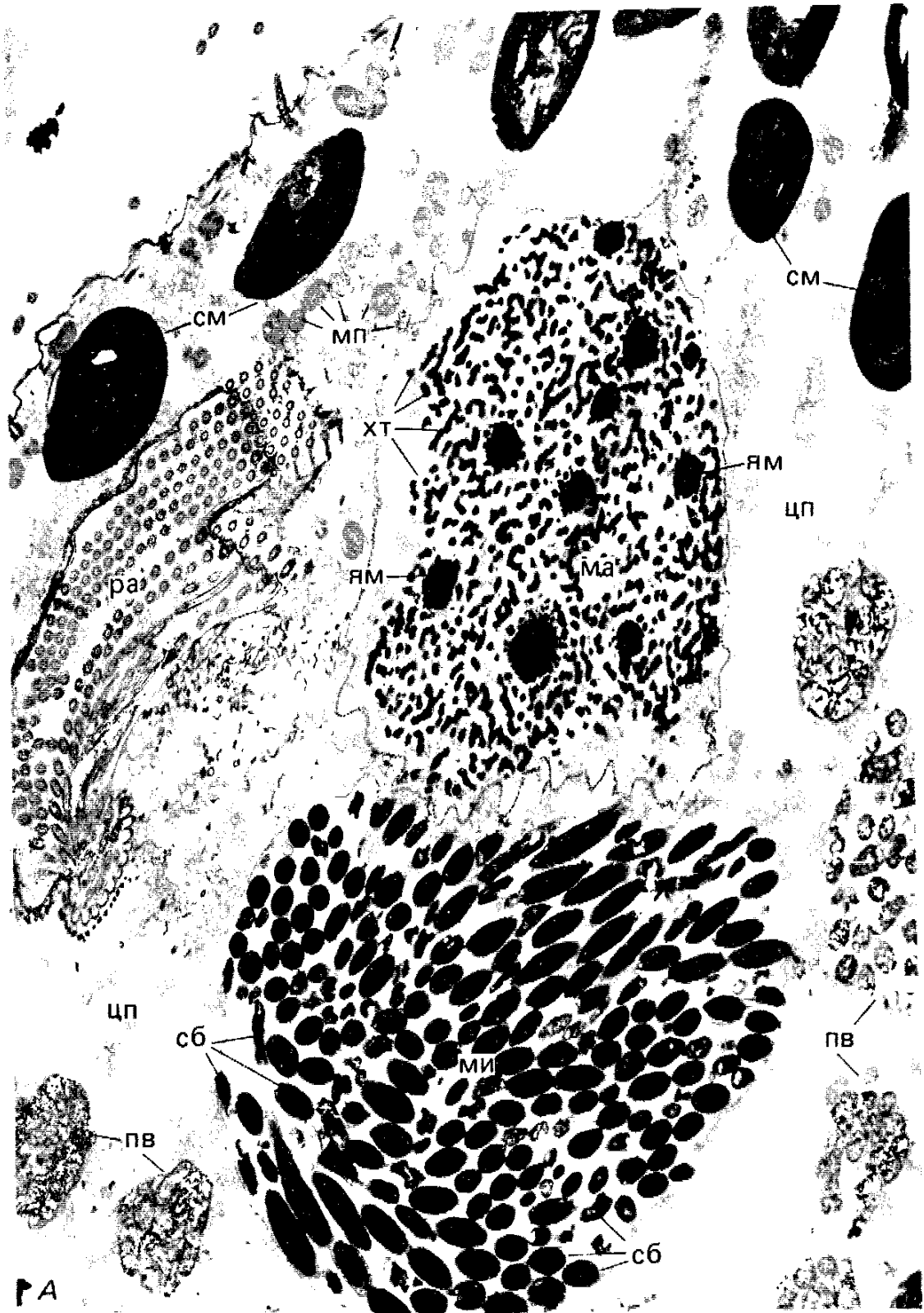


Рис. 10.12. Эндосимбионты в микроядре *Paramecium bursaria* (Д. В. Осипов, 1981):

А — ультраструктура участка клетки инфузории *P. bursaria*, содержащей в цитоплазме обычные для вида симбиотические микроводоросли р. *Chlorella* и в микроядре — факультативные симбиотические бактерии *Holospora acuminata*: ма — макроядро, свободный от симбионтов, ми — микроядро, зараженный симбиотическими бактериями, мп — митохондрии парамеции, пв — пищеварительные вакуоли парамеции, ра — ротовой аппарат парамеции, сб — симбиотические бактерии *H. acuminata*, см — симбиотические микроводоросли р. *Chlorella*, хт — хроматиновые тела макроядра, цп — цитоплазма парамеции, ям — ядрышки макроядра. Электронограмма (8000×);

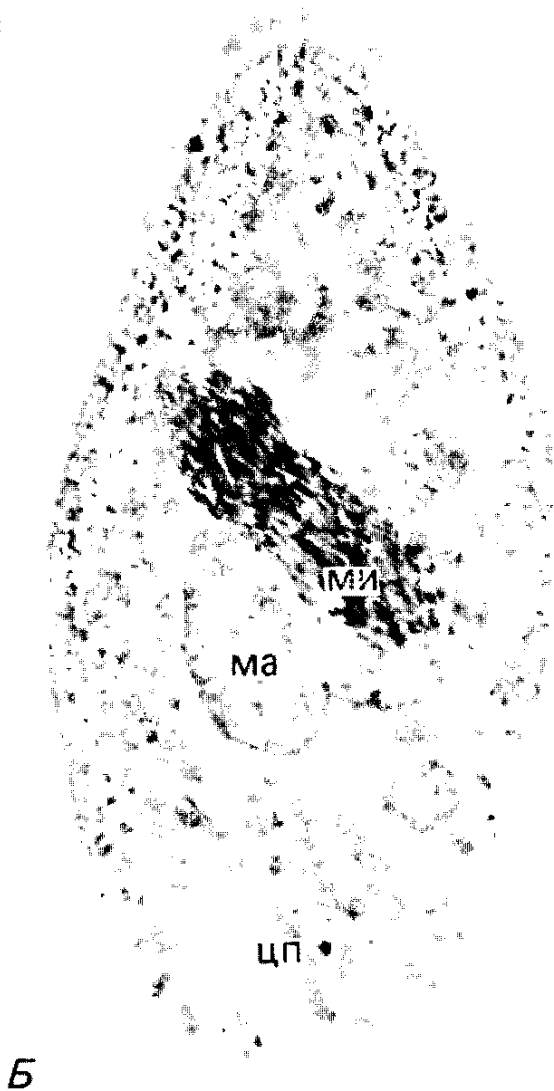


Рис. 10.12. Продолжение.
 Б — «белый» клон инфузории *P. bursaria*, лишенный симбиотических микроводорослей, но содержащий в микронуклеусах многочисленные симбиотические бактерии *H. acuminata*:

ма — макронуклеус, свободный от симбионтов, ми — микронуклеус, зараженный симбиотическими бактериями, цп — цитоплазма парамеции. Микрофотография (1300×)

плазма, но также макро- (Ма) и микронуклеус (Ми). При этом как показал Д. В. Осипов, эндосимбионты Ма никогда не живут в Ми и, соответственно, эндосимбионты Ми не живут в Ма (рис. 10.12). Клетки *Paramecium* с зараженным Ма или Ми не способны к половому процессу.

У *D. melanogaster* известны линии без самцов. Самки этих линий при скрещивании с любыми самцами дают в потомстве только самок. Выяснилось, что бессамцовые линии заражены спирохетами, которые, проникая в откладываемые яйца, убивают мужские эмбрионы, но не убивают женские эмбрионы. В результате самки становятся носителями инфекционного начала.

Тесная связь между функциями ядра и цитоплазматическими эндосимбионтами была продемонстрирована в конце 60-х годов у *Ameba proteus* К. Джеоном. Культура *A. proteus* была случайно заражена бактериями, которые проникли в цитоплазму простейшего и размножились там до численности 150 тыс. шт. на клетку. Большинство амеб погибло, однако часть из них выжила и активно делилась в присутствии инфицировавшей их цитоплазму бактерии. Число бактериальных клеток в амебе достигало теперь примерно 50 000.

Ядро простейшего стало зависимым от бактерии, превратившейся в эндосимбионта. Пересаженное в другую амебу ядро уже не могло обеспечивать функционирование и деление цитоплазмы в отсутствие некогда патогенных бактерий. Этот факт показывает возможный путь возникновения зависимости генетических функций хозяина от находящегося в его клетках эндосимбионта.

Факты такого рода используют для подтверждения гипотезы о симбиогенетическом происхождении эукариотической клетки, в частности, о бактериальном происхождении хлоропластов, митохондрий и некоторых других клеточных органелл, содержащих ДНК, например кинетосом у простейших. Впервые гипотезу относительно происхождения хлоропластов высказал в начале века профессор Петербургского университета А. С. Фаминцын (1835—1918).

Сторонники этой гипотезы рассматривают самостоятельность аппарата репликации, транскрипции и белкового синтеза (см. гл. 15) в клеточных органеллах, близких по строению к аналогичным аппаратам бактерий, как одно из доказательств справедливости такой гипотезы. В то же время нельзя забывать, что многие функции органелл находятся также под контролем ядра. Подчеркнем, что все белки рибосом митохондрий у дрожжей, за исключением одного, кодируют гены ядра, так же как и многие цитохромы, работающие на митохондриях. Структура генов митохондрий более сходна с таковой в клеточном ядре, чем с генами бактерий (см. гл. 15, 19). Все это показывает маловероятность симбиогенетического происхождения митохондрий.

Большая автономия свойственна хлоропластам, однако и здесь основной процесс, осуществляемый хлоропластом, — фотосинтез, также контролируют гены самого хлоропласта и гены ядра. Правда, генетика хлоропласта разработана хуже, чем генетика митохондрий. Возможно, поэтому гипотеза симбиогенетического происхождения хлоропластов представляется более вероятной, чем аналогичная гипотеза в отношении митохондрий.

10.6. Наследование вирусов и экстрахромосомные элементы

Существуют хорошо документированные факты так называемой *вирусной наследственности*. Ограничимся одним примером. Некоторые линии *D. melanogaster* проявляют повышенную чувствительность к CO_2 . Они гибнут в течение 15 мин в атмосфере чистого CO_2 , в то время как другие линии, нормальные по этому признаку, легко выдерживают такое испытание. CO_2 -чувствительность наследуется по материнскому типу. При скрещивании чувствительных самок с устойчивыми самцами даже в течение нескольких поколений постоянно получается чувствительное потомство. При реципрокном скрещивании CO_2 -чувствительность передается реже и рас-

щепления по этому признаку нерегулярны. Все это указывало на нехромосомную, скорее цитоплазматическую природу детерминации признака.

Устойчивых мух можно заразить чувствительностью к CO_2 , пересаживая им органы чувствительных особей или впрыскивая им гемолимфу. После такого заражения CO_2 -чувствительность наследуется при скрещивании по уже приведенной схеме. Носителем этого признака оказался вирус, названный *сигма-вирусом*, по своим свойствам очень близкий к РНК-содержащему *вирусу везикулярного стоматита*, вызывающего ложный ящур у лошадей и крупного рогатого скота. Если дрозофилу заразить вирусом везикулярного стоматита, то она становится чувствительной к CO_2 .

У дрозофилы найдено несколько типов РНК-содержащих вирусов, которые живут в организме насекомого или в культивируемых клетках как симбионты, не вредя хозяину. Их генетические эффекты неизвестны.

В последние годы у дрозофилы обнаружено несколько типов экстрахромосомных элементов, а также *мигрирующих элементов*, которые могут менять свою локализацию в геноме. Они получили название «прыгающих» генов. Эти элементы весьма напоминают *онкогенные РНК-содержащие вирусы*, или *ретровирусы*.

Геномная РНК ретровирусов, попадая в клетку, строит свою ДНК-копию с помощью фермента *обратной транскриптазы* или РНК-зависимой ДНК-полимеразы, которую кодирует один из трех их генов. ДНК-копии вирусного генома включаются в хромосомы инфицированных клеток в форме провируса, следствием чего может быть злокачественное перерождение клеток. На ДНК-копии ретровирусов строится РНК-копия, которая в дальнейшем включается в вирион или служит промежуточной стадией при перемещении вируса в новую точку локализации. Сейчас известно, что ретровирусы, мигрируя, могут захватывать некоторые гены хозяина и переносить их не только в новое место в геноме, но и от организма к организму.

Экстрахромосомный элемент δ , обнаруженный у дрозофилы С. Минамори, по своему «поведению» напоминает ретровирус. Элемент δ передается через цитоплазму, т. е. наследуется обычно по материнскому типу и вызывает преимущественную гибель эмбрионов, имеющих вариант II хромосомы, чувствительный к этому элементу. При этом женские зиготы поражаются чаще мужских. В результате нарушается расщепление по генам II хромосомы и соотношение по полу отклоняется от 1:1 в пользу самцов. Однако происходит все это только в одном из реципрокных скрещиваний. δ вызывает мутации в определенных районах II хромосомы. По данным С. Минамори, элемент δ образуется из II хромосомы в качестве экстрахромосомной копии одного из ее участков.

Еще большее сходство с онкогенными ретровирусами обна-

руживают так называемые мигрирующие элементы генома дрозофилы, открытые Д. Хогнессом, Г. П. Георгиевым, В. А. Гвоздевым в 1976—1977 гг. Их называют *множественными диспергированными генами (МДГ)*, поскольку они повторяются в геноме и разбросаны по разным локусам. Их называют также *ретротранспозонами*. Последнее наименование связано с тем, что эти элементы могут перемещаться по геному, и одним из способов такой миграции является синтез на них РНК, а затем при помощи обратной транскриптазы синтез ДНК-копии, внедряемой в новое место. Для ряда МДГ показано, что в их состав, так же как и в состав генома ретровирусов, входит ген, кодирующий обратную транскриптазу. Более подробно о свойствах хромосомных мигрирующих элементов рассказывается в гл. 13.

Здесь ограничимся тем, что напомним об эписомах бактерий (гл. 9) — элементах бактериального генома, которые могут существовать в интегрированном с хромосомой и в свободном состоянии. О них было рассказано на примерах *F*-фактора *E. coli*, факторов лекарственной устойчивости и умеренных бактериофагов в состоянии профага. Таким образом, сходные элементы существуют и в геномах эукариот. Во многих случаях показано не только сходство, но и тождество первичной структуры экстрахромосомных и хромосомных элементов. Так, в частности, уже упоминавшаяся двунитевая РНК штаммов-убийц у дрожжей имеет комплементарные последовательности в геноме. У того же объекта Р. Планта и В. Л. Ларионов описали кольцевую плазмиду с контурной длиной 3 мкм (9000 п. н.) — копию генов XII хромосомы, кодирующих рибосомную РНК. У дрозофилы обнаружены свободные кольцевые формы некоторых МДГ.

Таким образом, по крайней мере некоторые нехромосомные элементы могут представлять собой копии хромосомных генов. Наследование «собственных» нехромосомных генов и генов, привносимых извне, оказывается одинаковым. Открытие трансдукции у бактерий, а также захвата хромосомных генов онкогенными вирусами, успехи генной инженерии (см. гл. 11) породили гипотезу о том, что наряду с так называемым *вертикальным потоком генов*, т. е. от родителей к детям, существует и так называемый *горизонтальный перенос генов* между особями одного и того же и разных поколений и даже между разными видами. То, что примеры такого переноса, несомненно, существуют, будет показано в следующей главе, а вот широкое его распространение в природе у большинства специалистов вызывает сомнения.

10.7 Предетерминация цитоплазмы, или собственно цитоплазматическое наследование

Очень часто наследование через пластиды и митохондрии, а также другие примеры нехромосомного наследования объединяют понятием цитоплазматическая наследственность. В пре-

дыдущих разделах этой главы показано, что все случаи стабильного нехромосомного наследования связаны с клеточными оргanelлами, содержащими ДНК в качестве носителя наследственной информации. То же самое справедливо и в случае наследования симбионтов и вирусов. Следовательно, речь не идет о цитоплазме как носителе наследственных свойств, и в лучшем случае понятие «цитоплазматическая наследственность» должно означать место, локализацию в клетке конкретных дискретных носителей генетического материала. Кроме того, нехромосомные гены могут находиться и в ядре. Именно с учетом всех этих моментов термин «нехромосомное наследование» предпочтительнее в широком смысле слова.

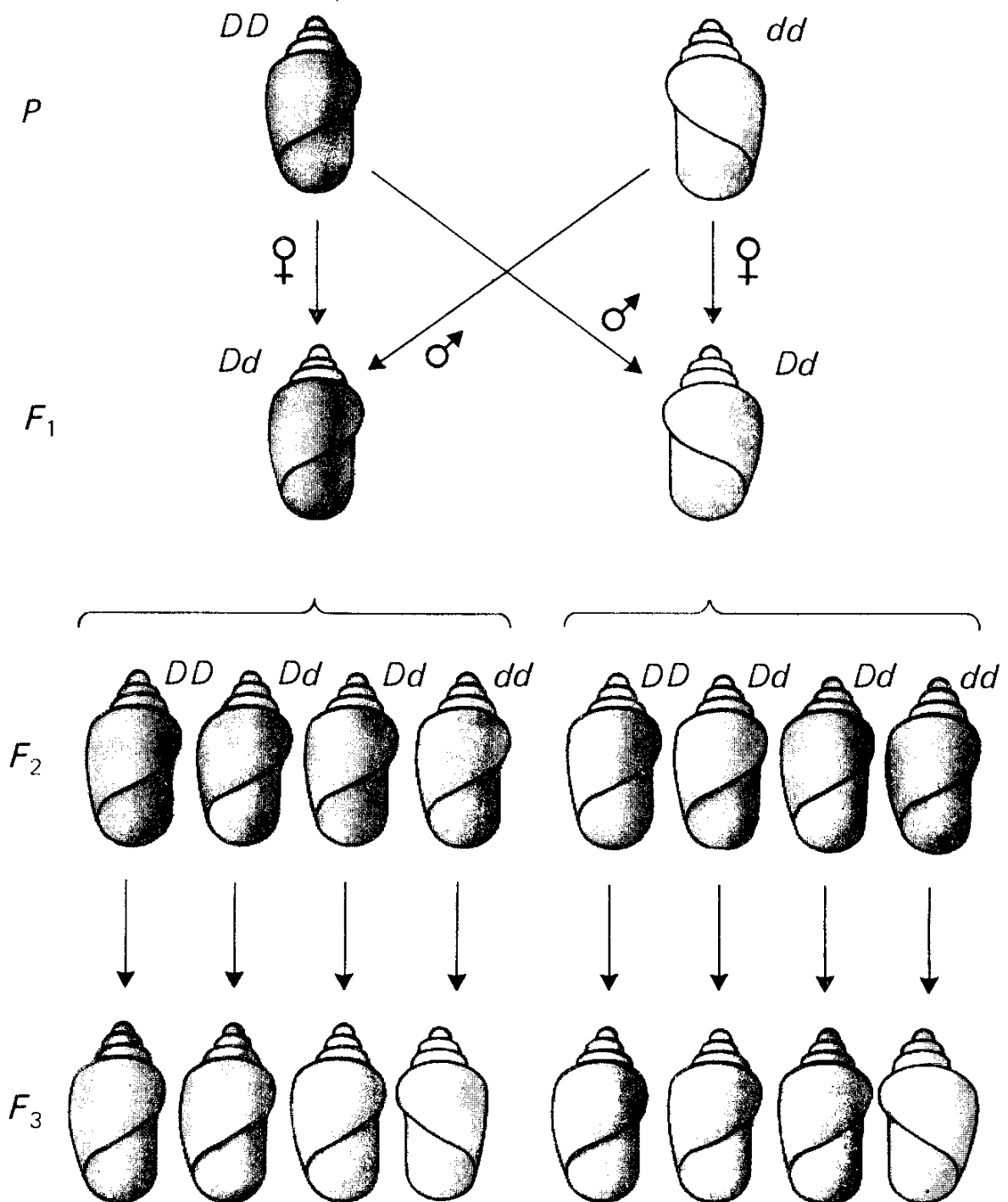
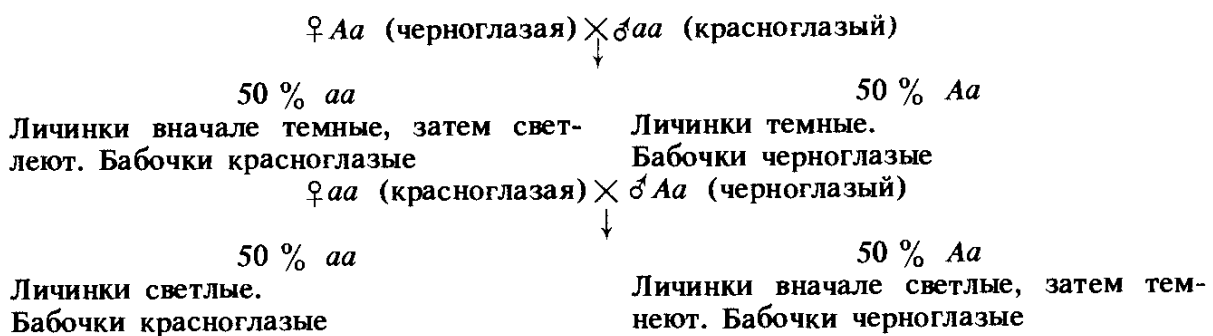


Рис. 10.13. Наследование направления закручивания раковины у прудовика

Остается ли место для собственно цитоплазматического наследования в узком смысле, т. е. для детерминации признаков не органеллами клетки, а самой цитоплазмой? Да, такие случаи известны, однако при этом наследование признака оказывается нестабильным и его проявление затухает в течение одного или нескольких поколений. Наиболее яркий пример — наследование направления завитка раковины у прудовика (*Limnaea*). Существуют прудовики с правозакрученной (*D*) и левозакрученной (*d*) раковинами. Реципрокные скрещивания: ♀ *DD* × ♂ *dd* и ♀ *dd* × ♂ *DD* дают в *F*₁ различный результат: гибриды наследуют признак матери (рис. 10.13). При первом скрещивании они все «правые», а во втором — все «левые». Благодаря тому, что *Limnaea* — гермафродитные животные, у них возможно самооплодотворение. В *F*₂ от обоих скрещиваний все потомки имеют правозакрученную раковину. И только в *F*₃, также полученном путем самооплодотворения, в каждом из исходных реципрокных скрещиваний расщепление «правых» и «левых» раковин было 3:1. На рис. 10.13 показано, что проявление признака — направление закручивания раковины у прудовика — как бы отстает на поколение от генотипической формулы. Решающую роль в таком отставании играет генотип материнского организма, определяющий прежде всего свойства цитоплазмы яйцеклетки, от которой и зависит направление закручивания раковины. Этот признак формируется в раннем эмбриогенезе направлением веретена второго дробления. Такое явление получило название *преддетерминации цитоплазмы* генотипом матери или *материнского эффекта*.

Аналогичное явление наблюдается при наследовании пигментации оболочки яйца у шелкопряда, а также смена поколений без диапаузы. Оба эти признака определяются свойствами цитоплазмы яйца, которые формируются до оплодотворения под контролем генотипа матери. Так же определяется пигментация глаз и некоторых тканей у личинок бабочки — мельничной огневки (*Ephestia kuhniella*). Следует отметить, что в последнем случае материнский эффект постепенно затухает в онтогенезе.

Наследование окраски глаз и тканей личинки у мельничной огневки



Это связано с тем, что доминантная аллель *A* определяет синтез формилкинурина — предшественника пигмента (см. рис. 3.3 в гл. 3). Он накапливается и в яйцеклетках *a*, если они развиваются

у самок Aa , и постепенно расходуется в онтогенезе или наоборот: его нет в яйцеклетках a , формируемых самками aa , и только после оплодотворения зиготы Aa начинают его синтезировать.

Своеобразное взаимодействие предетерминации цитоплазмы и генов ядра наблюдается при *гибридном дисгенезе* у дрозофилы. Как известно, у этого насекомого в лабораторных линиях не наблюдается кроссинговер у самцов. Кроссинговер происходит у самцов из некоторых природных популяций. При скрещивании таких самцов с самками из лабораторных линий в F_1 проявляется целый комплекс аномалий: повышенная мутабельность, стерильность самцов и самок, нарушения в расщеплении по ядерным маркерам, отклонение в соотношении по полу от 1:1, хромосомные аномалии и т. д. Чаще всего эти нарушения наблюдаются, если цитоплазма в зиготу поступает от самок лабораторных линий, а некоторые хромосомы — от самцов природных популяций.

Свойства «лабораторной» цитоплазмы, вызывающей при взаимодействии с «природными» хромосомами гибридный дисгенез, могут быть изменены, но для этого нужно, чтобы хромосомы, внесенные из природной популяции, действовали на нее в течение ряда поколений.

10.8. Критерии нехромосомного наследования

Можно ли на основе простых критериев, применяемых при генетическом анализе, различить хромосомное наследование и различные типы нехромосомного наследования? Обычно это сделать нелегко, и для окончательного вывода требуется комплекс оценок. Суммируя материал, изложенный в этой главе, отметим, что прежде всего нехромосомное наследование выражается в различии результатов реципрокных скрещиваний там, где их можно провести, используя явление гетерогамии (см. гл. 8). Однако различный результат реципрокных скрещиваний может быть получен и при сцеплении с полом (см. гл. 5).

Поэтому дополнительным критерием могут служить насыщающие скрещивания с заменой всех хромосом женского организма на хромосомы мужского организма, как это рассмотрено на примере наследования ЦМС у кукурузы.

В случае изогамии о нехромосомном наследовании может свидетельствовать отсутствие расщепления в скрещивании при гаметическом анализе, например в тетрадах, но наличие постзиготических расщеплений в митозах, как это бывает при наследовании признаков митохондрий у дрожжей или расщепление в митозах у гаплоидных сегрегантов, как это показано для признаков хлоропласта у хламидомонады. При этом, правда, трудно различить наследование через органеллы цитоплазмы и ядерное плазмидное наследование. Некоторые специальные приемы позволяют разграничить и эти случаи, например использование цитодукции у дрожжей, вегетативное расщепление гетерокарионов у мицелиальных грибов.

Наконец, дополнительным критерием может служить повышенная чувствительность ДНК клеточных органелл или плазмид к некоторым агентам. Так, при обработке бромистым этидием у дрожжей теряется мтДНК. Гуанидингидрохлорид и фторурацил изгоняют из дрожжей двунитевую РНК штаммов-убийц и некоторые другие нехромосомные детерминанты.

Как уже отмечалось, трудно разделить наследование через органеллы и плазмиды, с одной стороны, и через эндосимбионтов и вирусы — с другой. Наряду с генетическими критериями здесь необходим комплекс биохимических и цитологических подходов.

Механизмы наследования, рассмотренные в этой главе, убеждают в том, что клетка может содержать сложную систему полуавтономных взаимодействующих генетических единиц, находящихся не только в хромосомах ядра, но и в нуклеоплазме, в клеточных органеллах (пластидах, митохондриях и др.), а также в цитоплазме. Наследование этих генетических детерминант порой трудно отличить от наследования эндосимбионтов и вирусов. Особенно это касается вирусов, поскольку провирусы могут объединяться с геномом клетки в ее ядре и приобретать свойства, характерные для эписом в интегрированном состоянии, т. е. наследоваться как часть генетического материала ядра. Это в свою очередь открывает дополнительные перспективы направленного переноса отдельных генов — проблема, которая будет рассмотрена в следующей главе.

Вопросы к главе 10

1. Перечислите критерии нехромосомного наследования.
2. Сравните свойства гетерозиготного и гетероплазматического состояния. В чем сходство? В чем разница?
3. У ячменя известны бледно-зеленые формы, называемые хлорина. При скрещивании растений типа хлорина в качестве материнской формы с нормальными зелеными растениями все растения F_1 имеют фенотип хлорина. Если растения типа хлорина используются в качестве отца, то гибридные растения зеленые. Что можно сказать о генетической природе этой аномалии?
4. У растений мужская стерильность может быть обусловлена ядерными генами, цитоплазматическими органеллами и взаимодействием ядра и цитоплазмы. Приведите схемы наследования признаков во всех трех случаях.
5. Две географические расы растений одного вида плодовицы только в одном из реципрокных скрещиваний. Каковы возможные причины этого явления?
6. Можно ли провести границу между нехромосомным наследованием и наследованием вирусной инфекции?
7. В чем сходство генетических процессов при трансплантации ядер, гетерокариозе и повторных возвратных скрещиваниях?
8. Перечислите генетические механизмы, приводящие к соматическому расщеплению.
9. При скрещивании дрожжей-сахаромицетов $[rho^-] a Can^r Kil^- \times [rho^+] \times \alpha Can^s Kil^+$ отобраны 150 колоний $[rho^+] a Can^r Kil^+$ на среде с канаванином. Объясните результат. Kil^+ — это способность убивать чувствительные клетки.
10. У *Chlamydomonas reinhardtii*, mt^- получен мутант *Sr*, устойчивый к стрептомицину. При скрещивании его с чувствительным штаммом mt^+ образовались зиготы, в потомстве которых во всех тетрадах и октадах были только гаметы, чувствительные к стрептомицину. Объясните результат.

Свойства генетического материала. Клеточная и генная инженерия

В предыдущих главах (гл. 8—10) было показано разнообразие процессов, которые приводят к объединению и рекомбинации генетического материала в природе. При работе с различными объектами закономерности наследования выражаются в разной форме. В то же время обобщение законов наследования, вскрываемых методами генетического анализа, позволяет выявить некоторые универсальные свойства генетического материала.

Известно, что генетические функции — хранение, передача и фенотипическое проявление наследственных задатков — связаны с их молекулярным носителем, чаще всего с ДНК, реже с РНК.

Представления об универсальности свойств генетического материала и клеточного строения живой материи являются теоретическими обобщениями, которые воплощаются в таких новых областях экспериментальной биологии, как клеточная и генная инженерия. Это синтетическое направление легло в основу новой области прикладной биологии — биотехнологии.

11.1. Закономерности наследования и свойства генетического материала

Генетический материал организма — это совокупность носителей его наследственной информации. Несмотря на кажущееся разнообразие проявлений генетических закономерностей у разных организмов, генетический материал характеризуется всего несколькими общими свойствами. Их можно показать с помощью методов генетического анализа, используя любой объект

1. **Свойство относительной стабильности.** Генетический анализ возможен только благодаря тому, что признаки растений, животных и микроорганизмов стабильно воспроизводятся в ряду поколений. Особенно наглядно это демонстрирует вегетативное размножение, обычное для микроорганизмов, широко распространенное у растений и реже встречающееся у животных. Стабильность элементарных признаков можно наблюдать в ряду половых поколений во всех царствах живой природы. Именно на свойстве стабильности генетического материала основаны принципы гибридологического анализа, сформулированные еще Г. Менделем (гл. 1). В основу гибридологического анализа он положил работу с несколькими формами гороха, устойчиво воспроизводящими свои свойства при самоопылении. Аналогично поступили Дж. Ледерберг

и Е. Тэйтум при поисках полового процесса у бактерий *E. coli*. В этом случае также были выбраны формы, стабильно различающиеся наследуемыми особенностями.

Свойство стабильности генетического материала не абсолютно. Время от времени происходят мутации (см. гл. 12), возникают новые аллели, которые вновь передаются из поколения в поколение. Таким образом, мы говорим о свойстве относительной стабильности генетического материала, которое нашло наиболее удачное выражение в принципе *конвариантной редупликации* Н. В. Тимофеева-Ресовского (см. гл. 1).

2. Свойство дискретности генетического материала обобщает очень разные по форме конкретные проявления законов расщепления и независимого наследования генов, сформулированных Г. Менделем. Если для гороха наследование дискретных единиц — генов выражается в формулах: $3A—:1aa$ при моногибридном или $9A—B—:3A—bb:3aaB—:1aabb$ при дигибридном скрещивании, то для микроорганизмов те же закономерности проявляются иначе. В тетрадном анализе у грибов и водорослей расщепление при моногибридном скрещивании символизирует соотношение $2A:2a$, а при дигибридном: $1P:1N:4T$ (см. гл. 8). Можно вспомнить также расщепление в случайной выборке гамет или в анализирующем скрещивании. В более сложной форме те же закономерности выражаются при расщеплении у бактерий, вирусов и при анализе нехромосомного наследования.

Все приведенные примеры — не что иное, как частные проявления общего свойства генетического материала — его генной дискретности. Первая попытка формулирования этого свойства связана с именем У. Бэтсона и его правилом чистоты гамет (см. гл. 2). Дискретность генетического материала выражается на нескольких уровнях: генном, хромосомном и геномном, включающем всю совокупность хромосомных и нехромосомных генетических детерминант.

3. Свойство линейности генетического материала — результат обобщения закономерностей, открытых школой Т. Х. Моргана и лежащих в основе хромосомной теории наследственности. У всех исследованных до сих пор организмов группы сцепления линейны, т. е. изображаются отрезками или замкнутыми линиями (окружностями) на плоскости. Хромосомы не бывают разветвленными. История генетики, правда, знает попытки рисовать трехплечие хромосомы на первых генетических картах *N. crassa* (К. Линдегрэн) и *E. coli* (Дж. Ледерберг). Тем не менее генетический анализ вновь возвращался к универсальной форме групп сцепления — линейной. В группах сцепления гены располагаются в линейной последовательности, как и участки внутри генов (см. гл. 16).

4. Свойство непрерывности генетического материала проявляется наряду со свойством дискретности. Дискретные единицы — гены, маркированные мутациями, позволяют строить линейные карты групп сцепления, в которых можно последовательно пере-

ходить от мутации к мутации, от гена к гену. Между генами не обнаруживается каких-либо негенетических элементов, чуждых функций хромосом как носителей наследственной информации. В дальнейшем мы обратимся к системе регуляторных элементов, влияющих на активность генов, некоторые из них действуют на ген на значительном расстоянии в той же хромосоме (см. гл. 17), изменяя структуру хроматина. Перенос гена в новое окружение при хромосомных перестройках может менять выражение гена (см. гл. 13). Все это подчеркивает непрерывность генетического материала.

Эти четыре универсальных свойства генетического материала можно выявить у любого организма. В основе их лежат свойства ДНК — линейного полимера, молекулы которого имеют дискретные размеры. Каждая хромосома — это непрерывная молекула ДНК, способная к воспроизведению при наличии в ней участка (или участков) — начала репликации. Генная дискретность выражается благодаря различному чередованию нуклеотидов в разных участках ДНК, а также благодаря специфическим сигналам — сочетаниям нуклеотидов, обозначающим начало и конец считывания генетической информации, т. е. благодаря определенным регуляторным последовательностям (см. гл. 16, 17).

В то же время следует помнить, что все перечисленные свойства генетического материала существуют в диалектическом единстве. Их нельзя отрывать друг от друга и изучать изолированно. Так, например, свойства дискретности и непрерывности составляют некую общую характеристику носителей наследственной информации. Дискретные единицы — гены — составляют единое целое в виде группы сцепления — хромосомы — и входят в общую систему более высокого порядка — систему генома, систему функционирующих генов различных клеток многоклеточного организма и т. д.

Представление об универсальных свойствах генетического материала восходит к принципам рассмотрения «законов наследственности», которые сформулировал М. Е. Лобашев (1967)¹.

11.2. Элементы парасексуального цикла и клеточная инженерия

Поиски единства в разнообразии процессов и законов живой природы приводят к представлениям о биохимической универсальности, т. е. о сходстве многих путей метаболизма и молекулярных структур у разных объектов и к представлениям об универсальности клеточного строения организмов. Поэтому область *сравнительной генетики*, изучающей особенности организации и функционирования генетического материала разных таксонов, делает возможными не только теоретические обобщения, но и позволяет переносить способы обмена генетической информацией, найденные у

¹ Лобашев М. Е. Генетика. 1967. С. 149—151.

одних организмов, на другие. То, что является исключением из правил в одной таксономической группе, становится правилом в другой. Более того, подобные «исключения» в руках экспериментатора превращаются в новые методические подходы. Достаточно вспомнить нерегулярные типы полового размножения у растений и животных и их использование для решения экспериментальных и практических задач (см. гл. 8).

Как мы знаем из гл. 8, парасексуальный цикл в полном объеме свойствен мицелиальным грибам. Элементы парасексуального процесса встречаются у многих эукариот. Широко распространен в природе митотический кроссинговер, так же как явление нерасхождения и потери хромосом. С потерей хромосом в митозе мы ознакомились на примере возникновения билатерального гинандроморфа у *D. melanogaster* (гл. 5). Подобные потери хромосом могут происходить не только при первом дроблении зиготы, но и на более поздних стадиях развития. Тогда генетически различающиеся ткани у дрозофилы будут представлены не симметричными половинами тела, а более дробными участками. Получение таких мозаичных особей используют в генетике индивидуального развития для установления времени детерминации клеток, участвующих в формировании тех или иных органов насекомого (см. гл. 17).

Как было показано в предыдущей главе, элементы парасексуального цикла встречаются и у немцелиальных грибов, например у дрожжей. У этого объекта они находят применение в экспериментах по цитодукции, которую успешно используют для изучения рекомбинации ядра и митохондрий, для получения ядерно-цитоплазматических гибридов. Более того, цитодукцию применяют для переноса отдельных хромосом у того же объекта. Как показали Т. Нильссон-Тилгрэн и др., при образовании цитодуктантов изредка происходит передача отдельных ядерных групп сцепления. Это явление используют для «похромосомной» гибридизации: получают гибриды, имеющие необычный набор хромосом: $n + 1$, в котором весь набор гаплоиден, за исключением одной пары. С помощью селективных маркеров, такие «гибриды» сравнительно легко отобрать. В дальнейшем использование митотического кроссинговера и потеря того или другого из пары гомологов позволяют получить гаплоиды с замещением отдельных хромосом или их участков. Это шаг на пути к направленному изменению генома, которое трудно осуществить при обычных способах гибридизации и расщеплении. Обилие вариантов, возникающих при мейотическом расщеплении, не поддается строгому контролю из-за невозможности маркировать все хромосомы и участки рекомбинации.

Элементы парасексуального цикла успешно используют для картирования генов человека, контролирующими определенные этапы клеточного метаболизма. Очевидно, что человек — неудобный генетический объект по меньшей мере из-за невозможности проведения у него гибридологического анализа в классической форме

(подробнее см. гл. 21). Тем не менее картирование его генов, особенно аномальных, диктуется потребностями общей и медицинской генетики.

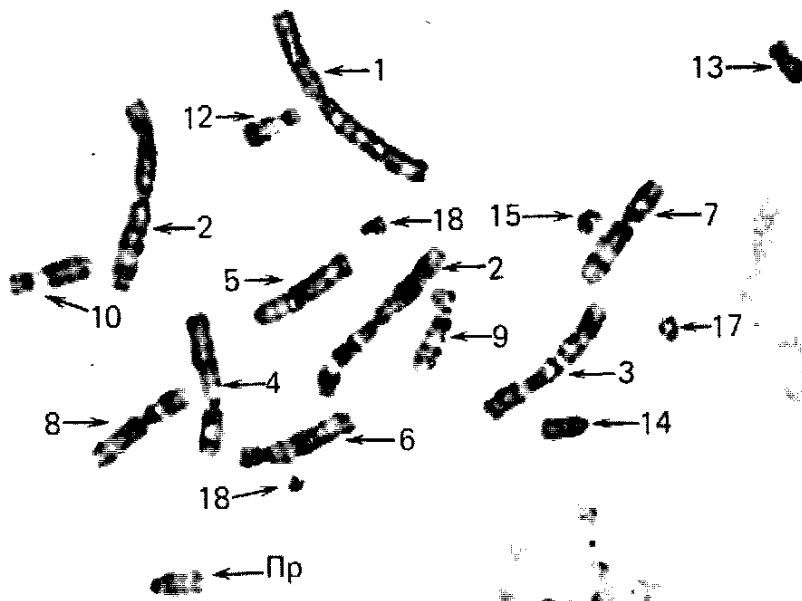
Соматические клетки одного вида животных, культивируемые на искусственных средах вне организма, оказалось возможным гибридизовать не только между собой, но и с клетками животных другого вида, например мыши и китайского хомячка (рис. 11.1). Так же гибридизуют клетки человека и мыши.

Мышь — объект, в генетическом отношении гораздо лучше изученный, чем человек. У нее доступно значительное число маркеров по генам, контролирующим пути метаболизма. Гибриды соматических клеток получают, стимулируя их слияние воздействием гемагглютинирующего *вируса Сендай* и полиэтиленгликоля. При этом гибридизация достигает 25—30 % от общего числа клеток. На первой стадии возникают гетерокарионы, в которых с частотой около $1 \cdot 10^{-4}$ сливаются ядра — образуются синкарионы. Если синкарионы возникли от слияния *гетероплоидных* (т. е. с нерегулярным числом хромосом) и диплоидных клеток, то в дальнейшем хромосомы одного или обоих родителей постепенно теряются.

Если в хромосомах мыши имеются рецессивные биохимические маркеры (ауксотрофность, устойчивость и т. д.), то изучают параллельно цитологические характеристики и фенотипические признаки в процессе клонирования гибридов. Потеря определенной хромосомы человека, сопровождаемая проявлением рецессивного маркера мыши, указывает на локализацию гомологичного гена в определенной хромосоме человека. Так, например, был впервые локализован ген тимидинкиназы в 17-й хромосоме человека.

Для отбора нужных клонов гибридных соматических клеток применяют селективные среды. Для идентификации многих белков используют технику электрофореза, позволяющую различать гомологичные белки человека и мыши. Таким образом локализуют гены в определенных хромосомах.

Методы *гибридизации соматических клеток*, или *парасексуальную гибридизацию*, все шире применяют и в генетике растений. В этом случае сливают не соматические клетки непосредственно, а их протопласты, предварительно лишенные оболочек, которые удаляют ферментативным путем. При этом способе гибридизации также удается преодолевать не только межвидовые, но и межродовые барьеры нескрещиваемости. Благодаря возможности получения недифференцированной массы растущих клеток — каллуса (рис. 11.2) и последующей его дифференцировки получают целые гибридные растения. Однако при этом, как показал Ю. Ю. Глеба, отдаленные гибриды не всегда способны к нормальному морфогенезу и часто оказываются стерильными. Успех такого эксперимента тем менее вероятен, чем дальше в таксономическом отношении отстоят друг от друга скрещиваемые формы. На рис. 11.3 показан соматический гибрид между двумя крестоцветными: *Arabidopsis thaliana* и *Brassica rapa*, названный автором (Ю. Ю. Глеба) *Ara-*



А



Б

Рис. 11.1. Метафазные пластинки (фото Т. Н. Игнатовой, Т. М. Гринчук и Е. А. Сорокина): А — фибробласта легкого китайского хомячка линии V-79RIK; Б — мышинной гепатомы линии МГ ХХIIа; В — гибридной клетки, образовавшейся при их слиянии.

Цифры — номера хромосом. Стрелки указывают на хромосомы мыши



Рис. 11.1. Продолжение.

bidobrassica. Такой соматический гибрид образует крайне аномальные побеги. Подобные «монстры» могут служить для изучения закономерностей морфогенеза и совместимости геномов различных видов. Наконец, многие отдаленные гибриды такого типа могут возникать только при искусственной гибридизации соматических клеток, но не при помощи естественного полового процесса.

Соматическая гибридизация открывает большие перспективы для получения нового исходного материала для селекции. В лаборатории Р. Г. Бутенко созданы соматические гибриды культурного и дикого картофеля (*Solanum tuberosum* × *S. chacoense*). Для декоративного цветоводства представляют интерес соматические гибриды Дж. Пауэра между видами *Petunia parodii* и *P. parviflora*, которые половым путем не скрещиваются. Этот прием позволил ввести в селекцию признак «разветвленный, стелющийся побег» от *P. parviflora*. Х. Шенк получил соматический гибрид между капустой (*Brassica oleracea*) и турнепсом (*B. campestris*).

Для изучения закономерностей функционирования дифферен-

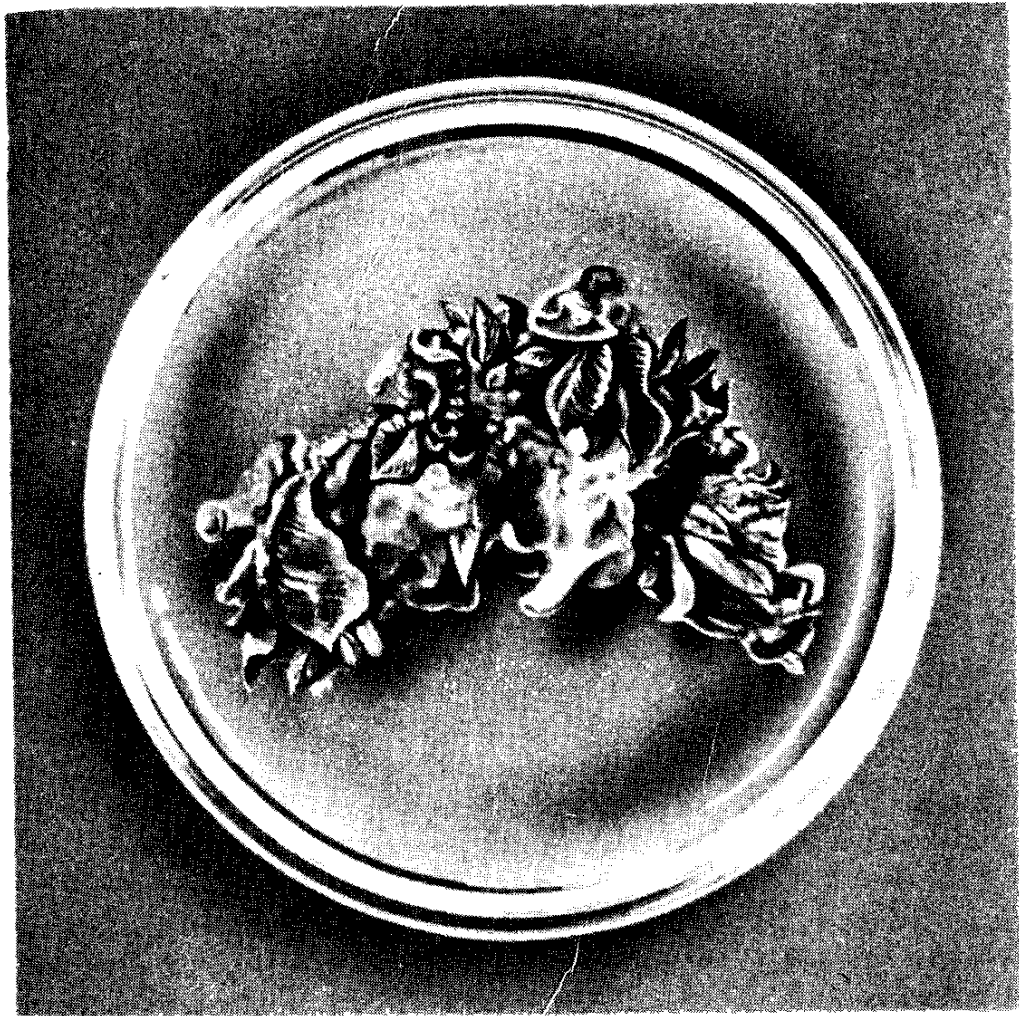


Рис. 11.2. Каллусная ткань табака, растущая на искусственной среде, и растения-регенеранты, возникающие на каллусе (фото Л. А. Лутовой)

цированных клеток пересаживают ядра из соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки животных. Образуют также гибриды между раковыми и нормальными клетками. Такой подход широко применяют при получении так называемых *моноклональных антител* на основе выращивания *гибридом*. Как известно, специфические антитела в ответ на введение в организм животного антигена (чаще всего чужеродного белка или полисахарида) вырабатываются определенными клонами клеток иммунной системы. Эти клетки, извлеченные из селезенки иммунизированного животного, сливают с клетками меланомы — одного из типов злокачественной опухоли. В результате образуются гибридомы, которые объединяют качества обеих родительских форм: от клетки иммунной системы — способность вырабатывать определенные антитела, а от клетки меланомы — способность неограниченно долго делиться в культуре (рис. 11.4).

Разработка техники получения моноклональных антител дает нам в высшей степени специфичные реагенты, «узнающие» не просто тот или иной тип макромолекул, но и их индивидуальные особенности. Это находит применение в медицине, промышленности, выпускающей ферментные препараты.

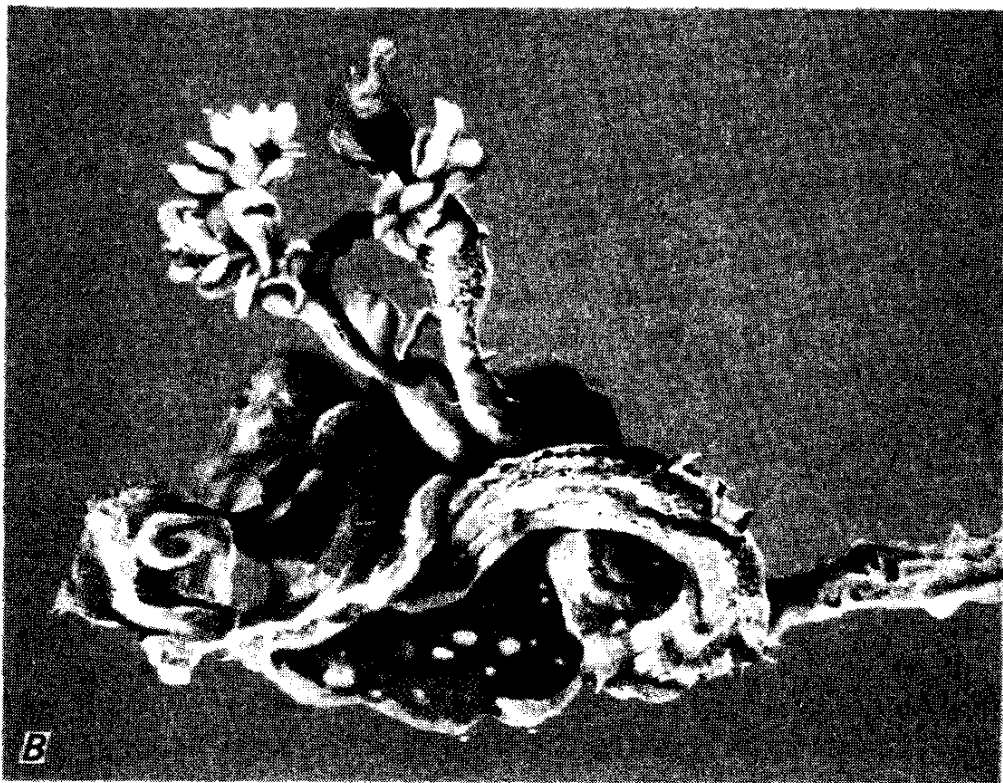
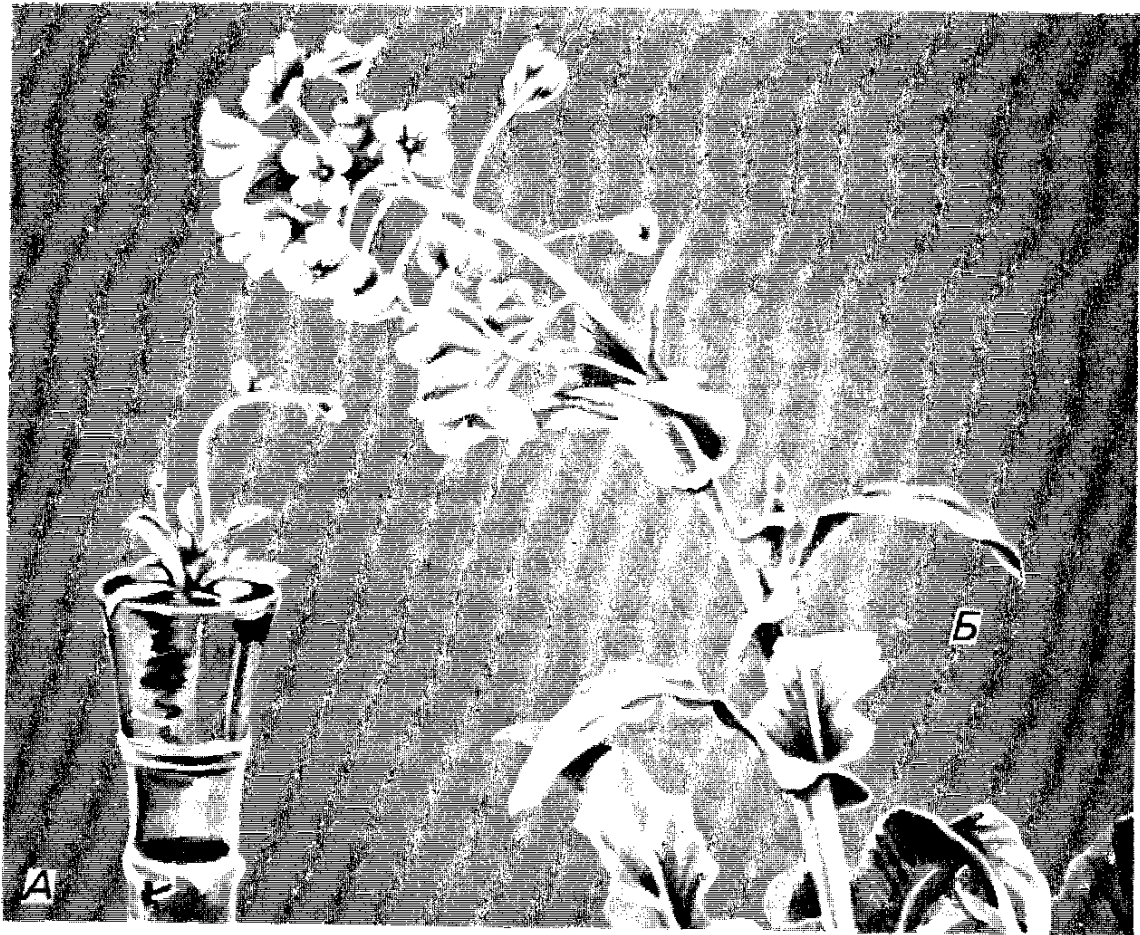


Рис. 11.3. Соматическая гибридизация у растений (с фото Ю. Ю. Глебы): А — растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*); Б — турнепса (*Brassica rapa*); В — их соматический гибрид *Arabidobrassica*

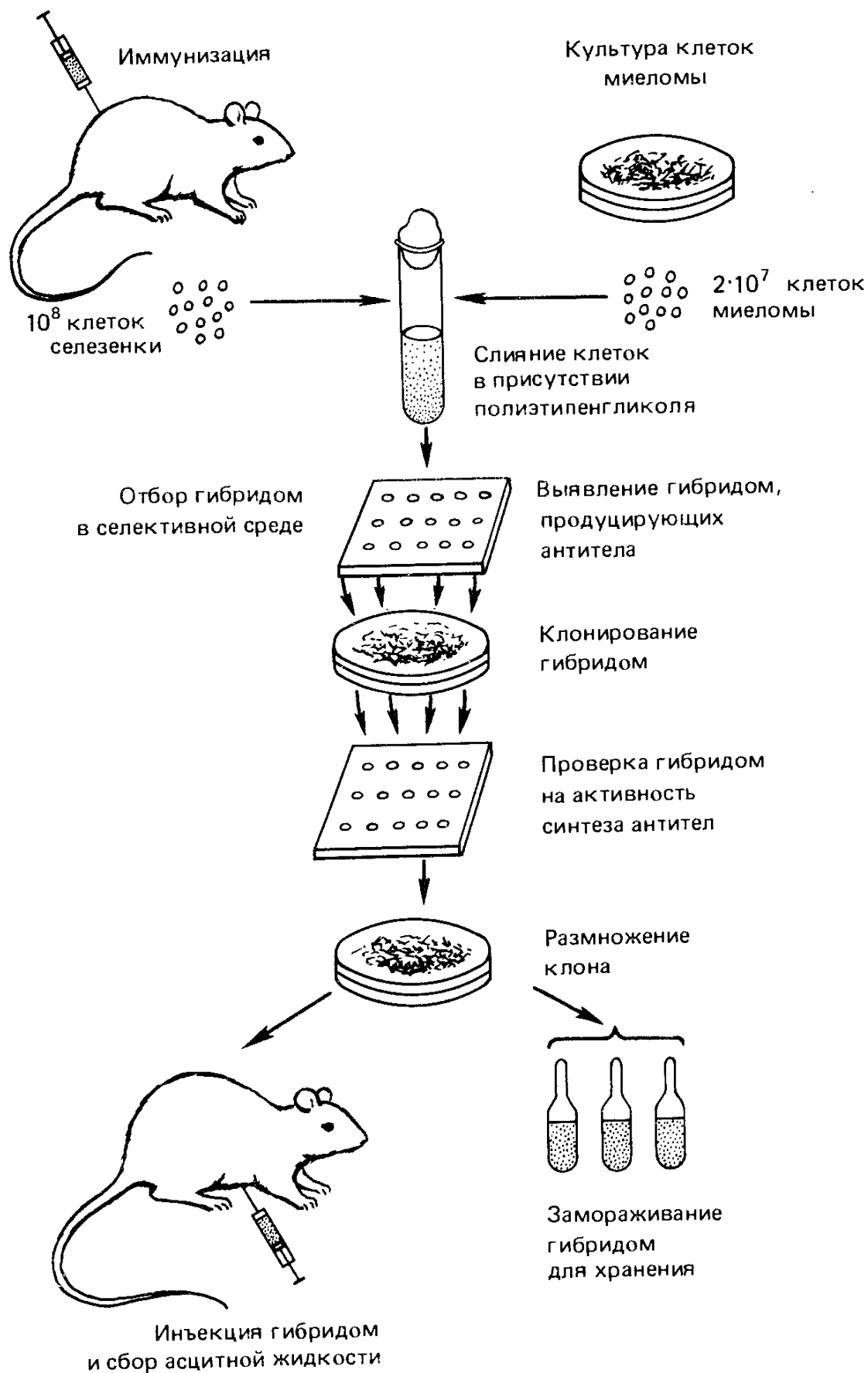


Рис. 11.4. Схема получения моноклональных антител на основе гибридом (по С. М. Гершензону, 1983)

Удается не только слияние соматических клеток, но и реконструкция целых клеток из их отдельных компартментов. Так, можно энуклеировать клетки млекопитающих, воздействуя на них цитохалазином В — веществом, которое вырабатывает гриб *Helminthosporium dematioideum*. Цитохалазин вызывает выталкивание ядер из клеток. В результате такой обработки образуются безъядерные клетки — *цитопласты* и свободные ядра, окруженные тонким слоем цитоплазмы, — *кариопласты*. Цитопласты можно сливать с нормальными клетками, получая ядерно-цитоплазматические гибриды, или *цибриды*. Этот метод — аналог цитодукции для соматических клеток млекопитающих и позволяет изучать взаимоотношения ядерных и неядерных генов. Таким способом была продемонстрирована митохондриальная природа устойчивости к хлорамфениколу у соматических клеток мышцы.

Свободные ядра и цитоплазму удается перекомбинировать у простейших и амфибий. Ядерные эритроциты птиц сливаются с энуклеированными клетками млекопитающих при обработке вирусом Сендай. Поскольку при таком воздействии эритроциты лизируются, клетка фактически реконструируется из ядра эритроцита и цитопласта млекопитающего. В результате слияния ядро эритроцита птицы (курицы), ранее неактивное, начинает функционировать в цитоплазме млекопитающего (мышь): синтезируется РНК, появляются ядрышки, иногда наблюдается синтез ДНК. Правда, жизнеспособность таких реконструированных клеток сохраняется недолго — около трех дней. Получают и реконструированные клетки млекопитающих путем слияния карио- и цитопластов. В последнее время разрабатываются методы микроинъекций в клетки с помощью «теней» эритроцитов — мембран эритроцитов, лишенных содержимого, или так называемых мембранных пузырьков — замкнутых фрагментов клеточной мембраны, а также других искусственных и природных носителей. Используя подобные носители, в клетку можно вводить лекарства, красители и даже целые хромосомы.

Эксперименты по реконструкции клеток открывают новые перспективы как для изучения биологии клетки, так и для разработки новых методов терапии на клеточном уровне.

11.3. Трансформация и генная инженерия

Открытие трансформации у бактерий и особенно идентификация ДНК как трансформирующего агента стимулировали попытки трансформации у животных, растений и эукариотических микроорганизмов. При этом попытки провести трансформацию с помощью препаратов тотальной геномной ДНК привели к противоречивым результатам. Только в конце 70-х годов были получены воспроизводимые результаты с применением так называемой *векторной трансформации*.

В основе этого подхода — использование *векторных молекул*, или векторов, в качестве которых применяли плазмиды сначала

бактериальных, а затем эукариотических клеток. *Векторы* — это молекулы ДНК, способные переносить включенные в них гены в клетку, где эти молекулы реплицируются автономно или после интеграции с геномом. Решающую роль в этих экспериментах сыграли также методы получения индивидуальных генов, наработка их препаративных количеств путем *клонирования*, т. е. практически неограниченного размножения в бактериальных клетках. В ходе разработки этих процедур была создана мощная техника *генной инженерии*, включающая: выделение индивидуальных фрагментов ДНК любого происхождения, их стабильное воспроизведение в составе *векторов*, идентификация функций клонированных таким образом генов, их изменение и введение в клетки исходного или иного организма. Эта техника, получившая также название техники *рекомбинантной ДНК*, в соединении с методами расшифровки первичной структуры генов, т. е. их нуклеотидной последовательности, сделала возможными эксперименты непосредственно на генетическом материале, манипулирование генами в научных и практических целях.

11.4. Получение генов

Первый успешный эксперимент по выделению гена, а точнее, группы генов лактозного оперона (см. гл. 17) *E. coli* был выполнен в лаборатории Дж. Беквита (1969). Для этого использовали два трансдуцирующих бактериофага λ и φ 80, включившие *lac*-оперон в свои геномы в противоположной ориентации по отношению к собственным генам (рис. 11.5). Напомним, что фаги λ и φ 80 близки по структуре генома (см. гл. 9).

У обоих фагов одна цепь ДНК отличается от другой по плавучей плотности. Благодаря этому после плавления ДНК этих бактериофагов тяжелую и легкую цепи можно разделить при помощи центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Если теперь взять только тяжелые цепи ДНК, то благодаря тому, что *lac*-оперон был включен в геномы λ и φ 80 в противоположных ориентациях, лишь один участок этих цепей будет иметь комплементарные последовательности оснований. Это участок ДНК *lac*-оперона. Тогда при гибридизации тяжелых цепей получается совершенный дуплекс только на участке *lac*-оперона, а остальные части цепочек останутся неспаренными (рис. 11.6, А). Их удаляли действием нуклеазы, специфичной к однонитевой ДНК, и таким образом получили ДНК генов лактозного участка *E. coli* в чистом виде (рис. 11.6, Б). Эксперимент Дж. Беквита и других принято считать началом генной инженерии. Поскольку подход к выделению *lac*-оперона весьма специфичен для бактерии *E. coli*, его сменили другие приемы, применимые в работе с любыми организмами.

Главную роль на первом этапе выделения гена отводят *эндонуклеазам рестрикции*, или *рестриктазам* (см. гл. 9). Эти ферменты

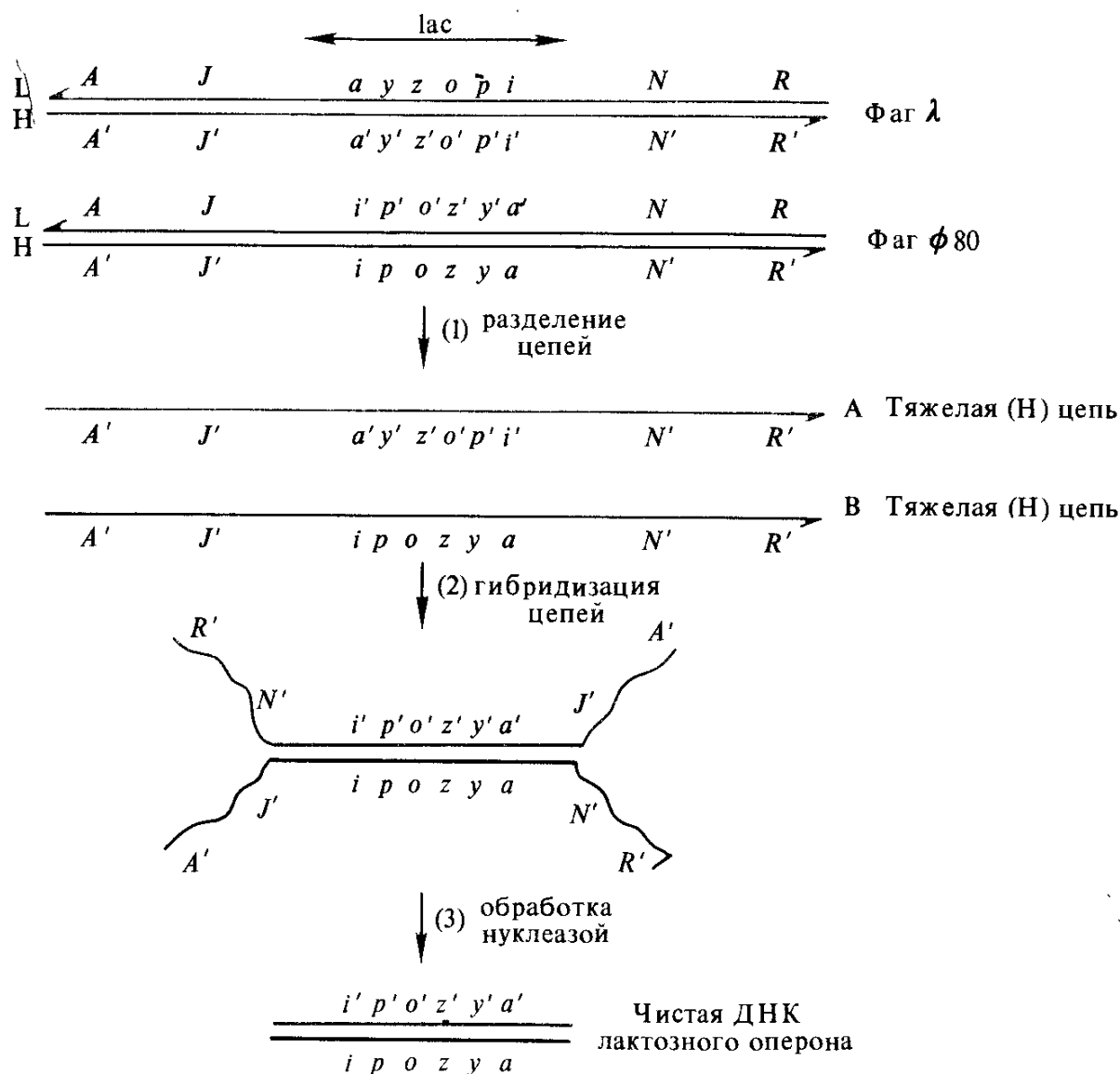


Рис. 11.5. Выделение генов лактозного участка (*lac*-оперона) *E. coli* (по J. Shapiro et al., 1969)

разрезают ДНК вблизи или внутри определенных последовательностей нуклеотидов (табл. 11.1), которые одинаковы на обеих комплементарных цепях. Два разрыва в одинаковых позициях комплементарных цепей на концах фрагмента образуют так называемые *липкие концы*, которые могут вновь замыкаться благодаря комплементарности оснований. Последовательности, узнаваемые рестриктазами, статистически разбросаны по геному. Чем короче последовательность, тем чаще она встречается и соответственно тем короче фрагменты ДНК, образующиеся при рестрикции. Фрагменты рестрикции, или рестрикты, можно разделить по их молекулярной массе и заряду при помощи электрофореза в геле. В настоящее время из различных микроорганизмов выделено множество рестриктаз с неодинаковой специфичностью по отношению к нуклеотидным последовательностям ДНК.

Отыскание нужного гена среди смеси рестрикционных фрагментов представляет известные сложности, о чем речь пойдет далее. Наряду с этим наиболее распространенным способом получе-

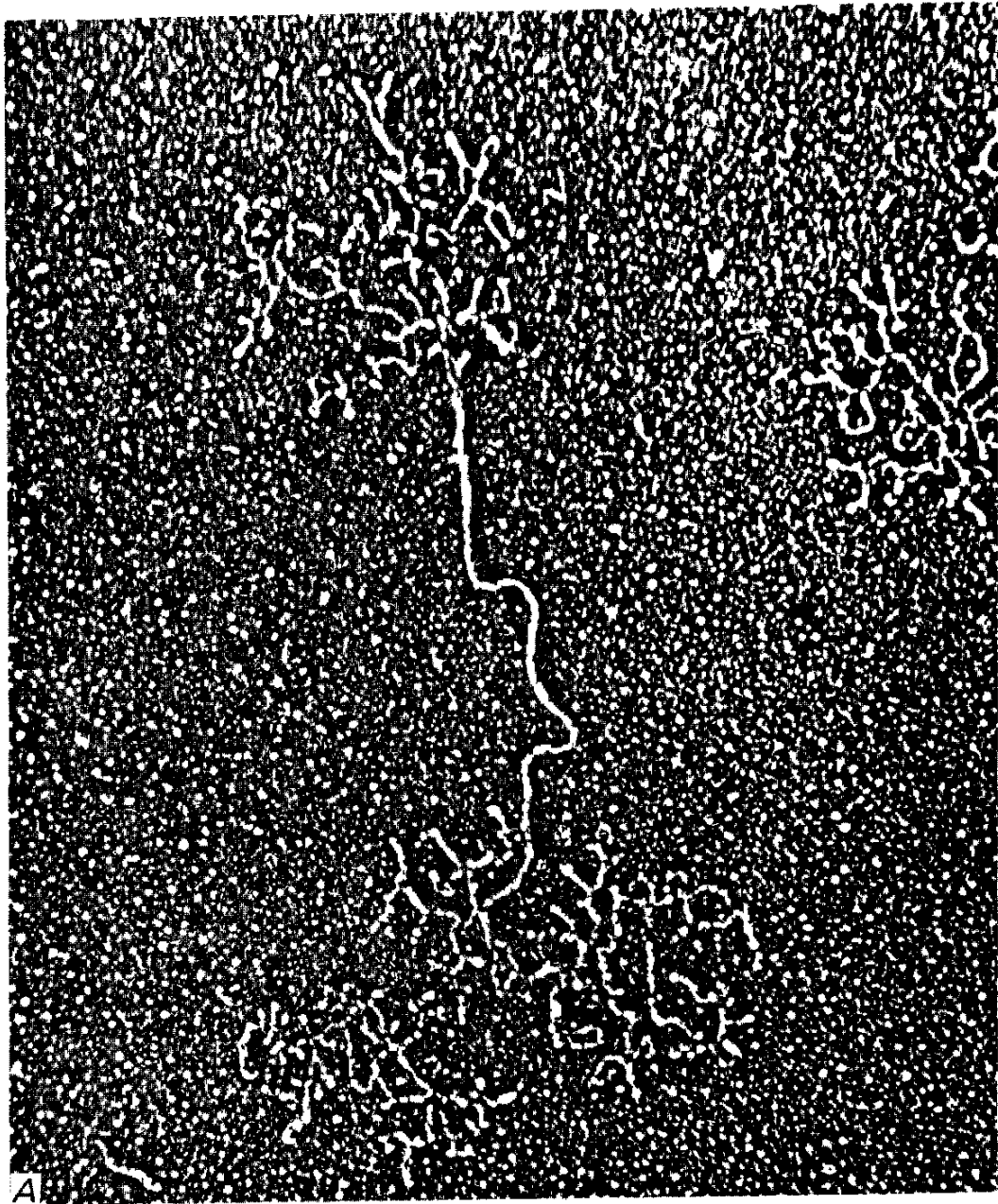
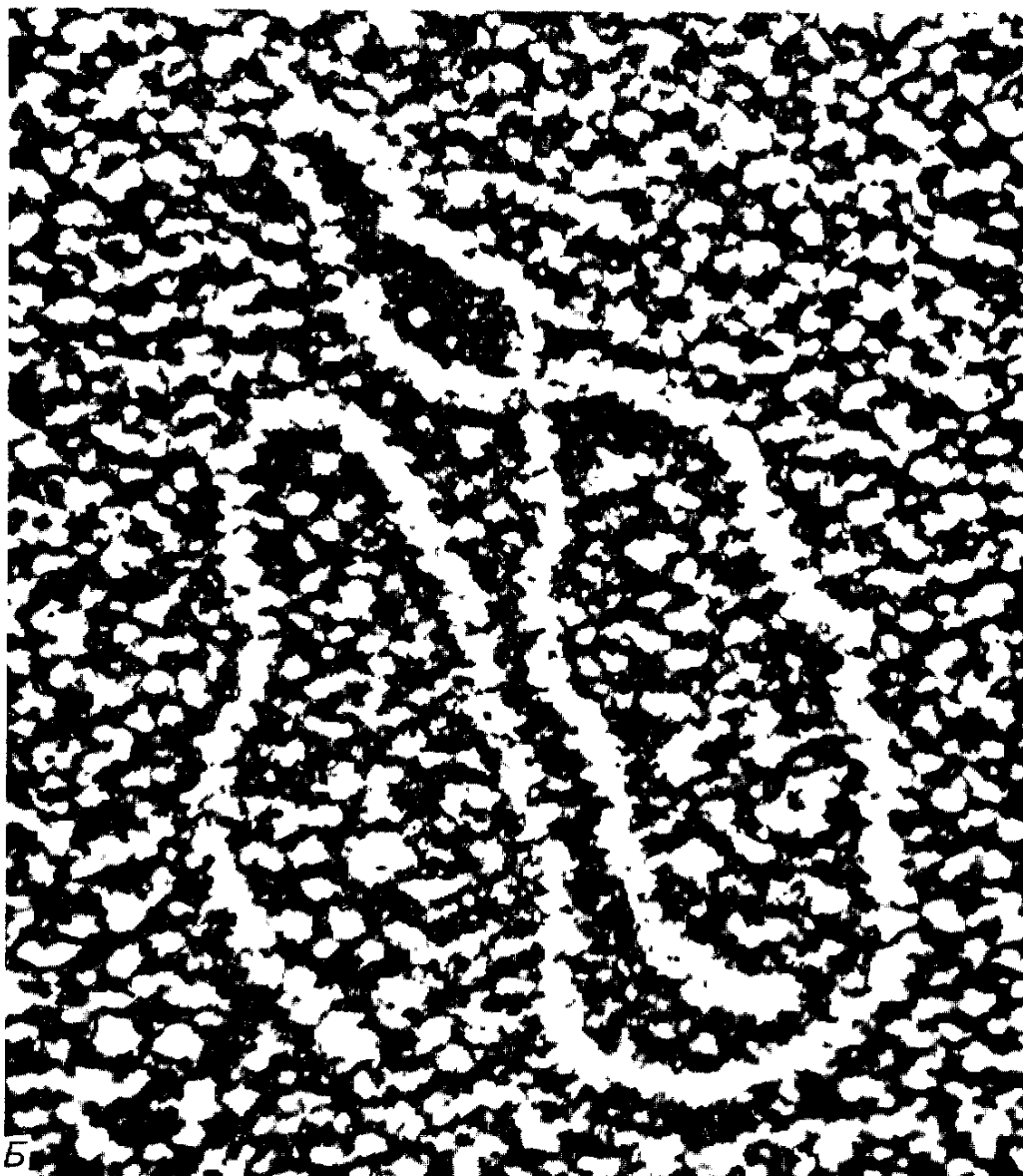


Рис. 11.6. ДНК *lac*-оперона (J. Shapiro et al., 1969). А — результат гиб последовательности лактозного участка. Видны неспаренные одноцепочечных одноцепочечных «хвостов»

ния генов существует также способ химического *синтеза генов*. Методология синтеза ДНК с заданной последовательностью нуклеотидов была разработана Г. Кораной в 60-х годах, еще задолго до наступления эры генной инженерии. После того как была расшифрована первичная структура первой индивидуальной нуклеиновой кислоты — аланиновой тРНК дрожжей, Г. Корана с сотрудниками синтезировал химическим путем кодирующую часть гена для этой РНК размером в 77 п. н. В дальнейшем в 1976 г. в той же лаборатории был синтезирован ген тирозиновой тРНК *E. coli*, который работал, будучи введенным в геном бактериофага Т4, в клетках кишечной палочки.

Методология, разработанная Г. Кораной, широко применяется для синтеза целых искусственных генов, например генов челове-



ридизации тяжелых цепей λ и ϕ 80, содержащих комплементарные почечные «хвосты»; Б — дуплекс *lac*-генов, освобожденный от неспарен-

ческого гормона *инсулина*, вводимых затем в бактериальные или дрожжевые клетки-продуценты. В настоящее время существуют автоматы для синтеза ДНК заданной последовательности. Те же подходы применяют для синтеза так называемых *ДНК-зондов*, т. е. небольших участков генов (20—30 п. н.). Это возможно, если известна хотя бы часть первичной структуры нужного белка. Тогда, пользуясь таблицей генетического кода (гл. 16), можно вывести структуру соответствующего участка гена. Такие зонды используют для поисков нужной комплементарной им иРНК.

Выделенную при помощи зонда иРНК используют затем для синтеза так называемой *кДНК* (комплементарной ДНК) с помощью фермента *обратной транскриптазы*, о которой упоминалось в гл. 10.

Таблица 11.1. Некоторые эндонуклеазы рестрикции — рестриктазы, образующие фрагменты с липкими концами (из В. И. Таяшина, 1979)

Фермент	Узнаваемый участок (5' → 3')	Могут соединяться с фрагментами, образованными
Ava I	C↓PyCGPuG	Sal I, Xho I, Xma I
Bam HI	G↓GATTC	Bgl II, Mbo I
Bgl II	A↓GATCT	Bam HI, Mbo I
Eco RI	G↓AATTC	Eco RI*
Eco RII	↓CC ^A GG T	
Eco RI*	↓AATT	Eco RI
Hae II	PuGCGC↓Pu	
Hpa I	GCG↓C	
Hind III	A↓AGCTT	
Hinf I	G↓ANTC	
Hpa II	C↓CGG	Taq I
Mbo I	↓GATC	
Pst I	CTGCA↓G	
Sal I	G↓TCGAC	Ava I, Xho I
Taq I	T↓CGA	Hpa II
Xba I	T↓CTAGA	
Xho I	C↓TCGAG	Ava I, Sal I
Xma I	C↓CCGGG	Ava I

Примечание. Стрелки указывают точку разрыва; показана только одна цепь ДНК; Pu и Py — любое пуриновое и пиримидиновое основания соответственно. Название рестриктазы образуют из первой буквы родового и двух первых букв видового названия продуцента, добавляя к ним сокращенное наименование системы рестрикции, если в продуценте их несколько, или наименование нехромосомного элемента, кодирующего данную рестриктазу. Например, Eco RI — *E. coli* с фактором RI или Hind III — *Haemophilus influenzae*, штамм d рестриктаза III.

Химический и энзиматический синтез генов имеет определенные преимущества перед их поисками среди рестрикционных фрагментов. Тем не менее они имеют и недостатки, поскольку синтетические гены чаще всего лишены ряда регуляторных элементов (гл. 17), необходимых для их полноценной экспрессии.

11.5. Клонирование генов. Векторы

Для выделения нужного фрагмента ДНК в препаративных количествах его необходимо встроить в плазмиду — *вектор*, вскрытую той же рестриктазой, которую использовали для получения рестриктов геномной ДНК. В качестве векторов служат плазмиды, несущие гены устойчивости к антибиотикам. На первых этапах развития генной инженерии применяли естественные плазмиды *E. coli*, например pSI101 или ColE1. В настоящее время работают с искусственными рекомбинантными плазмидами, которые несут два или три гена устойчивости, в которых содержат по одному уникальному сайту рестрикции для какой-либо рестриктазы. Это плазмиды pBR322, 324, 325 и др.

Например, широко распространенная плазида pBR322

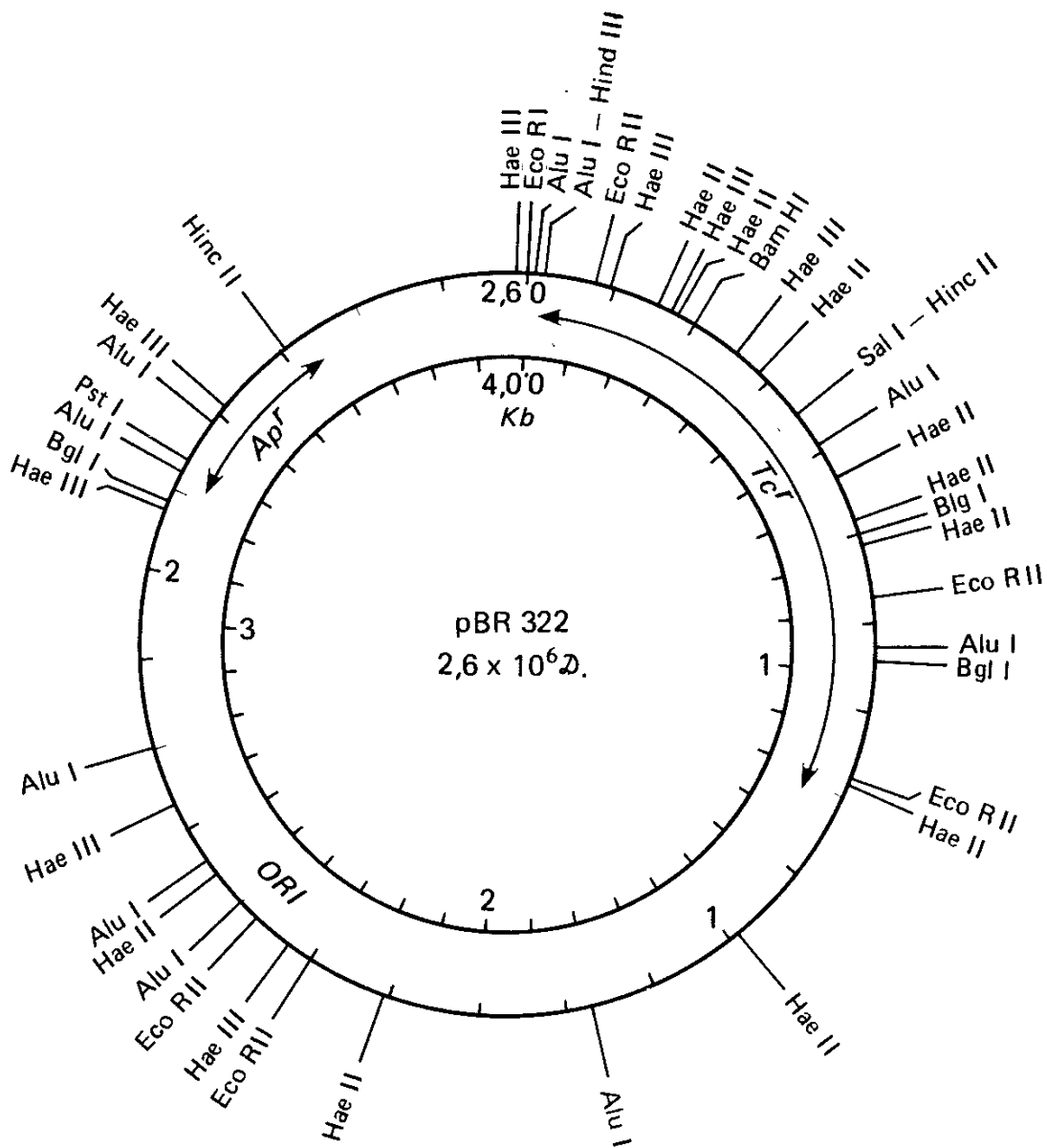


Рис. 11.7. Структура плазмиды pBR 322.

На внешнем круге показаны различные сайты рестрикции (цифры — единицы измерения молекулярной массы в 1×10^6 Д), на внутреннем — расстояния в тысячах пар нуклеотидов. Ap^r и Tc^r — устойчивость к ампициллину и тетрациклину соответственно, ORI — начало репликации

(рис. 11.7) несет гены устойчивости к ампициллину (Ap^r) и тетрациклину (Tc^r). В гене Ap^r находится уникальный сайт для рестриктазы PstI, а в гене Tc^r — для BamHI. Вскрывая вектор pBR322 по сайту BamHI в гене Tc^r , в него можно встроить фрагменты, полученные при помощи той же рестриктазы за счет взаимодействия липких концов. Ковалентное соединение вектора и клонируемого фрагмента завершает полинуклеотидлигаза *in vitro* или *in vivo*.

Если теперь трансформировать клетки компетентной культуры *E. coli* плазмидой pBR322 со встроенным в нее фрагментом, то трансформантов можно отобрать на среде с ампициллином. Далее необходимо их проверить по признаку устойчивости к тетрациклину. Если исходная клетка была трансформирована интактной

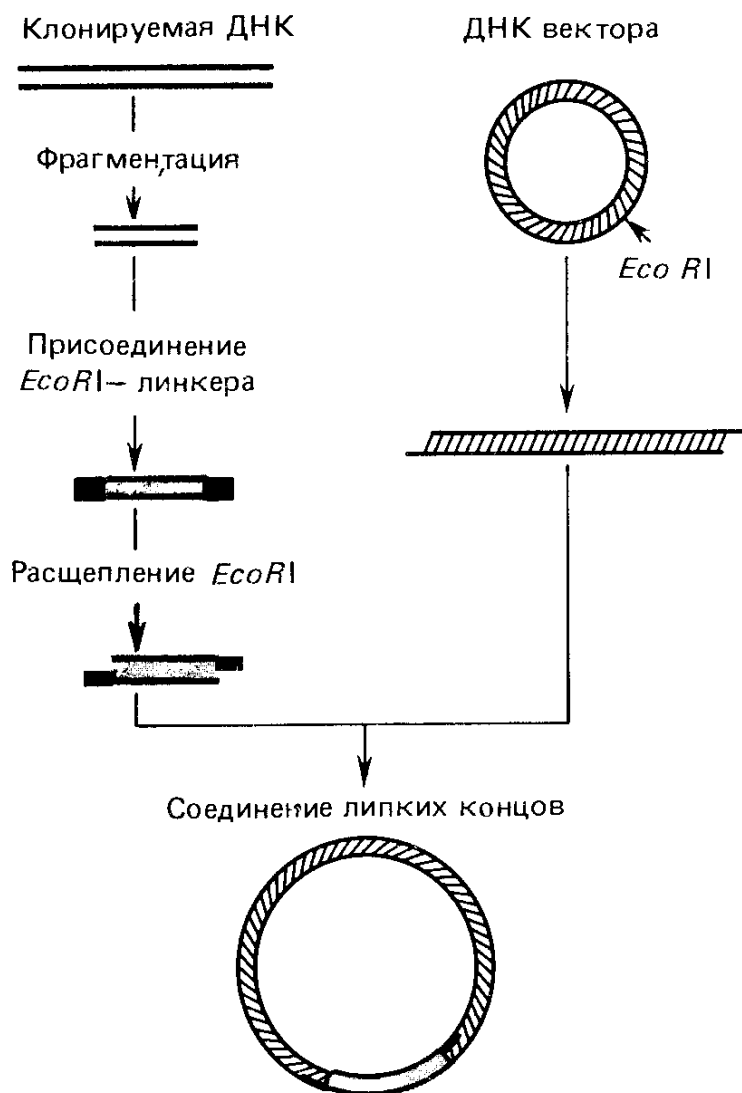


Рис. 11.8. Использование синтетических линкеров для образования липких концов и встраивания фрагмента в вектор

множения в *E. coli* и может быть заменена на чужеродный фрагмент ДНК. Если размеры получаемой при этом ДНК не превышают предела (не более чем на 10%), допустимого для упаковки в частицу фага, то образуются фаги с чужеродными фрагментами ДНК. В этом случае клонируемый участок ДНК хранят в виде частиц бактериофага или в виде клона бактерии с интегрированными гибридными профагами. Существует множество типов векторов, сконструированных на основе различных плазмид и различных бактериофагов.

Не всегда удается получить фрагменты ДНК с *липкими концами*. Эти концы могут быть «пришиты» к фрагментам ДНК искусственно, если ДНК получена при помощи рестриктазы, образующей «тупые» концы, или в результате гидродинамической фрагментации. Одну цепь таких молекул с тупыми концами наращивают за счет олигодезокси-А, а другую — за счет олигодезокси-Т при помощи *нуклеотидилтрансферазы*.

Тупые концы наращивают также за счет синтетических *линкеров* — последовательностей, «узнаваемых» определенной рестриктазой или несколькими из них (рис. 11.8). После обработки

плазмидой — без вставки фрагмента, то трансформант будет устойчив к тетрациклину так же, как и к ампициллину. Если же трансформацию осуществила плазида со вставкой фрагмента в ген *Tc^r*, трансформант должен быть чувствителен к тетрациклину, поскольку ген *Tc^r* оказался разорван и инактивирован вставкой.

Далее клонируемый фрагмент ДНК может быть неограниченно размножен в ходе клеточных делений трансформанта. Векторы типа плазмиды рВR322 называют *векторами инактивации*.

Широко применяют также *векторы на основе бактериофага λ*. Известно, что средняя часть генома λ не существенна для его литического раз-

соответствующей рестриктазой концы становятся липкими и фрагмент можно встроить в вектор, вскрытый той же рестриктазой.

11.6. Банки генов

Рассказывая о клонировании фрагмента ДНК, мы подразумевали, что нам доступен искомый ген или известна молекулярная масса фрагмента, который можно извлечь из электрофореграммы рестриктов ДНК. В действительности для получения нужного гена чаще всего необходимы поиски, и порой достаточно сложные. Для этого геномную ДНК, разрезанную выбранной рестриктазой, смешивают с ДНК вектора, вскрытого той же рестриктазой по уникальному сайту. В результате взаимодействия липких концов и последующего лигирования получают смесь рекомбинантных ДНК. После этого полученные плазмиды со вставками различных участков ДНК необходимо расклонировать.

Для этой цели описанным способом проводят трансформацию *E. coli*. Поскольку трансформацию осуществляют смесью плазмид с разными вставками, то различные клетки в результате трансформации получают разные фрагменты клонируемой ДНК. Следовательно, на этом этапе нужно собрать как можно больше клонов трансформантов, чтобы быть уверенным в том, что искомый ген находится в одном из клонов. Так создают *банки генов*, порой состоящие из десятков и сотен тысяч клонов трансформантов.

Размеры банка, необходимые для полного клонирования того или иного генома, можно определить, зная молекулярную массу генома (M), средний размер клонируемого фрагмента (m) и заданная определенную вероятность (P) того, что клонирован весь геном. Тогда объем банка, т. е. число клонов (N), равен:

$$N = \frac{M}{m} \ln(1 - P).$$

Для некоторых объектов размеры банков генов представлены в табл. 11.2.

Теперь можно приступить к поискам интересующего нас гена. Если проклонирован геном *E. coli*, то процедура сводится к «нара-

Таблица 11.2. Размер банка генов (N) разных организмов, содержащего искомый ген с различной вероятностью (P) (из Н. И. Матвиенко, по Clarke а. Carbon, 1976)

Источник ДНК	Молекулярная масса ДНК, Д	Средний размер фрагмента, Д	Размер банка (N) при P , равном		
			0,90	0,95	0,99
Бактерия — <i>E. coli</i>	$2,8 \cdot 10^9$	$8,5 \cdot 10^6$	720	940	1 440
Дрожжи — <i>Sacch. cerevisiae</i>	$1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^7$	2 300	3 000	4 600
Дрозифила — <i>D. melanogaster</i>	$1,1 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^7$	23 000	30 000	46 000
Кролик — <i>Oryctolagus cuniculus</i>	$2 \cdot 10^{12}$	$1 \cdot 10^7$	460 000	600 000	920 000

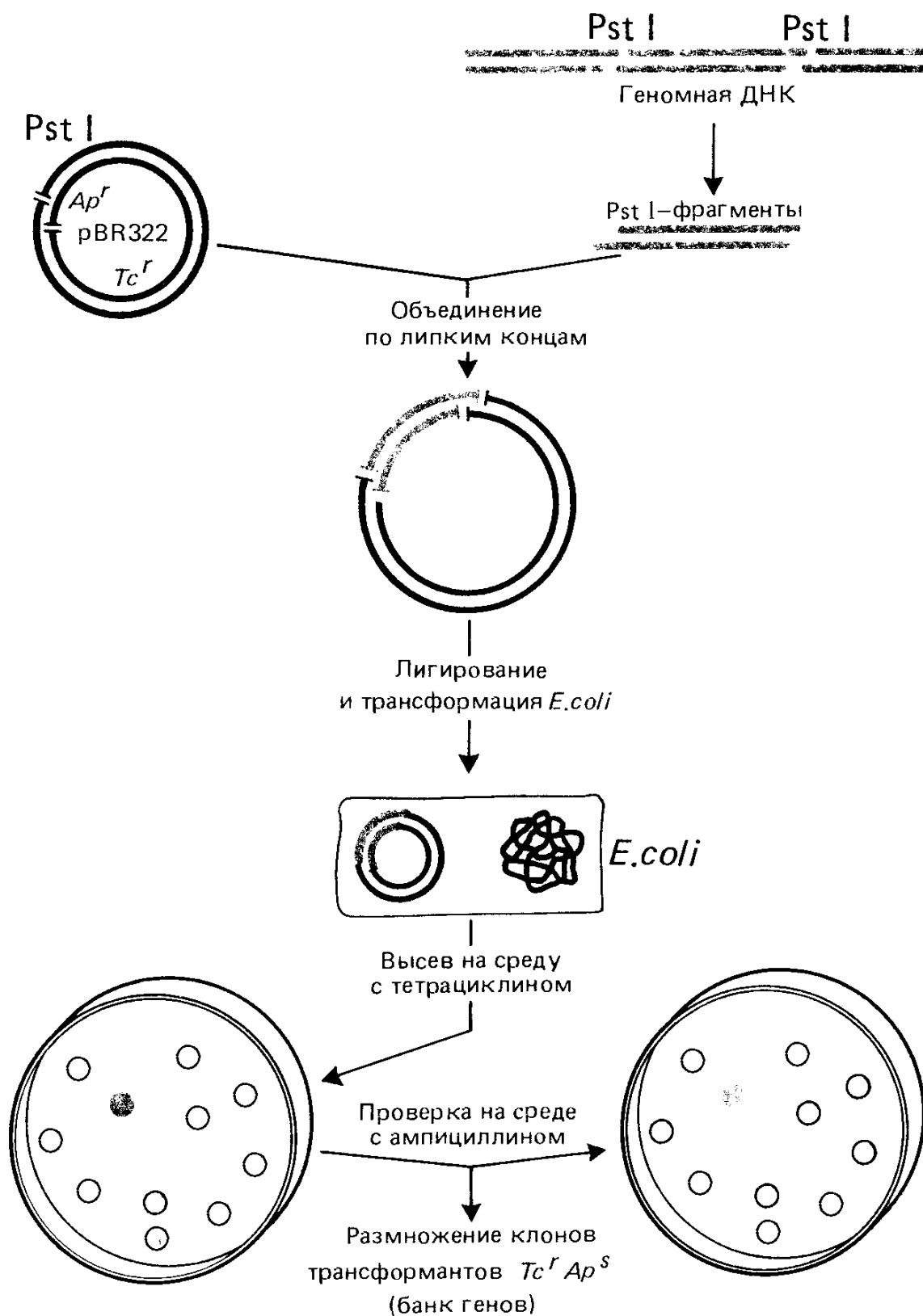


Рис. 11.9. Общая схема получения банка генов на основе плазмиды pBR 322. Отбирают колонии трансформантов, сохранившие устойчивость к тетрациклину, но утратившие устойчивость к ампициллину

ботке» клонированных фрагментов ДНК и проверке их способности трансформировать соответствующие мутанты *E. coli*. При этом необходимо иметь достаточно стабильный реципиент для трансформации, т. е. частота его ревертирования по заданному гену должна быть значительно ниже частоты трансформации. Кроме того, используемая в работе рестриктаза могла инактивировать искомый ген, если в нем был соответствующий сайт рестрикции. Поэтому может потребоваться повторение всей процедуры с другой рестриктазой. Общая схема эксперимента по клонированию геномной ДНК представлена на рис. 11.9. На практике применяется неполное переваривание геномной ДНК одной или смесью двух рестриктаз.

11.7. Трансформация эукариот

Значительно сложнее отыскать какой-либо ген в банке генов *D. melanogaster*. Для этого лучше всего точно знать, что представляет собой генный продукт. Если это фермент, то следует выяснить, какую реакцию он контролирует. Если ген экспрессируется в клетках *E. coli*, что маловероятно (см. гл. 16 и 20), то можно считать, что экспериментатору повезло. В этом случае искомый ген идентифицируют по способности компенсировать соответствующий дефект метаболизма у мутанта *E. coli*.

Поскольку гены эукариот обычно не экспрессируются в клетках прокариот, прибегают к иным методам. Используют иммунохимические методы, в частности моноклональные антитела, если белок (генный продукт) доступен и им можно иммунизировать животных. Для идентификации несущих ген клонов *по гибридизации ДНК — РНК* используют также меченую радиоактивными изотопами иРНК.

При поисках определенного фрагмента в банке генов лучше всего идентифицировать его по способности трансформировать соответствующие мутанты того организма, геном которого был клонирован.

При трансформации эукариот при помощи ДНК бактериальных плазмид необходимо учитывать, что репликаторы бактерий и их плазмид не работают в клетках эукариот. Вследствие этого такая трансформация низкоэффективна. Для того чтобы возник стабильный трансформант, необходимы два последовательных события: проникновение ДНК в клетку и ее рекомбинация с хромосомной ДНК, т. е. интеграция. Такую *интегративную трансформацию* легче провести у эукариотических микроорганизмов, для которых доступны методы селективных сред, чем у многоклеточных эукариот. Именно так были проведены первые эксперименты по трансформации дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Для этого дрожжевой ген *LEU2*, кодирующий β -изопропилмалатдегидрогеназу, был вставлен в бактериальную плазмиду ColE1 и проклонирован в *E. coli*. Этот ген *Sacch. cerevisiae* экспрессируется в *E. coli*, компенсируя аналогичный метаболический дефект бактерии. *Сферопласты дрожжей* (клетки, лишенные оболочки) трансформировали

плазмидной ДНК. Реципиентом служил штамм, несущий стабильную мутацию *Leu2*. Частота трансформации составляла 1×10^{-6} на регенерирующий сфероласт, т. е. на число клеток, которые вновь восстановили свою оболочку.

Повысить эффективность трансформации на два порядка удалось с использованием так называемой *челночной* или *гибридной плазмиды*, имеющей два репликатора: один — от ColE1 (бактериальный), а другой — от дрожжевой плазмиды размером 2 мкм (см. гл. 10). В дальнейшем в таких челночных векторах использовали репликаторы ДНК длиной 3 мкм (см. гл. 10) и ARS — последовательности, обеспечивающие репликацию хромосом (см. гл. 6). Такие векторы могут реплицироваться как в *E. coli*, так и в *Sacch. cerevisiae*. Повышение эффективности трансформации такими эписомными векторами сопровождалось высоким уровнем нестабильности трансформантов. При клонировании трансформантов в неселективных условиях 70—80 % клеток теряли плазмиду и, соответственно, вновь становились ауксотрофными по лейцину. Причины этой нестабильности и способы ее преодоления пока неясны. Находясь в клетке, такие эписомные векторы могут интегрироваться с хромосомной ДНК.

Генно-инженерное конструирование у дрожжей пошло по пути создания кольцевых плазмид с центромерами, а затем искусственных мини-хромосом, имеющих центромеру, теломеры и репликаторы (см. гл. 6). Таким образом, трансформация эукариот облегчается созданием векторов с репликаторами, специфичными

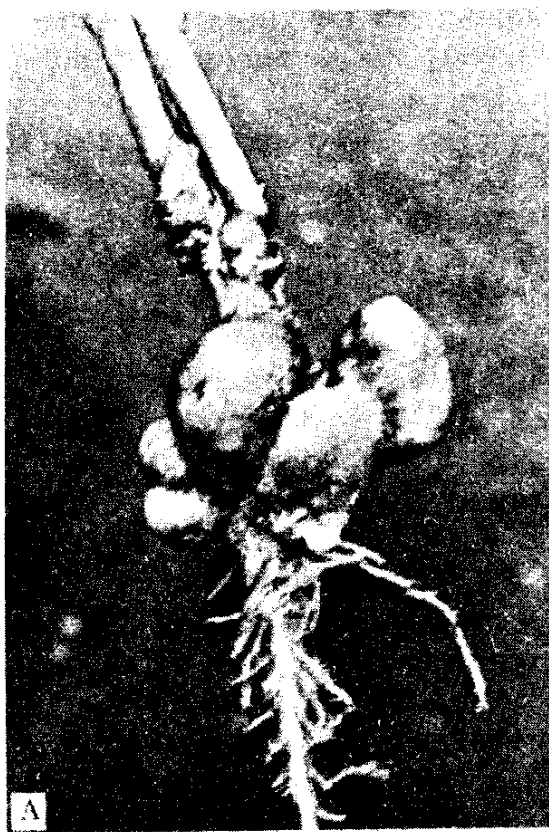


Рис. 11.10. Опухоли, вызываемые *A. tumefaciens* на корнеплоде (А) и стеблях (Б) редиса (фото А. А. Войлокова)



Рис. 11.10. Продолжение.

Б

для трансформируемого объекта. Так, высокая эффективность трансформации *D. melanogaster* по гену *ry—rosy* (у мутантов дефектна *ксантиндегидрогеназа* и глаза приобретают коричневатый цвет) была достигнута путем введения доминантной аллели ry^+ в один из мигрирующих элементов — *P*, который составляет часть системы гибридного дистенеза (см. гл. 10). От 20 до 50 % потомства мух, которым инъецировали такую ДНК в гониальные клетки, оказались трансформантами ry^+ .

Для клонирования генов и трансформации клеток животных перспективными векторами служат вирус SV40 и вирус папилломы. Эти вирусы вызывают злокачественные опухоли у грызунов. Кроме того, SV40 может заражать клетки обезьян и человека. Некоторые участки ДНК этих вирусов, составляющей 3,3—3,5 МД, могут быть deletированы без потери инфекционности и замещены на фрагменты чужеродной ДНК. Такие векторы применяют для клонирования генов в клетках животных.

11.8. Генная инженерия в природе и векторы для клонирования генов растений

Опухолевое заболевание растений, известное как *корончатый галл* (рис. 11.10), описал еще Аристотель. В начале нашего века Е. Смит и К. Таундсен (1907) показали, что вызывает это заболевание почвенная бактерия. Выделенная в виде чистой культуры *Agrobacterium tumefaciens* способна приводить к образованию опухолей у некоторых представителей голосеменных и большинства двудольных покрытосеменных растений. Клетки растительных опухолей интенсивно растут на искусственных средах и при этом не нуждаются в добавлении фитогормонов в отличие от клеток нормальных тканей.

В 70-х годах выяснилось, что причиной опухолеобразования являются так называемые *Ti-плазмиды*, обнаруженные в клетках некоторых штаммов *A. tumefaciens*. *Ti-плазмиды* — это кольцевые молекулы ДНК размером 50—80 мкм с молекулярной массой около $1,3 \cdot 10^8$ Д длиной до 200 тыс. п. н. Эти плазмиды проникают из бактерий в клетки растения, и часть ДНК *Ti-плазмиды*, так называемая *T-ДНК*, ковалентно встраивается в хромосому инфицируемого растения. Будучи интегрирована с хромосомой, *T-ДНК* вызывает образование опухоли, гиперпродукцию *фитогормонов: цитокининов и индолилуксусной кислоты (ауксина)*, а также синтез ряда производных аминокислот, объединяемых под общим термином *опины*. Опухоль возникает вследствие нарушения баланса фитогормонов, от которого зависит нормальный морфогенез растения. *Опины*, выделяемые клетками опухоли, бактерия использует в качестве источников углерода и азота, причем только в том случае, когда *A. tumefaciens* содержит *Ti-плазмиду*, заразившую клетки растения (рис. 11.11).

Ti-плазмида относится к классу *конъюгативных плазмид*, т. е. может передаваться в клетки *A. tumefaciens*, лишенные ее.

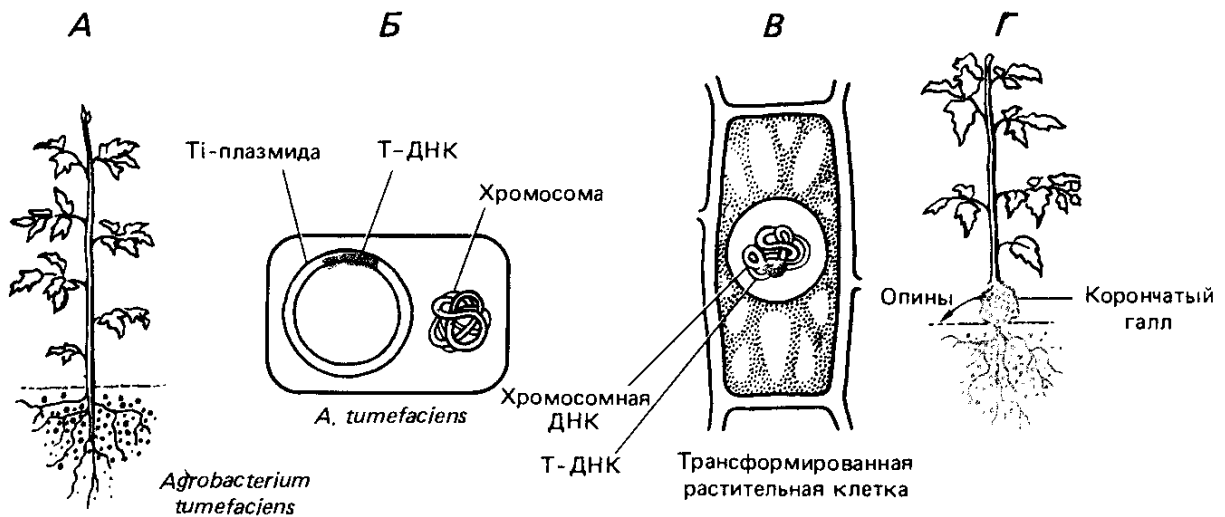


Рис. 11.11. «Генетическая колонизация» высшего растения бактерией *A. tumefaciens* (по М.-Д. Хилтон, 1983). А — *A. tumefaciens* существует в ризосфере растения; Б — в клетках бактерии наряду с хромосомой содержится Тi-плазмида; В — Тi-плазмида проникает в клетку растения и Т-ДНК встраивается в геном растения; Г — это приводит к образованию опухоли и синтезу опинов

Этот процесс эффективно происходит в зараженном растении и стимулируется опидами.

Описанные здесь взаимоотношения *A. tumefaciens* и высшего растения Дж. Шелл назвал *генетической колонизацией*, которая представляет собой эксперимент по геной инженерии, поставленный самой природой. Таким образом, Тi-плазмида — это природный вектор для трансформации клеток высших растений. Как показал Дж. Шелл, если из клеток корешков табака с интегрированной Т-ДНК получить культуру (калтус) растительной ткани, а затем целые растения-регенеранты, то при последующем генетическом анализе признак «присутствие Т-ДНК» обнаруживает менделевское расщепление.

В качестве векторов для клонирования генов и последующей трансформации растений используют две разновидности Тi-плазмид. Они различаются по типу опинов (*октопины* или *нопалины*), которые синтезируют зараженные ими растения (рис. 11.12). Клонированный ген встраивают вместо кодирующей части генов октопиринсинтетазы или нопалинсинтетазы, входящих в состав Т-ДНК. Для клонирования гена в бактерии, обычно *E. coli*, конструируют гибридные плазмиды. После заражения растения плазмидой ее Т-ДНК со встроенным геном интегрирует с хромосомной ДНК.

В настоящее время выделены и проклонированы несколько десятков генов высших растений, в том числе гены, контролирующие запасные белки: сои, ячменя, гороха, кукурузы, а также некоторые гены, контролирующие активность ферментов: алкогольдегидрогеназы и каталазы кукурузы, α -амилазы ячменя; некоторые гены хлоропласта пшеницы, шпината и др.

Первыми чужеродными генами, введенными в начале 80-х годов в высшие растения, были гены устойчивости к антибиотикам

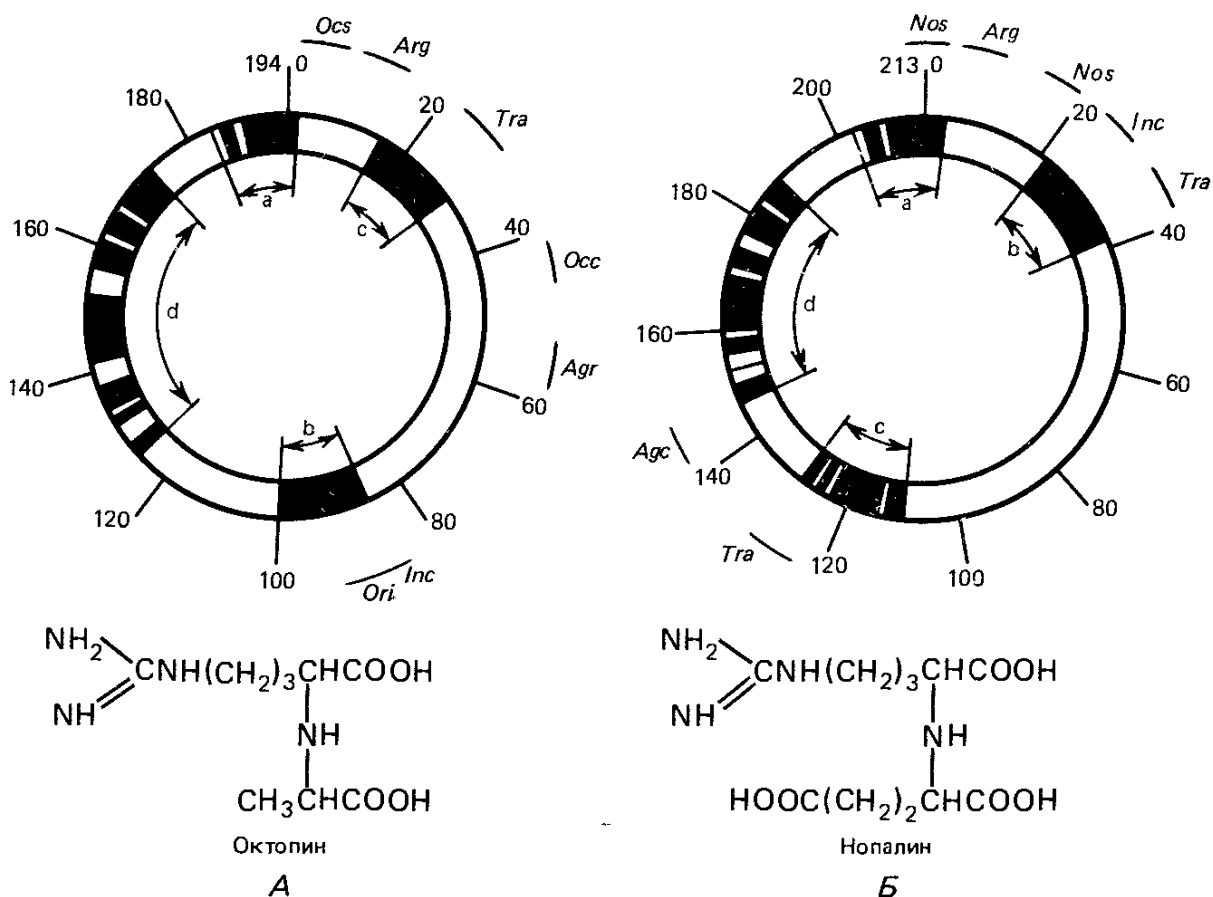


Рис. 11.12. Тi-плазмиды (по Дж. Шеллу, 1983). А — октопиновая; Б — нопалиновая.

Гомологичные участки (а — d) заштрихованы. Показаны гены *синтез*: *Ocs* — октопина, *Nos* — нопалина; *катаболизма*: *Arg* — аргинина, *Occ* — октинина, *Agr* — агропина, *Agc* — агроцинопина; *Tra* — функции переноса при конъюгации, *Inc* — несовместимости с другими плазмидами, *Ori* — начало репликации

из *E. coli*. Так, в клетки табака был передан ген устойчивости к *метатрексату* — ингибитору дигидрофолатредуктазы. В табак был введен также ген дрожжей, кодирующий *алкогольдегидрогеназу*. Этот ген устойчиво наследовался в мейозе у растений-регенерантов, полученных из каллусной ткани, но не экспрессировался в клетках растений. Ген, кодирующий β -глобин кролика, удалось интегрировать в геном табака. Он устойчиво наследовался в культуре каллусной ткани, но опять же не экспрессировался.

В клетки подсолнечника с помощью Тi-плазмиды был передан ген *фазеолина* бобов. Фазеолин — это гликопротеин, составляющий до 50 % запасного белка бобов. Будущее растение, полученное первоначально в виде каллусной массы, получило наименование *санбин* (от объединения англ. названия подсолнечника — sunflower и бобов — bean). Тот же ген фазеолина введен в табак и получены растения-регенеранты, синтезирующие менее 1 % фазеолина от общего белка растения. Получены растения табака, которые светятся в темноте благодаря экспрессии в них гена люциферазы светлячка.

Это лишь первые шаги генной инженерии растений.

11.9. Рестрикционное картирование и секвенирование

Установление точек действия различных рестриктаз позволяет проводить *физическое картирование* участков молекулы ДНК и небольших геномов (плазмид вирусов). Распределение сайтов рестрикции представляет собой своеобразный паспорт каждого фрагмента ДНК и может быть использовано для его идентификации. Принцип *рестрикционного картирования* сводится к получению перекрывающихся по размеру фрагментов, которые разделяют при помощи электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Молекулярную массу фрагментов обычно определяют, используя в качестве «свидетеля» ДНК известного размера. На электрофореграмме рестриктазы-фрагменты ДНК различают, окрашивая их бромистым этидием и просматривая гель в ультрафиолетовом свете. Применяют также радиоактивное мечение концов фрагментов с помощью *полинуклеотидкиназы* фага Т4.

Непосредственно для картирования сайтов рестрикции используют метод неполного гидролиза одной рестриктазой или метод нескольких, чаще всего двух рестриктаз. В случае неполного гидролиза молекулы, имеющей, например, два сайта рестрикции, будут получаться пять фрагментов — пять полос при электрофорезе плюс еще одна полоса интактных молекул (рис. 11.13, А). В простейшем случае по распределению молекулярных масс удастся определить взаимное расположение фрагментов. Можно также извлечь из геля продукты неполного гидролиза и еще раз подвергнуть их действию рестриктазы. Если при этом (см. рис. 11.13, А) освобождается общий фрагмент В, то общее расположение фрагментов определяется: АВС.

При использовании двух рестриктаз ДНК гидролизуют каждой рестриктазой по отдельности и обеими рестриктазами вместе. Предположим, что одну и ту же молекулу одна рестриктаза режет

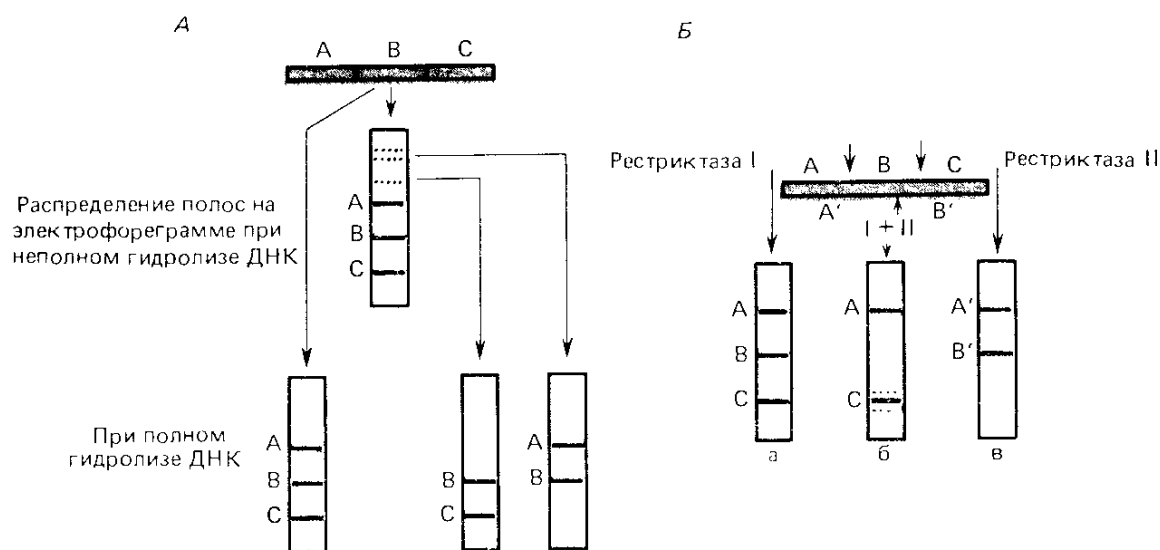


Рис. 11.13. Физическое картирование молекулы ДНК методом неполного гидролиза (А) и методом двух рестриктаз (Б) (по Н. И. Матвиенко, 1979).

Фрагменты А, В, С образуются при действии рестриктазы I; А', В' — при действии рестриктазы II

на два фрагмента, а другая — на три (рис. 11.13, Б). При совместном их действии исчезает фрагмент В и появляются два новых, по молекулярной массе в сумме составляющих исчезнувший фрагмент. Таким образом, сопоставляя размеры фрагментов, выявляемых на электрофореграммах а, б, в, определяют их взаимное расположение: АВС.

Если физическое картирование сделано для участка генетического материала, маркированного мутациями с известным расположением, то рестрикционную (физическую) и генетическую карты можно ориентировать относительно друг друга (см. гл. 16).

Революционизирующее значение для работы с генетическим материалом имели методы определения первичной структуры, или секвенирования ДНК (от англ. sequence).

Современные методы секвенирования (метод химической дегградации ДНК Максама — Гилберта и метод синтеза ДНК на матрице в присутствии терминаторов синтеза Сэнгера) в своей основе разработаны в 1977 г. Идея методов состоит в следующем:

1. Получение серии меченых радиоактивными изотопами полинуклеотидов с одним фиксированным концом и заканчивающихся по одному из четырех нуклеотидов.

2. Электрофорез полученных меченых фрагментов в денатурирующем полиакриламидном геле с высокой разрешающей способностью, позволяющей разделять полинуклеотиды, отличающиеся на один нуклеотид.

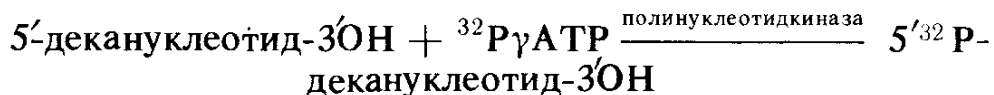
3. Выявление положения меченых фрагментов с помощью радиоавтографии.

Секвенирование олигонуклеотидов по методу Максама — Гилберта.

В качестве примера определим первичную структуру однонитевого декануклеотида:



Метить радиоактивным изотопом фосфора ^{32}P удобнее с помощью фермента *полинуклеотидкиназы* фага Т4 и ^{32}P γ АТФ:



Затем меченую ДНК делят на четыре порции и подвергают химическому гидролизу в таких условиях, чтобы в среднем на одну молекулу пришелся один разрыв в специфическом сайте. В разработке таких специфических реакций большая заслуга принадлежит советскому ученому Е. Д. Свердлову. Эти реакции состоят из этапов модификации нуклеотидов и разрыва ДНК в месте модификации (рис. 11.14, А).

В результате этих реакций в пробах будут появляться наборы меченых олигонуклеотидов (рис. 11.14, Б). Продукты реакций подвергают электрофорезу в денатурирующем полиакриламидном геле, и получают радиоавтограф геля на рентгеновской пленке. При этом следует помнить, что скорость миграции фрагментов обратно

пропорциональна их длине. С учетом этого прямо с радиоавтографа считывают нуклеотидную последовательность (рис. 11.14 Б, справа). На одном геле можно прочитать последовательность длиной в 200—300 п. н.

При помощи метода Максама — Гилберта можно секвенировать как однонитевую, так и двунитевую ДНК, так как меченный с одного конца двунитевой фрагмент ДНК несет метку только с 5'-конца одной нити ДНК. Стратегия секвенирования длинных (> 1000 п. н.) фрагментов ДНК состоит в следующем:

— Выделение препаративного количества ДНК исследуемого фрагмента.

— Расщепление этого фрагмента на более мелкие с помощью эндонуклеаз рестрикации и мечение образовавшихся концов (с помощью полинуклеотидкиназы и $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ или при застройке «липких» концов большим фрагментом ДНК-полимеразы I, сохранившим полимеразную, но не экзонуклеазную активность — см. гл. 6 — в присутствии нуклеозидтрифосфатов, один из которых мечен ^{32}P в α -положении). На этом этапе обычно получают фрагменты, меченные с обоих концов, поэтому каждый меченый фрагмент выделяют из геля и либо подвергают электрофорезу для разделения цепей, либо гидролизуют еще одной рестриктазой для получения субфрагментов, несущих ^{32}P только с одного конца.

— Определение нуклеотидных последовательностей всех меченных с одного конца фрагментов.

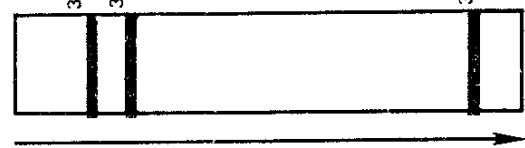
Очевидно, данные процедуры достаточно трудоемки и на большинстве этапов приходится проводить тонкие манипуляции с радиоактивной ДНК, поэтому в настоящее время для определения нуклеотидных последовательностей длинных фрагментов ДНК применяют в основном метод Сэнгера.

Для секвенирования ДНК по методу Сэнгера ее клонируют в однонитевых фагах. Основа метода Сэнгера — синтез радиоактивных копий однонитевой ДНК от фиксированного олигонуклеотида-затравки в присутствии нуклеотидспецифичных терминаторов синтеза ДНК. Чтобы облегчить выделение однонитевых матриц, Дж. Мессингом сконструирована серия векторов на основе фага M13, содержащего в капсидах однонитевую ДНК. Биология размножения M13 чрезвычайно удобна для создания таких векторов. M13 реплицируется в клетке в виде двунитевой репликативной формы, которую можно легко выделить и использовать для клонирования чужеродной ДНК как обычную плазмидную ДНК. В то же время такие рекомбинантные клоны выделяют и из суспензии зрелых частиц фага в однонитевой форме. Сконструированные Мессингом векторы содержат *полилинкер*, т. е. последовательность, являющуюся мишенью для нескольких рестриктаз, для клонирования ДНК в области фагового генома несущественной для его размножения; кроме того, при вставках чужеродной ДНК изменяется цвет фаговых негативных колоний (пятен лизиса на газоне бактериальной культуры) на среде с индикаторным красителем. Для секвенирования олигонуклеотид-

A

Реакция "G"
(модификация гуанина)

^{32}P -ДНК + диметилсульфат + пиперидин

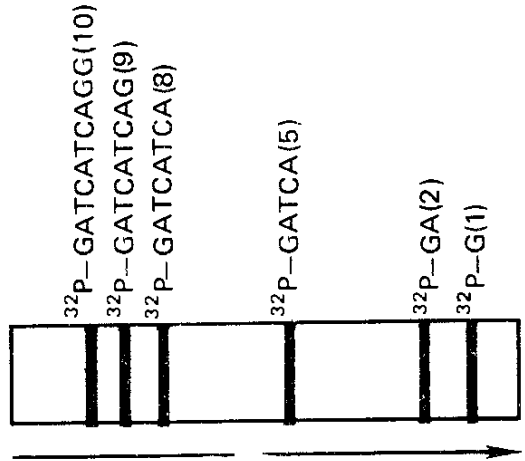


Реакция "G+A"
(модификация аденина или гуанина)

^{32}P -ДНК + муравьиная кислота + пиперидин



G+A

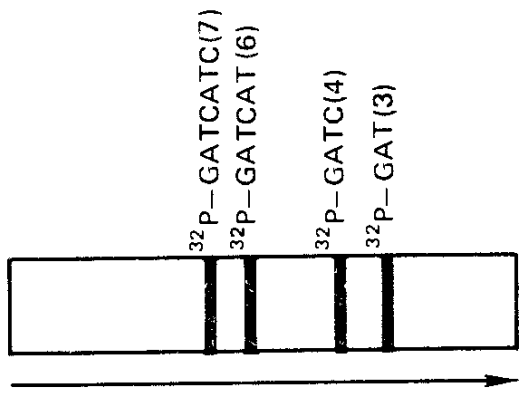


Реакция "T+C"
(модификация тимина или цитозина)

^{32}P -ДНК + гидразин + пиперидин



T+C

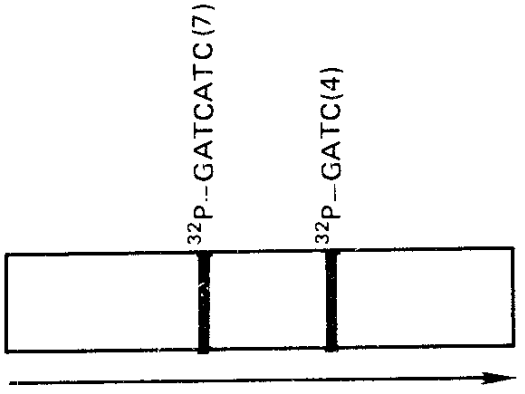


Реакция "C"
(модификация цитозина)

^{32}P -ДНК + NaCl + пиперидин



C



Б Э Л Е К Т Р О Ф О Р Е З В Д Е Н А Т У Р И Р У Ю Щ Е М П О Л И А К Р И Л А М И Д Н О М Г Е Л Е

G G A C T A C T A G

затравку длиной 15—20 нуклеотидов ренатурируют (гибридизируют) с гомологичной областью фага M13, лежащей рядом с сайтом, в который встроена клонируемая чужеродная ДНК (рис. 11.15, А). Можно использовать меченую с 5'-конца затравку или вести синтез в присутствии одного меченого в α -положении нуклеозидтрифосфата. Комплекс матрица — затравка разделяют на четыре порции и наращивают затравку при помощи большого фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* (см. гл. 6), всех четырех нуклеозидтрифосфатов и одного специфического для данной порции терминатора синтеза ДНК. В качестве последних обычно используют 3', 5'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты (ddNTP), которые могут включаться в ДНК, но препятствуют дальнейшему росту цепи. В результате включения, например, ddATP вместо dATP в случайные сайты напротив остатков тимина в матрице будет получаться набор меченых олигонуклеотидов с фиксированным 5'-концом и оканчивающихся на месте А.

Продукты реакции элонгации с ddGTP, с ddATP, с ddCTP и ddTTP денатурируют и разделяют электрофоретически, как описано для метода Максама — Гилберта. При автордиографии получают набор полос, читаемый так же, как набор полос при использовании метода Максама — Гилберта. Обычно реакции элонгации занимают около 30 мин, что более чем в 6 раз быстрее реакций химической дегградации. Скорость накопления информации при этом методе привела к появлению метода секвенирования длинных последовательностей, образующихся в экспериментах типа «shot gun» (дробовика). При этом ДНК фрагментируют ультразвуком или с помощью рестриктаз, клонируют полученные случайным образом фрагменты в фаге M13 и определяют структуру всех этих фрагментов. Таким образом, секвенируют серию перекрывающихся нуклеотидных последовательностей и с помощью компьютера находят нуклеотидную последовательность исходного фрагмента ДНК. Данный метод в некоторой степени расточителен, так как обычно для выяснения структуры фрагмента длиной 1000 п. н. требуется секвенировать ДНК перекрывающихся фрагментов общей длиной гораздо большей, чем 1000 п. н. Разработаны и более экономичные методы генерации серий делетированных вариантов длинной нуклеотидной последовательности, клонированной в фагах серии M13.

Итак, генная и клеточная инженерия целиком возникла благодаря исключениям, наблюдавшимся в ряде биологических экспериментов. Эти исключения сами стали основными «правилами игры» в новой области. Широкое использование трансформации эукариот, элементы парасексуального цикла в генетике эукариот,

Рис. 11.14. Схема эксперимента по секвенированию фрагмента ДНК по методу Максама — Гилберта. А — схема специфической химической модификации нуклеотидов в ДНК; Б — результат электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле и его интерпретация. Цифры в скобках — длина фрагментов, выраженная в числе нуклеотидов

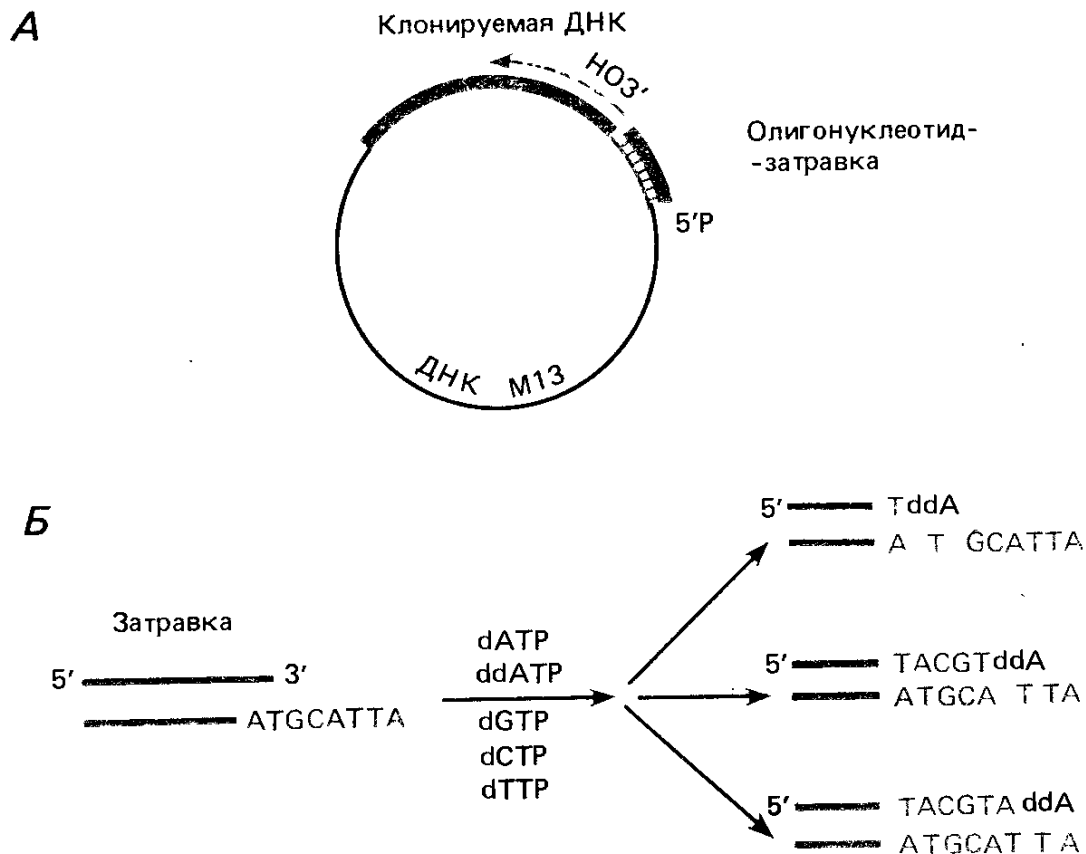


Рис. 11.15. Исходная структура одностороннего вектора М13 со вставкой клонированной ДНК и олигонуклеотидом-затравкой, используемая при секвенировании по методу Сэнгера (А). Пунктирная стрелка указывает направление последующего синтеза комплементарной нити. Продукты элонгации затравки в присутствии ddATP, останавливающего рост синтезируемой нити в точках, соответствующих А-аденину (Б)

культивирование клеток многоклеточных организмов и т. д. объединяются в систему изменения генетического материала и создания организмов с новыми для них свойствами.

Успехи генной инженерии в методах манипулирования генами на основе рекомбинантных ДНК, получаемых *in vitro*, а также методы клеточной инженерии открывают огромные перспективы в экспериментальной биологии и в создании новых форм организмов, полезных человеку. Мощь этих методов поначалу испугала самих исследователей. Вот как выразил это Э. Чаргафф в 1973 г.: «Имеем ли мы право посягать необратимым образом на эволюционную мудрость миллионов лет только для того, чтобы удовлетворить амбицию и любопытство нескольких ученых?»¹ Прошел, однако, период первого восхищения и растерянности. Генная и клеточная инженерия становятся повседневной рутинной научной экспериментальной работой, используются для селекции продуцентов полезных белков (см. гл. 22) и в медицинских целях (см. гл. 21). Возникла новая область практического использования этих методов — биотехнология. Все очевиднее ста-

¹ Цит. по: Баев А. А. Общие представления о генетической инженерии. Итоги науки и техники. М., 1979. ВИНТИ. Т. 12. Ч. I. С. 7.

новятся трудности, которые еще предстоит преодолеть. Стало ясно, что генная и клеточная инженерия — не панацея, а очередное крупное достижение научной мысли, которое должно быть интегрировано в общую систему знаний.

Вопросы к главе 11

1. Перечислите основные свойства генетического материала. В чем они проявляются?
2. Сопоставьте генетические процессы, идущие в гибридных соматических клетках, с процессами, происходящими при парасексуальном цикле у грибов.
3. Какие открытия (достижения) в области генетики и химии нуклеиновых кислот легли в основу методологии генной инженерии?
4. Что такое клонирование генов?
5. Перечислите основные способы получения отдельных генов.
6. Что такое вектор? Перечислите известные вам векторы, используемые в исследованиях по генной инженерии у высших растений, животных, низших эукариот, прокариот.
7. Что такое челночные векторы? Приведите примеры.
8. Что такое реконструированные клетки?
9. Для чего используется обратная транскриптаза в генной инженерии?
10. Рассчитайте размер банка генов для организма с молекулярной массой генома 1×10^{11} Д, при среднем размере клонируемого фрагмента 1×10^7 Д, при $P = 0,95$.

3

ЧАСТЬ

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Глава 12

Мутационный процесс. Генные мутации

Благодаря открытиям Г. Менделя и со времени этих открытий достигнут огромный прогресс в понимании механизмов наследственной передачи свойств живых организмов, в изучении структур и механизмов, лежащих в основе свойства наследственности. Вся методология генетического анализа обязана существованию изменчивости и именно изменчивости мутационной.

Мутационная изменчивость представляет собой лишь один из типов изменчивости (рис. 12.1). Различают *изменчивость наследственную и ненаследственную*. Под наследственной понимают способность к изменениям самого генетического материала, а под ненаследственной — способность организмов реагировать на условия окружающей среды, изменяться в пределах нормы реакции, заданной генотипом. (Ненаследственной, или *модификационной, изменчивости* посвящена гл. 18.)

Наследственную изменчивость в свою очередь подразделяют на *комбинативную* (гл. 3; 7) и *мутационную*. Комбинативная изменчивость представляет собой результат рекомбинации генов и рекомбинации хромосом, несущих различные аллели, и выражается в появлении разнообразия организмов — потомков, получивших новые комбинации дискретных единиц генетического материала, уже существовавших у родительских форм. В то же время мутационная изменчивость — это возникновение новых вариантов дискретных единиц генетического материала, прежде всего новых аллелей.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ			
НАСЛЕДСТВЕННАЯ		НЕНАСЛЕДСТВЕННАЯ	
КОМБИНАТИВНАЯ	МУТАЦИОННАЯ	ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ	

Рис. 12.1. Типы изменчивости

Принято выделять также *онтогенетическую изменчивость*. (Подробнее о ней см. в гл. 17.) Здесь только отметим, что онтогенетическая изменчивость — это реализация нормы реакции организма во времени, в ходе его индивидуального развития. По этому критерию она относится к ненаследственной изменчивости. Существует, однако, ряд фактов, несомненно указывающих и на изменения самого генетического материала в ходе онтогенеза, что приближает онтогенетическую изменчивость к наследственной. Вот почему на схеме рис. 12.1 онтогенетическая изменчивость перекрывается наследственной и ненаследственной изменчивостью.

12.1. Мутационная теория

Как указывалось в гл. 1, *мутационная теория*, или, правильнее, *теория мутаций*, составляет одну из основ генетики. Она зародилась вскоре после переоткрытия законов Г. Менделя в трудах Г. Де Фриза (1901—1903). Еще раньше к представлениям о скачкообразном изменении наследственных свойств пришел русский ботаник С. И. Коржинский (1899) в своем труде «Гетерогенезис и эволюция». Так что справедливо говорить о мутационной теории Коржинского — Де Фриза. Гораздо обстоятельнее мутационная теория изложена в трудах Г. Де Фриза, посвятившего большую часть жизни изучению проблемы мутационной изменчивости растений.

На первых порах мутационная теория всецело сосредоточилась на фенотипическом проявлении наследственных изменений, практически не занимаясь механизмом их возникновения. В соответствии с определением Г. Де Фриза *мутация представляет собой явление скачкообразного, прерывистого изменения наследственного признака*. Как будет показано в дальнейшем, само определение понятия «мутация» вызывает трудности. До сих пор, несмотря на многочисленные попытки, не существует краткого определения мутации, лучшего, чем дал Г. Де Фриз, хотя и оно не свободно от недостатков. Об этом будет сказано позже.

Основные положения мутационной теории Г. Де Фриза сводятся к следующему:

1. Мутации возникают внезапно как дискретные изменения признаков.
2. Новые формы устойчивы.
3. В отличие от ненаследственных изменений мутации не образуют непрерывных рядов, не группируются вокруг какого-ли-

бо среднего типа. Они представляют собой качественные изменения.

4. Мутации проявляются по-разному и могут быть как полезными, так и вредными.

5. Вероятность обнаружения мутаций зависит от числа исследованных особей.

6. Сходные мутации могут возникать неоднократно.

Как и многие генетики раннего периода, Г. Де Фриз ошибочно считал, что мутации могут сразу давать начало новым видам, т. е. минуя естественный отбор.

Г. Де Фриз создал свою мутационную теорию на основе экспериментов с различными видами *Oenothera*. Парадокс заключался в том, что в действительности он не получил мутаций, а наблюдал результат комбинативной изменчивости, поскольку формы, с которыми он работал, оказались сложными гетерозиготами по транслокациям (см. гл. 13).

Честь строгого доказательства возникновения мутаций принадлежит В. Иоганнсену, изучавшему наследование в чистых (самоопыляющихся) линиях фасоли и ячменя. Полученный им результат касался количественного признака — массы семян. Мерные значения таких признаков обязательно варьируют, распределяясь вокруг некоей средней величины. Мутационное изменение подобных признаков и обнаружил В. Иоганнсен (1908—1913). Сам этот факт уже ставит под сомнение одно из положений Г. Де Фриза (см. выше пункт 3).

Так или иначе, но гипотеза о возможности скачкообразных наследственных изменений — мутаций, которую на рубеже столетий обсуждали многие генетики (в том числе У. Бэтсон), получила экспериментальное подтверждение.

Крупнейшим обобщением работ по изучению изменчивости в начале XX в. стал закон гомологических рядов в наследственной изменчивости Н. И. Вавилова, который он сформулировал в 1920 г. в докладе на III Всероссийском селекционном съезде в Саратове. Согласно этому закону близким видам и родам организмов свойственны сходные ряды наследственной изменчивости. Чем ближе таксономически рассматриваемые организмы, тем большее сходство наблюдается в ряду (спектре) их изменчивости. Справедливость этого закона Н. И. Вавилов проиллюстрировал на огромном ботаническом материале.

Закон Н. И. Вавилова находит подтверждение в изучении изменчивости животных и микроорганизмов и не только на уровне целых организмов, но и отдельных их структур. Достаточно вспомнить эволюционный принцип параллелизма в развитии тканей, сформулированный затем А. А. Заварзиным.

Очевидно, что закон Н. И. Вавилова стоит в ряду научных достижений, приведших к современным представлениям об универсальности многих биологических структур и функций, о которых говорилось в гл. 11.

Закон Н. И. Вавилова имеет большое значение для селекцион-

ной практики, поскольку прогнозирует поиск определенных форм культурных растений и животных. Зная характер изменчивости одного или нескольких близких видов, можно целенаправленно искать формы, еще не известные у данного организма, но уже открытые у его таксономических родственников. Своим законом гомологических рядов Н. И. Вавилов фактически заложил основы нового направления — сравнительной генетики.

12.2. Классификация мутаций

Трудности определения понятий «мутация» лучше всего иллюстрирует классификация ее типов.

Существует несколько принципов такой классификации.

А. По характеру изменения генома:

1. Геномные мутации — изменение числа хромосом.
2. Хромосомные мутации, или хромосомные перестройки, — изменение структуры хромосом.
3. Генные мутации — изменения генов.

Б. По проявлению в гетерозиготе:

1. Доминантные мутации.
2. Рецессивные мутации.

В. По отклонению от нормы или так называемого дикого типа:

1. Прямые мутации.
2. Реверсии. Иногда говорят об обратных мутациях, однако очевидно, что они представляют собой только часть реверсий, поскольку в действительности широко распространены так называемые супрессорные мутации (см. гл. 16).

Г. В зависимости от причин, вызывающих мутации:

1. Спонтанные, возникающие без видимой причины, т. е. без каких-либо индуцирующих воздействий со стороны экспериментатора.
2. Индуцированные мутации.

Только эти четыре способа классификации изменений генетического материала носят достаточно строгий характер и имеют универсальное значение. Каждый из подходов в этих способах классификации отражает некоторую существенную сторону возникновения либо проявления мутаций у любых организмов: эукариот, прокариот и их вирусов.

Существуют и более частные подходы к классификации мутаций:

Д. По локализации в клетке:

1. Ядерные.
2. Цитоплазматические. В этом случае обычно подразумевают мутации неядерных генов.

Е. По отношению к возможности наследования:

1. Генеративные, происходящие в половых клетках.
2. Соматические, происходящие в соматических клетках.

Очевидно, два последних способа классификации мутаций применимы только к эукариотам, а рассмотрение мутаций с точки

зрения их возникновения в соматических или половых клетках имеет отношение только к многоклеточным эукариотам.

Наконец, очень часто мутации классифицируют по их фенотипическому проявлению, т. е. в зависимости от изменяющегося признака. Тогда рассматривают мутации летальные, морфологические, биохимические, поведенческие, устойчивости или чувствительности к повреждающим агентам и т. д. Возможно, это наиболее эклектичный способ классификации, но им довольно часто пользуются в специальной литературе.

В общем виде можно сказать, что *мутации — это наследуемые изменения генетического материала*. Об их появлении судят по изменениям признаков. В первую очередь это относится к генным мутациям. Хромосомные и геномные мутации выражаются также в изменении характера наследования признаков (см. гл. 13 и 14).

12.3. Спонтанные и индуцированные мутации

До 1925—1927 гг. генетики имели дело только со спонтанными мутациями. Различные попытки повысить частоту мутаций, в том числе и предпринятые Т. Х. Морганом, не приносили успеха. Создавалось впечатление, что мутационный процесс не зависит от окружающей среды. Это стимулировало автогенетические концепции, согласно которым эволюцию организмов связывали только с действием внутренних факторов.

Овладение методами индуцированного мутагенеза сыграло огромную роль в борьбе с такими тенденциями, а также расширило возможности генетического анализа. Впервые повышение частоты наследственной изменчивости под влиянием внешних агентов обнаружили в 1925 г. советские микробиологи Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов. Они наблюдали увеличение разнообразия наследственных форм — *сальтантов*, как они их называли, после воздействия «лучами радия» на низшие грибы.

В 1927 г. Г. Мёллер сообщил о действии рентгеновых лучей на мутационный процесс у дрозофилы и предложил ставший классическим количественный метод учета рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме у этого объекта. Почти одновременно Л. Стадлер (1928) описал влияние рентгеновых лучей на мутационный процесс у ячменя. В том же году М. Н. Мейсель в лаборатории Г. А. Надсона получил мутации у дрожжей под действием химических соединений (хлороформ и др.).

В 30-х годах открыт химический мутагенез у дрозофилы: сначала В. В. Сахаров (1932), а затем М. Е. Лобашев и Ф. А. Смирнов (1934) показали, что некоторые соединения (йод, уксусная кислота, аммиак) способны индуцировать рецессивные летали в X-хромосоме. В 1939 г. С. М. Гершензон открыл сильный мутагенный эффект экзогенной ДНК у дрозофилы. Мощные химические мутагены были открыты в 1946 г. И. А. Рапопортом (*этиленмин*) в СССР и Ш. Ауэрбах и Дж. Робсоном (*азогистый иприт*) в Англии.

С тех пор в арсенал мутагенных факторов вошли разнообразные химические соединения: *аналоги оснований*, включающиеся непосредственно в ДНК, такие агенты, как *азотистая кислота* или *гидроксиламин*, модифицирующие основания, соединения, *алкилирующие ДНК* (*этилметансульфонат*, *метилметансульфонат* и др.), соединения, интеркалирующие между основаниями ДНК (*акридины* и их производные), и многие другие.

Наряду с мутагенами были найдены вещества-антимутагены (см. гл. 21).

Возможность изменять скорость мутационного процесса послужила решающим стимулом к выяснению причин спонтанных мутаций. Одна из первых попыток объяснить причины спонтанных мутаций сводилась к предположению о том, что в действительности их индуцирует естественный фон радиоактивности. Однако выяснилось, что таким путем можно объяснить возникновение лишь около 0,1 % всех спонтанных мутаций у дрозофилы. Не подтвердилась и гипотеза о тепловом движении атомов как главной причине спонтанных мутаций. Были попытки объяснить спонтанные мутации результатом действия продуктов метаболизма клетки и организма.

Современная точка зрения на причины спонтанных мутаций сформировалась в 60-х годах благодаря выяснению механизмов воспроизведения, репарации и рекомбинации генов и открытию ферментных систем, ответственных за эти процессы. Возникла тенденция объяснять генные мутации как ошибки в работе ферментов матричного синтеза ДНК. Сейчас эта гипотеза общепризнана. Притягательность гипотезы заключается также в том, что она позволяет рассматривать и индуцированный мутационный процесс как результат вмешательства внешних факторов в нормальное воспроизведение носителей генетической информации, т. е. дает единое объяснение причин спонтанных и индуцированных мутаций. Большое влияние на развитие теории мутационного процесса оказало изучение его генетического контроля. Были открыты гены, мутации которых могут повышать или понижать частоту как спонтанных, так и индуцированных мутаций. Эти и другие факты, которые будут рассмотрены далее, — убедительные аргументы в пользу существования общих причин индуцированного и спонтанного мутационного процесса.

Первое объяснение механизма мутационных изменений (генных мутаций и хромосомных аберраций) было предложено в 1935 г. Н. В. Тимофеевым-Ресовским, К. Циммером и М. Дельбрюком на основании анализа радиационного мутагенеза у высших организмов и прежде всего у дрозофилы. Мутация рассматривалась как результат мгновенной перестройки атомов в сложной молекуле гена. Причиной такой перестройки считалось непосредственное попадание в ген кванта или ионизирующей частицы (принцип попадания) или же случайные колебания атомов. Открытие в дальнейшем эффекта последствия ионизирующих излучений показало, что мутации возникают в результате процесса,

длящегося во времени, а не непосредственно в момент прохождения кванта энергии или ионизирующей частицы через ген.

Перспективы преодоления этих и других противоречий зарождающейся теории мутационного процесса были намечены в *физиологической гипотезе мутационного процесса*, высказанной в 1946 г. М. Е. Лобашевым.

Сущность гипотезы М. Е. Лобашева заключалась в том, что «благодаря способности клетки репарировать полученные повреждения становление мутации должно осуществляться в процессе обратимости повреждения, т. е. в процессе восстановления (репарации)»¹. Это означало, что появлению мутации должно предшествовать предмутационное состояние или потенциальное изменение, которое может быть устранено (тождественная репарация) либо реализуется в виде мутации (нетождественная репарация). Для доказательства существования таких предмутационных состояний М. Е. Лобашев, его ученики К. В. Вагги, М. М. Тихомирова и другие в опытах с дрозофилой, облученной рентгеновыми лучами, дополнительно воздействовали на нее высокой температурой, которая сама по себе мутаций практически не вызывала. Мухи, подвергнутые такому комбинированному воздействию, обнаруживали более высокую мутабельность, чем после воздействия только рентгеновыми лучами.

Несмотря на то что физиологическая гипотеза мутационного процесса была сформулирована на основе общепринятых в то время представлений о белках как носителях генетической информации, она оказалась справедливой и в отношении молекул ДНК. Действительно, многие повреждающие агенты приводят к локальной денатурации молекул ДНК, а устранение этих нарушений структуры (репарация) — к возникновению мутаций. Связь мутаций с процессами репарации в настоящее время доказана практически для всех исследованных объектов. Ныне физиологическая теория выросла из рамок гипотезы, символизируя современный период в изучении мутационного процесса.

12.4. Методы изучения мутаций

Исследование мутационного процесса как часть генетического анализа ставит две связанные задачи: изучение механизмов спонтанного и индуцированного мутагенеза и получение мутантов для маркирования генетического материала или для получения полезных форм организмов. Частота мутационного процесса служит также критерием присутствия в окружающей среде генетически активных факторов (см. гл. 21).

Основной метод изучения мутационного процесса — определение его частоты. При этом экспериментаторы следуют правилам, которые были сформулированы Н. В. Тимофеевым-Ресовским (1934):

1. Работа возможна только с генетически чистым материа-

¹ Лобашев М. Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса // Вестн. ЛГУ. 1947. № 8. С. 10—29.

лом, т. е. инбредными или чистыми линиями, гомозиготными по исследуемым генам.

2. Необходимо оперировать достаточно большими численностями как в контроле, так и в обработанном мутагенами материале.

3. Для регистрации возникающих мутаций следует применять удобные генетические методы.

4. Анализировать любые полученные изменения, с тем чтобы установить наследственны ли они (цитоплазматические или ядерные, хромосомные или генные).

5. Требуется знание способа действия мутагена на зародышевые клетки обработанного организма.

Эти правила касаются изучения индуцированного мутационного процесса, и его частоту обычно определяют, вычитая частоту мутаций, возникающих в контрольном варианте (без обработки), из частоты мутаций в опытном варианте (после обработки мутагеном).

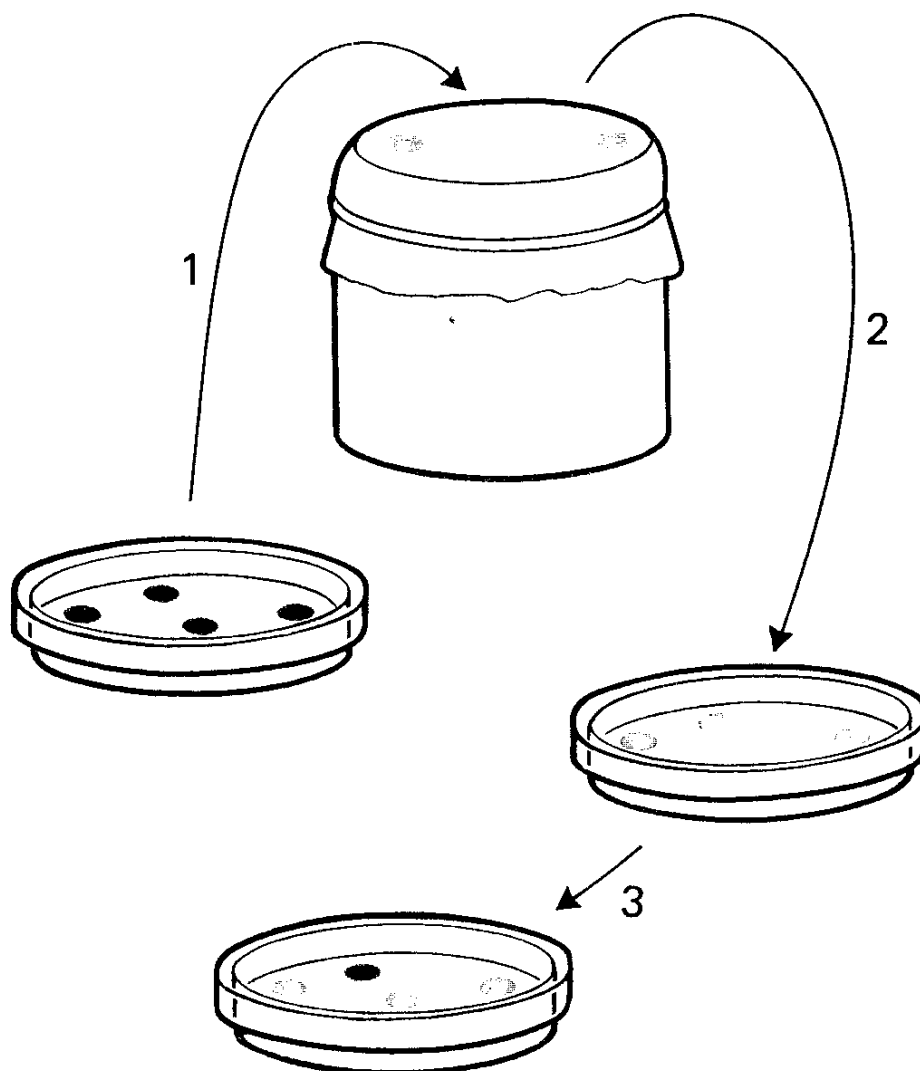


Рис. 12.2. Метод отпечатков для обнаружения мутантов у бактерий, устойчивых к фагу T1:

1 — получение отпечатка колоний на бархате; 2 — перепечатка на среду с бактериофагом; 3 — инкубация отпечатка. Растущие колонии — красные

Учет мутаций у микроорганизмов. Такой эксперимент достаточно просто провести на гаплоидных микроорганизмах, у которых каждая клетка на плотной среде может образовать отдельную колонию, представляющую собой клон, и все эти клоны проверяют по интересующему признаку.

Если исследуют мутации, дающие селективное преимущество, то мутантов легко выявить методом отпечатков, или реплик, предложенным Э. и Дж. Ледерберг (рис. 12.2). Например, при изучении мутаций устойчивости *E. coli* к бактериофагу T1 (мутанты Top^r) клетки бактерии высевают на агаризованную среду в чашки Петри таким образом, чтобы на них образовались отдельные колонии. Затем при помощи бархатной печатки эти колонии перепечатывают на чашки с нанесенной суспензией частиц фага T1. Большая часть клеток исходной (чувствительной) культуры (Top^s) не будет образовывать колоний, поскольку их лизирует бактериофаг. Вырастут лишь отдельные мутантные колонии (Top^r), устойчивые к фагу. Сравнивая частоту мутантов в контрольном и опытном (например, облученном ультрафиолетовым светом) вариантах, легко определить частоту индуцированных мутаций.

Эксперимент можно выполнить проще: достаточно приготовить суспензию клеток *E. coli*, разделить ее на две части, из которых одна контрольная, а другая обрабатывается мутагеном. Обе суспензии высевают на среду без бактериофага — для подсчета числа жизнеспособных клеток, образующих колонии, и на среду с бактериофагом — для учета числа устойчивых клеток (рис. 12.3).

В то же время метод отпечатков незаменим при учете мутантов, теряющих способность к росту на каком-либо субстрате, например ауксотрофных по гистидину. Тогда колонии, выросшие на полноценной среде, перепечатывают на чашки со средой без гистидина и отыскивают те, отпечатки которых на этой среде не способны к росту. Затем сравнивают их частоты в контрольном и опытном вариантах.

Сложнее определить частоту спонтанного мутирования. Число мутантов, встреченных в контрольном варианте, обычно прямо не отражает частоту мутирования, а лишь показывает концентрацию мутантов, которые могли некогда возникнуть и размножиться в культуре. Как определить истинную частоту спонтанных мутаций?

Современные методы определения частоты спонтанного мутирования представляют собой модификации подхода, использованного С. Лурия и М. Дельбрюком (1942). Эти авторы впервые исследовали распределение числа мутантных клеток в параллельных клонах — бактериальных культурах. Рассмотрим один из вариантов определения частоты спонтанного мутирования на конкретном примере исследования мутаций: $Ade^- \rightarrow Ade^+$ у мутанта по гену *ade2* дрожжей-сахаромицетов. Этот пример удобен тем, что колонии, образуемые исходной культурой, красные и нуждаются в аденине. Мутанты же (в данном случае ревертанты) белые и

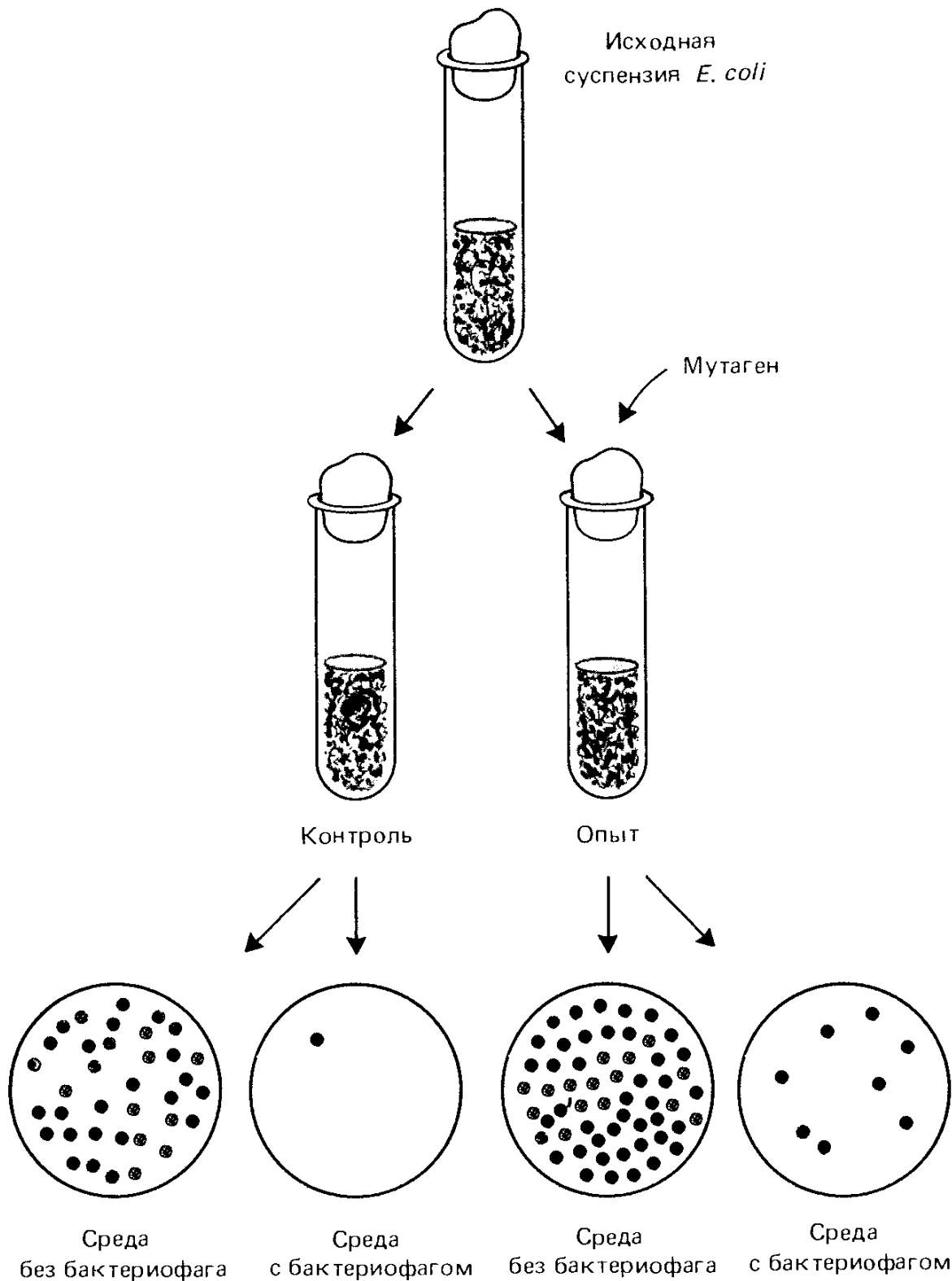


Рис. 12.3. Учет частоты мутантов *E. coli*, устойчивых к бактериофагу, методом прямого посева

в аденине не нуждаются. Это позволяет для выявления мутантов применять селективный метод.

Прежде всего нужно узнать распределение спонтанных мутантов среди клонов, содержащих одинаковое число клеток. В данном случае удобнее всего использовать предложенный Н. Н. Хромывым-Борисовым метод упорядоченного посева на среде, полуобогатенной ограничивающим фактором роста.

Капли суспензии исходной культуры равного объема наносят специальным репликатором на плотную среду, содержащую количество аденина, необходимое для нескольких делений клеток *ade 2*. Благодаря тому, что штыри репликатора (рис. 12.4, А) расположены в углах правильной тригональной решетки, все колонии оказываются на равном расстоянии друг от друга и имеют одинаковый размер, а следовательно, и число клеток. Вариабельность не превышает 1%. После прекращения роста колоний из-за истощения аденина в среде на них появляются колонии вторичного роста, или «бородавки» мутантов *Ade⁺*. Они образуются в результате продолжающихся делений мутантных клеток, не нуждающихся в аденине. Белые бородавки *Ade⁺* хорошо заметны на фоне красных колоний *Ade⁻* (рис. 12.4, Б и В).

Тогда частоту мутаций (m) в пересчете на клетку за одно клеточное деление вычисляют по формуле $m = (\bar{X} \cdot \ln 2) / \bar{N}$, где \bar{X} — среднее число бородавок на одну колонию, \bar{N} — среднее число клеток в колонии.

Ту же задачу можно решить и другим способом. Поскольку спонтанные мутации — события редкие, распределение мутантов по колониям соответствует распределению Пуассона. Если извест-

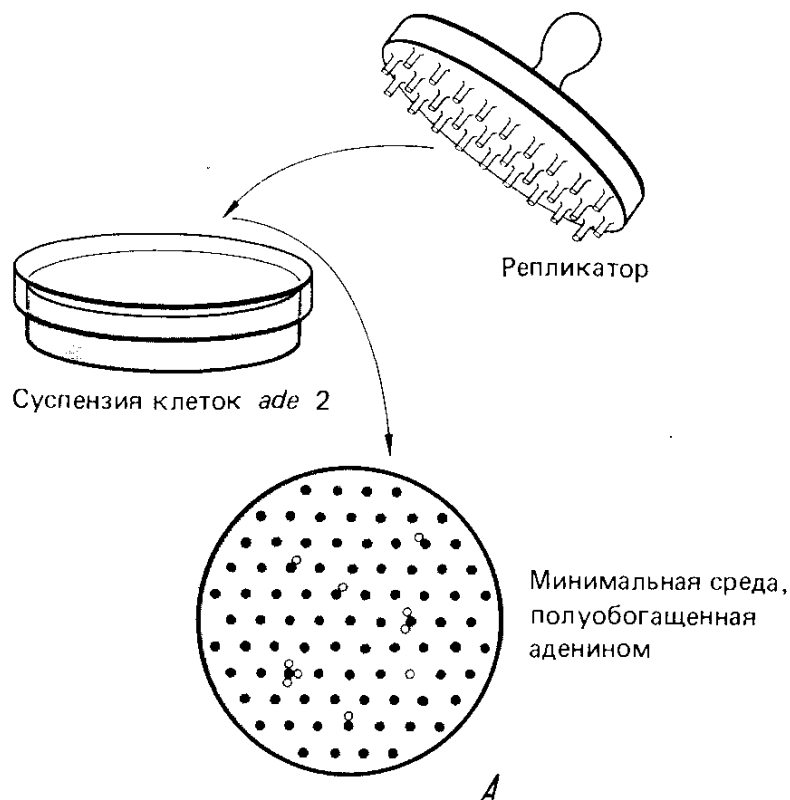
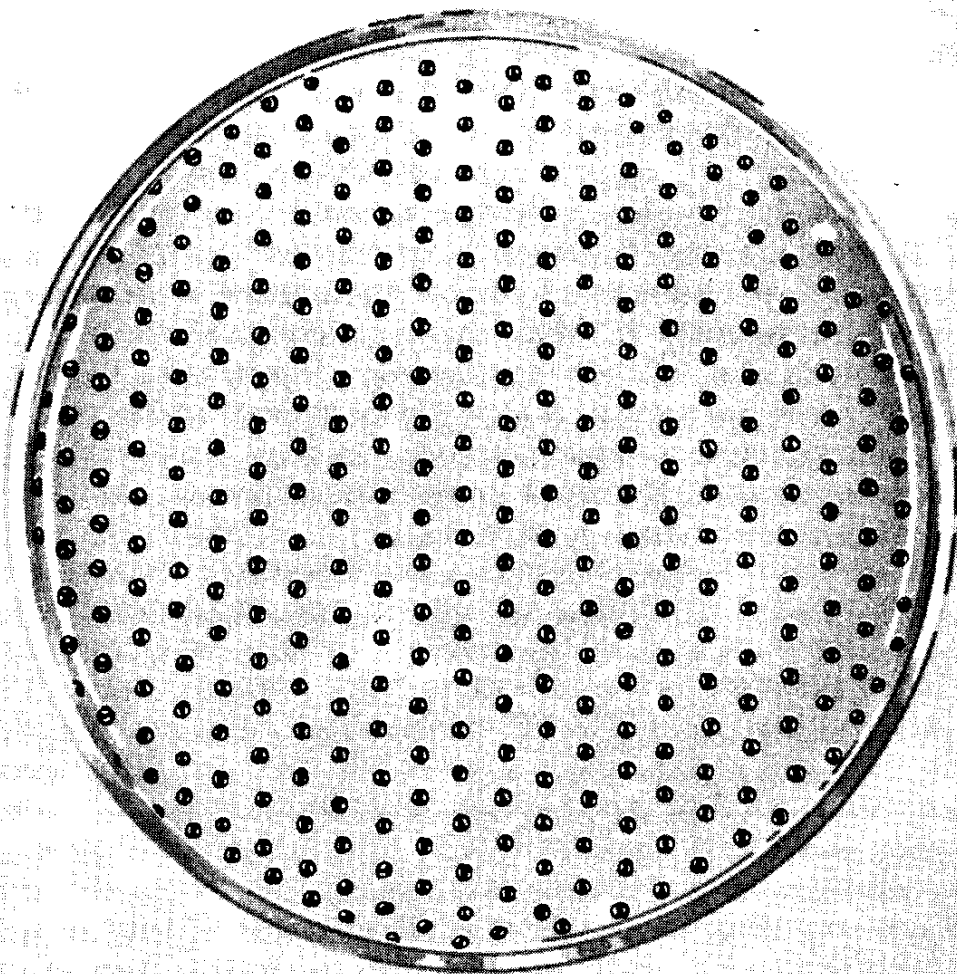
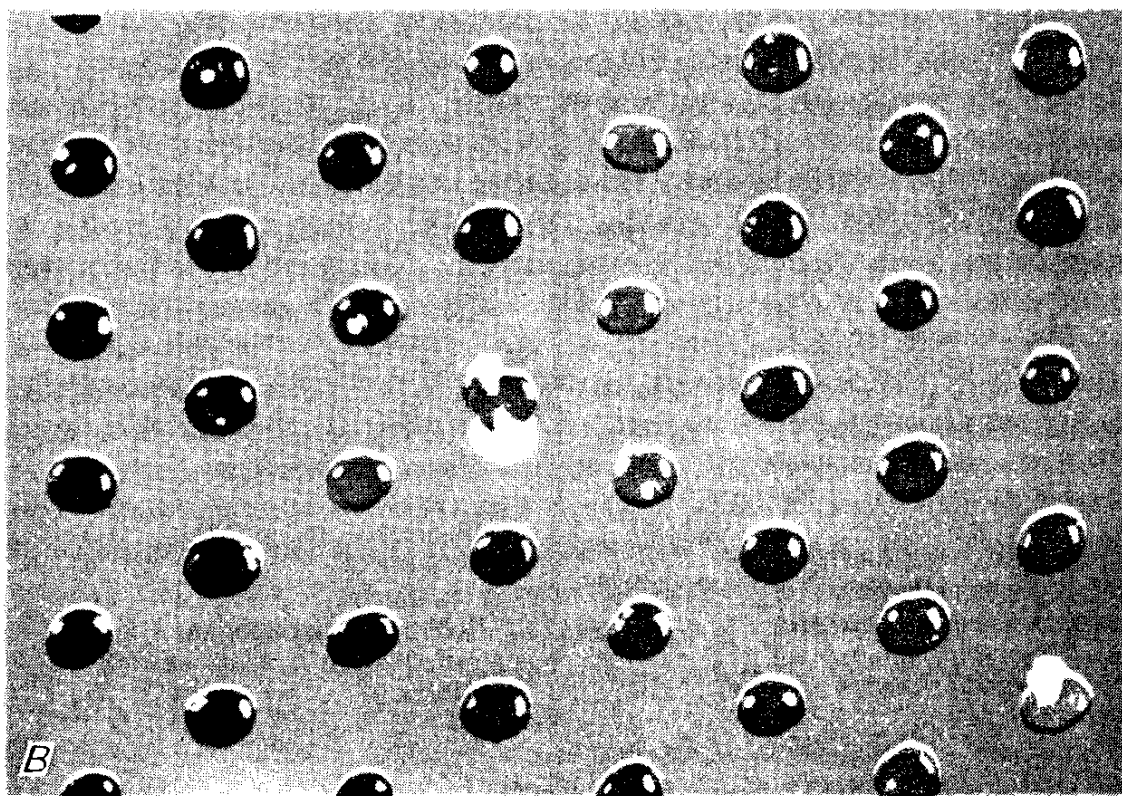


Рис. 12.4. Определение частоты спонтанного мутирования $Ade^{-} \rightarrow Ade^{+}$ у штамма дрожжей, мутантного по гену *ade 2*. А — общая схема эксперимента. После инкубации отпечатка на среде, полуобогатенной аденином, вырастают красные колонии. На некоторых из них белые «бородавки» — колонии вторичного роста — мутанты; Б — общий вид чашки Петри со средой, полуобогатенной аденином, на которой выросли колонии (упорядоченный посев) *Ade⁻* (видны «бородавки» — мутантные колонии вторичного роста — белые); В — увеличенный фрагмент той же чашки (по Н. Н. Хромову-Борисову)



Б



В

Рис. 12.4. Продолжение.

на доля колоний, вообще не содержащих мутантов, P_0 , то $\ln P_0 = -\bar{X}$, где \bar{X} — среднее число мутаций на колонию. Тогда, зная среднее число клеток в колонии (N), определим m как и в предыдущем случае: $m = (\bar{x} \cdot \ln 2) / N$.

Этот второй подход применим и к вычислению частоты спонтанных мутаций в параллельных жидких культурах, где мутантные клетки возникают, делятся и перемешиваются так, что непосредственно узнать число независимых мутационных событий невозможно. В этом случае P_0 будет соответствовать доле параллельных культур, заложенных из одной суспензии и не содержащих мутантов. Естественное условие такого эксперимента — отсутствие мутантов в исходной суспензии клеток. Определить частоту спонтанных мутаций можно и по распределению мутантных клеток между параллельными культурами. Однако это требует более сложных вычислений. Частоты спонтанного мутирования у микроорганизмов представлены в табл. 12.1.

Таблица 12.1. Частота спонтанного мутирования некоторых генов у различных организмов

Организм (признак)	Частота мутаций на геном за генерацию	Организм (признак)	Частота мутаций на геном за генерацию
<i>Бактериофаг T2</i>			
Круг хозяев	$3 \cdot 10^{-9}$		
Подавление лизиса	$1 \cdot 10^{-8}$		
<i>Escherichia coli</i>		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	
Устойчивость к стрептомицину	$4 \cdot 10^{-10}$	Устойчивость к стрептомицину	$1 \cdot 10^{-6}$
Зависимость от стрептомицина	$1 \cdot 10^{-9}$	<i>Neurospora crassa</i>	
Чувствительность к фагу T1	$2 \cdot 10^{-8}$	Восстановление прототрофности по аденину	$4 \cdot 10^{-8}$
Устойчивость к фагу T1	$3 \cdot 10^{-9}$	Восстановление прототрофности по инозиту	$8 \cdot 10^{-8}$
Усвоение галактозы	$1 \cdot 10^{-10}$	<i>Zea mays</i>	
Ферментация лактозы	$2 \cdot 10^{-7}$	Морщинистые семена	$1 \cdot 10^{-6}$
Потребность в гистидине	$2 \cdot 10^{-8}$	Пурпурные семена	$1 \cdot 10^{-5}$
Восстановление прототрофности по гистидину	$2 \cdot 10^{-6}$	Сахарный эндосперм	$2 \cdot 10^{-6}$
<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>	
Восстановление прототрофности по триптофану	$5 \cdot 10^{-8}$	Белые глаза	$4 \cdot 10^{-5}$
Чувствительность к стрептомицину	$1 \cdot 10^{-10}$	Желтое тело	$1 \cdot 10^{-4}$
<i>Staphylococcus aureus</i>		Расщепленные щетинки	$3 \cdot 10^{-5}$
Чувствительность к сульфатазолу	$1 \cdot 10^{-9}$	Вырезка на крыле	$1,5 \cdot 10^{-4}$
		Коричневые глаза	$3 \cdot 10^{-5}$
		<i>Mus musculus</i>	
		Коричневая окраска	$8 \cdot 10^{-6}$
		Альбинизм	$3 \cdot 10^{-5}$
		Пегость	$3 \cdot 10^{-5}$

Организм (признак)	Частота мутаций на геном за генерацию	Организм (признак)	Частота мутаций на геном за генерацию
Ослабленная окраска <i>Homo sapiens</i>	$3 \cdot 10^{-5}$	Гемофилия А Ахондроплазия (карликовость)	$3 \cdot 10^{-5}$ $4-8 \cdot 10^{-5}$
Аниридия (отсутствие диафрагмы) Ретинобластома (опухоль сетчатки)	$5 \cdot 10^{-6}$ $1 \cdot 10^{-5}$	Нейрофиброматоз (опухоль нервной ткани) Альбинизм Микроцефалия	$2 \cdot 10^{-4}$ $3 \cdot 10^{-5}$ $3 \cdot 10^{-5}$

Примечание. Здесь понятие «генерация» соответствует репликации генома (одно деление) для клеток и вирусов и одному половому поколению для многоклеточных.

Учет мутаций у дрозофилы. Изучение мутационного процесса, особенно спонтанного мутирования у высших организмов — растений и животных — затруднено в связи с ограниченным числом особей, которых можно исследовать, а также в связи с их диплоидностью, препятствующей непосредственному проявлению рецессивных мутаций.

Наиболее удобные методы учета мутаций разработаны для дрозофилы (*D. melanogaster*). Собственно именно создание методов учета рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме определило успех Г. Меллера, открывшего действие рентгеновых лучей на мутационный процесс у дрозофилы. Для учета рецессивных летальных мутаций, сцепленных с полом, у дрозофилы широко применяют метод Меллер-5 (рис. 12.5). Самки линии Меллер-5, или М-5, несут в обеих X-хромосомах по две инверсии: sc^8 и $\delta 49$. Инверсия sc^8 захватывает почти всю X-хромосому, а в ее пределах находится еще одна инверсия — $\delta 49$. В этой системе кроссинговер полностью подавлен. Используемые инверсии не имеют рецессивного летального действия. Кроме того, обе хромосомы М-5 несут три маркера: два рецессивных — w^a (абрикосовый цвет глаз) и sc^8 (укороченные щетинки — фенотипическое проявление одноименной инверсии, затрагивающей ген sc) и один доминантный — Bar .

При скрещивании исследуемых самцов с самками М-5 в индивидуальных семьях F_2 получают по два класса самок и самцов, если в X-хромосоме сперматозоидов исходного самца не возникла рецессивная летальная мутация (рис. 12.5, А). Если же рецессивная леталь появилась, то в соответствующей индивидуальной

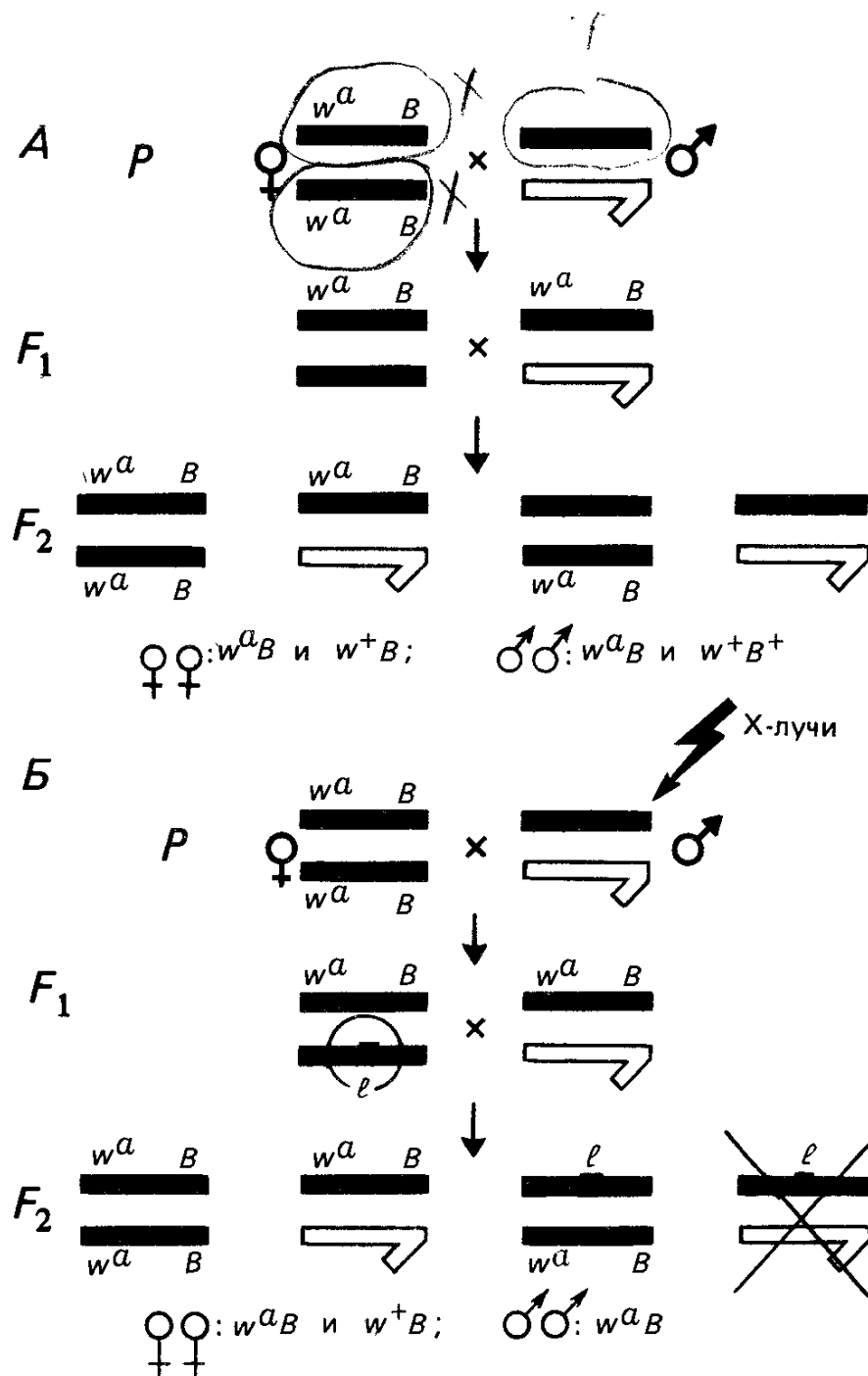


Рис. 12.5. Метод Меллер-5 для учета рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у *D. melanogaster*. Рецессивная летальная мутация (l): А — отсутствует; В — появилась

культуре в F_2 мы получим только один класс самцов (рис. 12.5, Б), будут отсутствовать самцы дикого типа $w^+ B^+$.

Метод Меллер-5 можно использовать и для регистрации рецессивных мутаций в X-хромосоме с видимым проявлением. Для этой цели удобнее применять метод *double yellow*, основанный на скрещивании исследуемых самцов с самками, несущими сцепленные X-хромосомы (см. гл. 5). Благодаря тому, что при таком скрещивании сыновья получают свою X-хромосому непосредственно от отца, рецессивные мутации в этой хромосоме можно учитывать уже в F_1 (рис. 12.6).

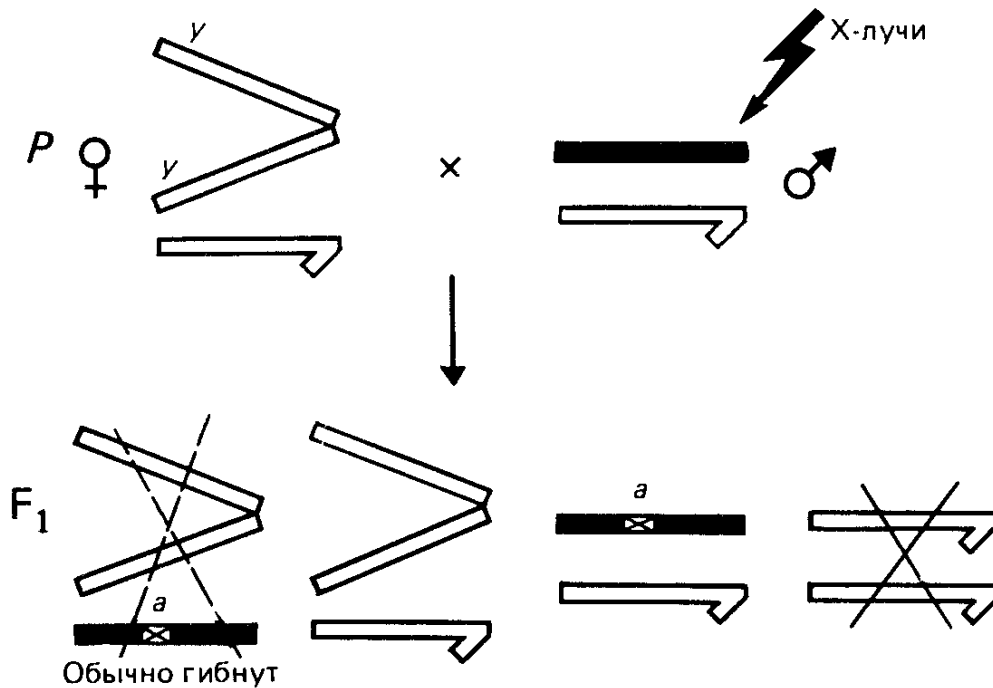


Рис. 12.6. Использование метода double yellow для учета рецессивных мутаций в X-хромосоме с видимым проявлением в F_1 у дрозофилы

Учет летальных мутаций и мутаций с видимым фенотипическим проявлением легче удается для X-хромосом дрозофилы благодаря специфике ее наследования. Однако существуют *методы учета летальных мутаций в аутосомах*. Например, для учета рецессивных летальных мутаций в хромосоме 2 используют так называемый *метод сбалансированных леталей*. Для этого применяют линию, гетерозиготную по хромосоме 2. В одном гомологе находятся доминантные гены *Cyrlly* (*Cy* — загнутое крылья) и *Lobe* (*L* — уменьшенные глаза лопастной формы), в другом гомологе — *Plum* (*Pm* — сливово-коричневый цвет глаз). Кроме того, хромосома *Cy L* содержит инверсии, препятствующие кроссинговеру. Все три доминантные мутации обладают рецессивным летальным действием. Благодаря этому при разведении такой линии выживают только гетерозиготы по указанным генам. Это и есть система сбалансированных леталей.

Для изучения рецессивных летальных мутаций, а также рецессивных мутаций с видимым проявлением исследуемых мух скрещивают с мухами *CyL/Pm*. В F_1 получают мух, гетерозиготных по той или другой хромосоме исследуемой линии, и индивидуально вновь скрещивают сегрегантов *CyL* с мухами *CyL/Pm*. В F_2 (в индивидуальных культурах) скрещивают между собой самцов и самок с признаками *CyL* и анализируют F_3 (рис. 12.7). В отсутствие рецессивной летальной мутации расщепление в F_3 будет $2CyL : 1 Cy^+L^+$ (рис. 12.7, А), а если в половых клетках мух исходной линии возникали летальные мутации, то в соответствующих индивидуальных культурах в F_3 не будет нормальных мух $2CyL : 0 Cy^+L^+$ (рис. 12.7, Б). Аналогично учитывают в F_3 и рецессивные мутации с видимым проявлением в хромосоме 2.

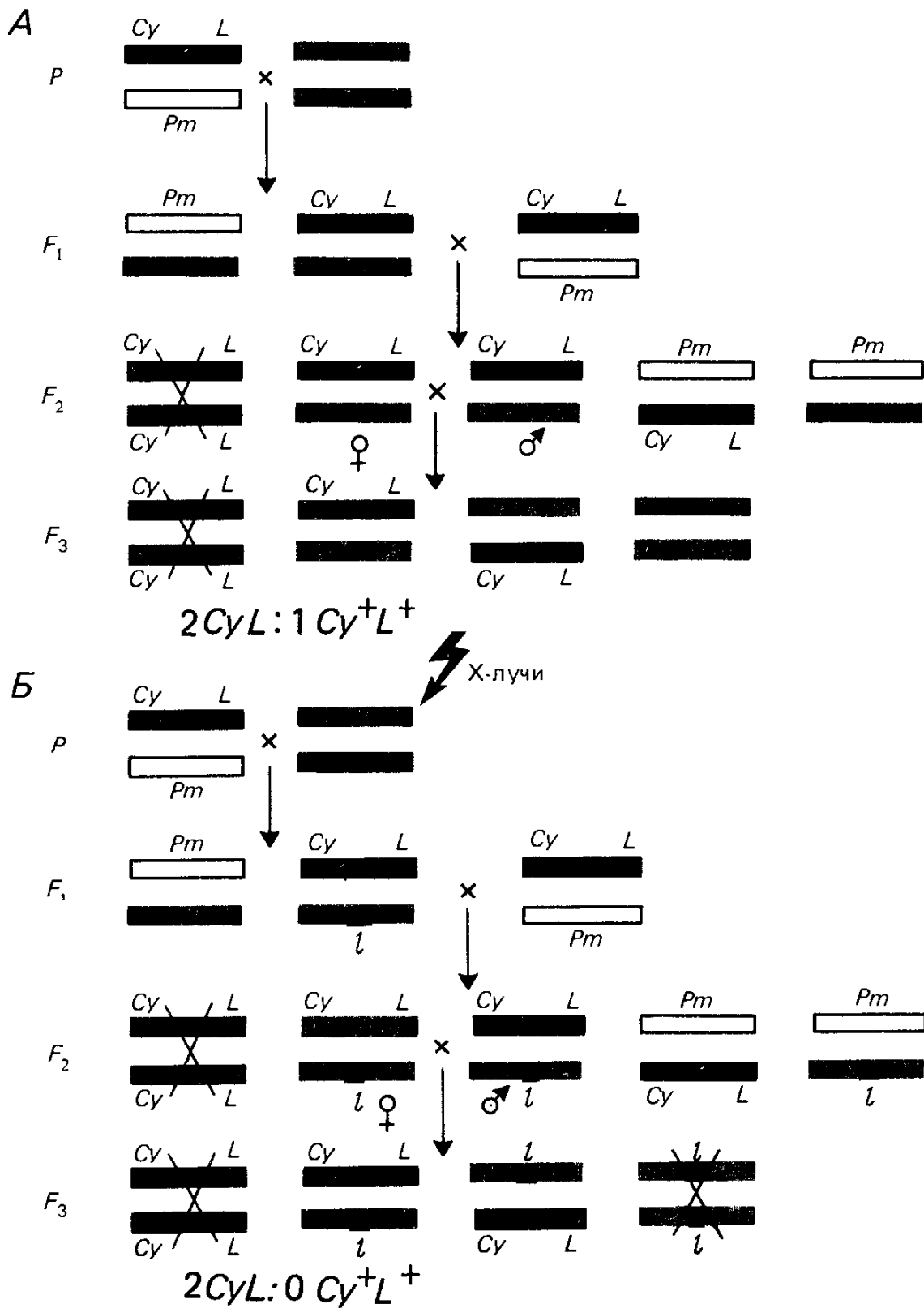


Рис. 12.7. Метод сбалансированных леталей по хромосоме 2 дрозофилы для учета в них рецессивных мутаций. А — мутации не возникли; Б — в хромосоме 2 возникла рецессивная летальная мутация

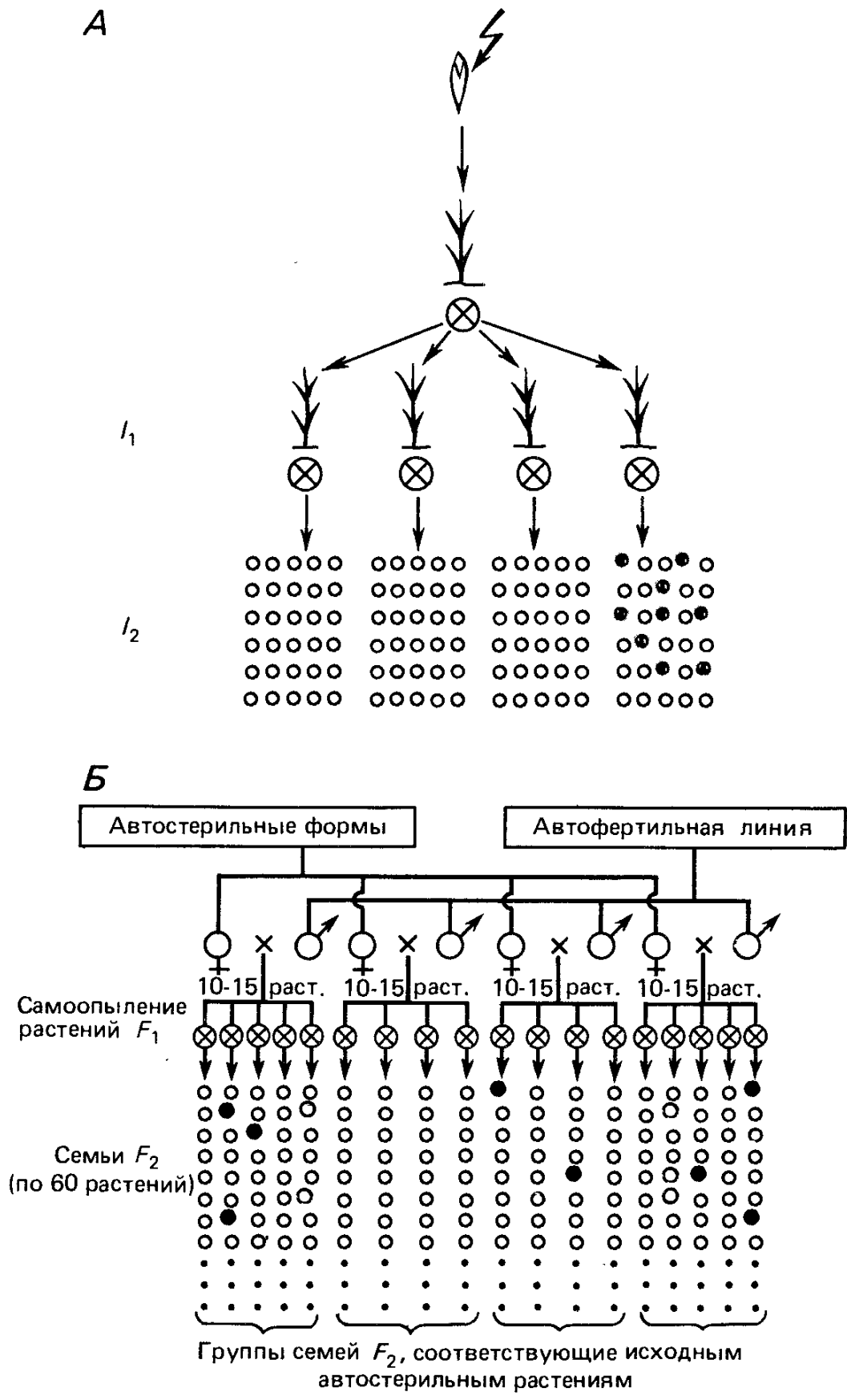


Рис. 12.8. Схема закладки самоопыляющихся линий для учета рецессивных мутаций у растений (по В. Г. Смирнову и С. П. Соснихиной, 1981). А — автофертильных; Б — автостерильных с использованием автофертильных форм.

Цветные кружки — мутантные растения

Учет рецессивных мутаций у высших растений удобнее всего проводить на самофертильных (см. гл. 8) формах, к которым относятся прежде всего самоопыляющиеся виды. У них после обработки мутагенами семян или пыльцы закладывают индивидуальные линии и в I_2 (так называют второе поколение, полученное от самоопыления) изучают потомство согласно схеме рис. 12.8, А. Мутации у самосовместимых видов растений изучены лучше, чем у самонесовместимых форм, размножающихся перекрестным опылением. В последнем случае закладке индивидуальных (самоопыляющихся) линий должен предшествовать этап скрещивания с самофертильными мутантными формами, которые получены у ряда перекрестно опыляющихся растений. Этот принцип впервые был применен В. Г. Смирновым и С. П. Соснихиной для анализа наследственной изменчивости в популяциях ржи (рис. 12.8, Б).

12.5. Причины генных мутаций

До сих пор говорилось о мутациях в широком смысле слова. Например, рецессивные сцепленные с полом летальные мутации могут быть генными, но чаще всего — различными хромосомными абберациями. Для детального изучения механизмов мутационного процесса мутации необходимо классифицировать по характеру изменения генетического материала (см. с. 293). Рассмотрим подробнее генные мутации и причины их возникновения.

Основное внимание при изучении генных мутаций уделяют изменениям чередования пар нуклеотидов в ДНК и прежде всего изменениям, затрагивающим отдельные пары нуклеотидов, которые составляют класс *точковых* или *точечных* мутаций. Более крупные изменения генетического материала будут рассмотрены в следующих двух главах.

Точковые мутации представляют собой изменения пар нуклеотидов ДНК (или нуклеотида РНК). Далее этот класс мутаций подразделяется на следующие группы:

а) *транзиции* — такие замены пар нуклеотидов ($AT \rightleftharpoons GC$), которые не изменяют ориентации: пурин — пиримидин в пределах пары (рис. 12.9, А);

б) *трансверсии* — замены пар нуклеотидов ($AT \rightleftharpoons CG$, $AT \rightleftharpoons TA$, $GC \rightleftharpoons CG$), изменяющие ориентацию (рис. 12.9, Б); -

в) *вставка* лишней пары нуклеотидов;

г) *выпадение* пары нуклеотидов.

В соответствии с физиологической теорией мутационного процесса мутации следует рассматривать как побочные продукты нормальных процессов клеточной физиологии. В последнее время получила распространение концепция Р. фон Борстела, согласно которой мутации возникают в результате «ошибок трех Р»: репликации, репарации и рекомбинации. Такие ошибки проис-

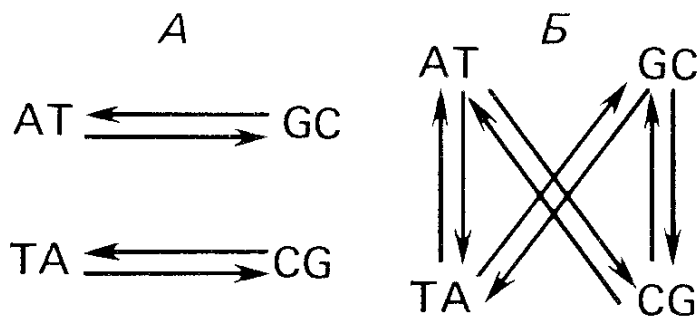


Рис. 12.9. Точковые мутации. А — транзиции;
Б — трансверсии

ходят спонтанно и под влиянием мутагенов. В связи с этим вполне понятно, что решающую роль в понимании механизмов мутагенеза сыграло изучение энзимологии репликации, репарации, рекомбинации и их генетического контроля. Оказалось, что многие гены, контролирующие эти процессы, одновременно контролируют частоту спонтанного и индуцированного мутационного процесса.

Репликация и мутационный процесс. По Дж. Уотсону и Ф. Крику, одна из причин мутаций — возможность существования оснований ДНК в нескольких *таутомерных формах*. Если аденин находится в обычной аминной форме, он спаривается с тиминном. Будучи в редкой иминоформе, аденин образует пары с цитозином. Этот таутомерный переход аденина при последующей репликации может обеспечивать транзиции $AT \rightarrow GC$. Редкий енольный таутомер тимина способен образовать пару с гуанином и это также приведет к замене пары нуклеотидов. В дальнейшем расчеты показали, что все транзиции и трансверсии можно объяснить некоторой неоднозначностью соответствия между отдельными нуклеотидами в комплементарных цепях ДНК. Прямым указанием на участие процесса репликации в мутагенезе было открытие мутагенного эффекта аналогов оснований ДНК: *5-бромурацила* и *2-аминопурина*, вызывающих мутации у бактериофагов и бактерий.

5-бромурацил включается в ДНК вместо тимина и образует пары с аденином (рис. 12.10, А). При этом возможно ошибочное спаривание с гуанином (рис. 12.10, Б) при репликации ДНК, уже включившей 5-бромурацил (*ошибка репликации*), а возможна ошибка при включении аналога в ДНК (*ошибка включения*). В первом случае в результате ошибки репликации происходят транзиции $AT \rightarrow GC$, а во втором — в результате ошибки включения — транзиции $GC \rightarrow AT$ (рис. 12.10, В, Г). Аналогичны ошибки включения и ошибки репликации и при действии другого аналога оснований — 2-аминопурина (рис. 12.11).

Необходима репликация и для мутаций, индуцированных *азотистой кислотой*, дезаминирующей аденин, цитозин и гуанин. Взаимодействие азотистой кислоты с первыми двумя основаниями приводит соответственно к транзициям $AT \rightarrow GC$ и $GC \rightarrow AT$. Про-

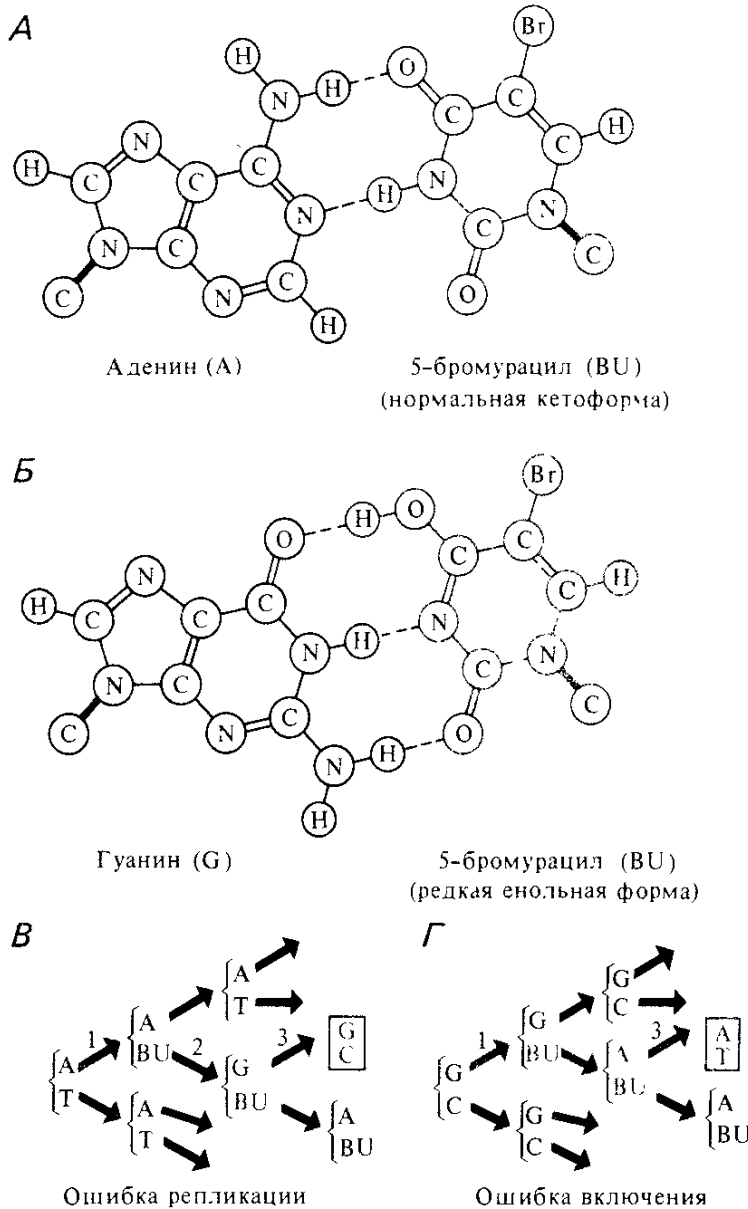


Рис. 12.10. Механизм мутагенного действия 5-бромурацила (по Г. Стенту, 1974, с дополнениями).

А — спаривание 5-бромурацила (ВU) с аденином и **Б** — с гуанином (внизу — два механизма индукции транзиций); **В** — ошибка репликации, состоящая в том, что ВU включается при репликации (1) на место Т, а затем спаривается, находясь в редкой енольной форме, с G (2); в третьем цикле репликации (3) G нормально спаривается с С, и таким образом завершается переход АТ → GС. **Г** — ошибка включения, состоящая в том, что ВU в редкой енольной форме спаривается с G (1), а затем в обычной кетоформе спаривается с А (2); в третьем цикле репликации (3) А нормально спаривается с Т, и таким образом завершается переход GС → АТ

дукт дезаминирования гуанина — *ксантин* — образует пары так же, как гуанин с цитозином, поэтому мутации не возникают (рис. 12.12). Азотистая кислота — высокоэффективный мутаген для вирусов, бактерий и эукариот.

Спонтанная мутабельность повышается в результате мутационного изменения генов, контролирующих репликацию ДНК. Так, Дж. Спейер в 1965 г. обнаружил, что некоторые мутанты по гену 43 бактериофага Т4 отличаются повышенной частотой возникновения спонтанных мутаций в других генах бактериофага. В частности, некоторые мутанты по гену *rII*, контролирующему скорость лизиса бактерии, ревертировали к дикому типу $rII \rightarrow r^{+}$ в 2000 раз чаще, чем обычно. Таким образом, эта мутантная аллель гена 43 обладала свойствами *мутатора*.

Ген 43 фага Т4 контролирует репликативную ДНК-полимеразу, которая обладает двумя активностями: $5' \rightarrow 3'$ -полимеразной и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной. Последняя выполняет функции коррекции (см. гл. 6) при репликации ДНК.

Были обнаружены и мутанты фага Т4 по гену 43 со сниженной (по сравнению со спонтанной) мутабельностью. У этих мутантов также был понижен мутагенез под действием 2-аминопурина. Следовательно, эта мутантная аллель гена 43 обладала свойствами

антимутатора. Поскольку антимутаторная полимеразы в экспериментах *in vivo* подавляла мутагенез, индуцированный 2-аминопурином, были проведены эксперименты *in vitro* с использованием этого аналога оснований в качестве субстрата в ДНК-полимеразной реакции. Оказалось, что антимутаторная ДНК-полимераза включает меньше 2-аминопурина в ДНК, чем полимеразы дикого типа или мутаторная полимеразы. Исследования нескольких мутантов показали, что отношение полимеразной к экзонуклеазной активности, как правило, уменьшается в ряду мутатор > дикый тип > антимутатор. Эти результаты согласуются с тем, что 3'→5'-экзонуклеазная активность, обнаруженная у всех ДНК-полимераз (см. гл. 6), выполняет функцию коррекции, отщепляя ошибочно включенные в ДНК основания. Таким образом, частота ошибок репликации зависит от соотношения полимеразной и экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы.

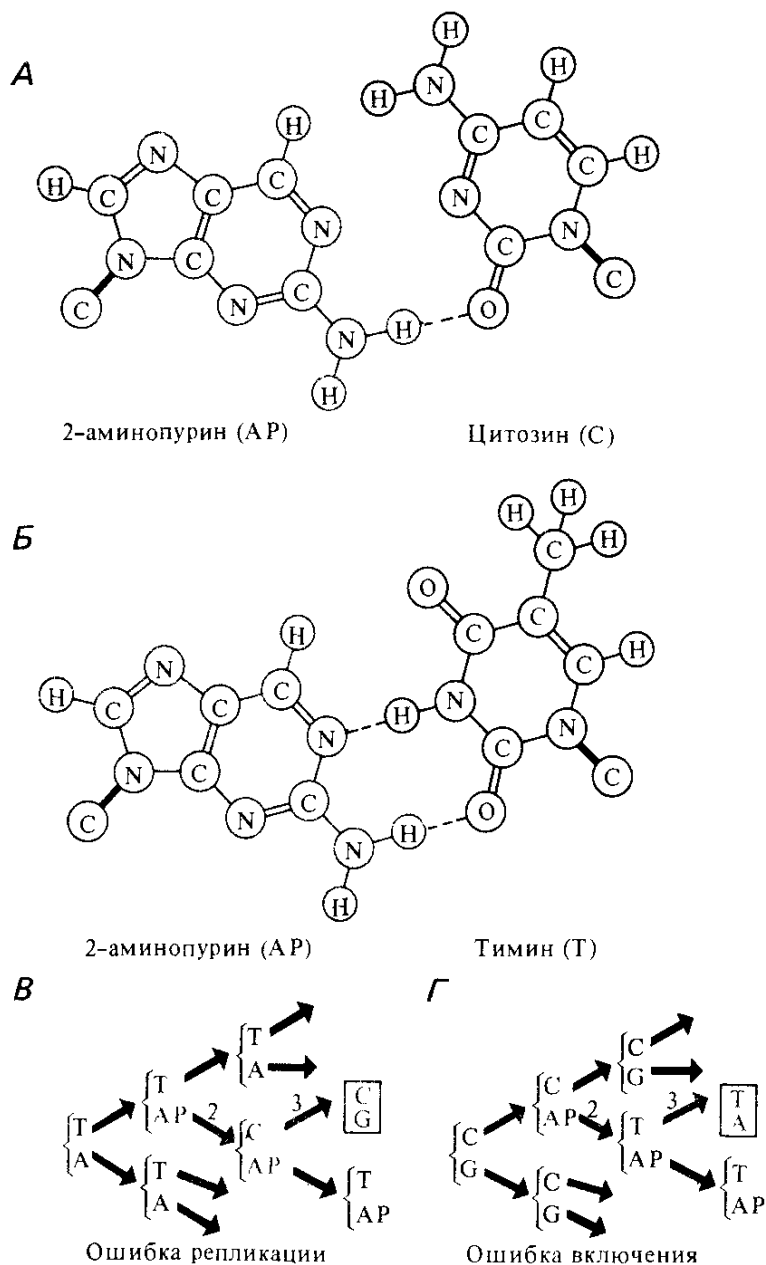


Рис. 12.11. Механизм мутагенного действия 2-аминопурина (по Г. Стенту, 1974, с дополнениями). Спаривание 2-аминопурина с цитозином (А) и тиминном (Б). Внизу — два механизма индукции транзиций. В — ошибка репликации, состоящая в том, что AP включается при репликации (1) на место А, а затем спаривается с С (2); в третьем цикле репликации (3) С нормально спаривается с G, и таким образом завершается переход АТ → GС. Г — ошибка включения, состоящая в том, что AP спаривается с С (1), а затем нормально спаривается с Т (2); в третьем цикле репликации Т спаривается с А, и таким образом завершается переход GС → АТ

Мутаторную и антимутаторную активность проявляют и аллели других генов, контролирующих репликацию: гены, кодирующие ДНК-лигазу, ДНК-связывающие белки и другие белки комплекса реплисомы (см. гл. 6).

Зависимость частоты мутаций от состояния ДНК-полимеразы подтверждают также данные о мутаторной активности аллелей

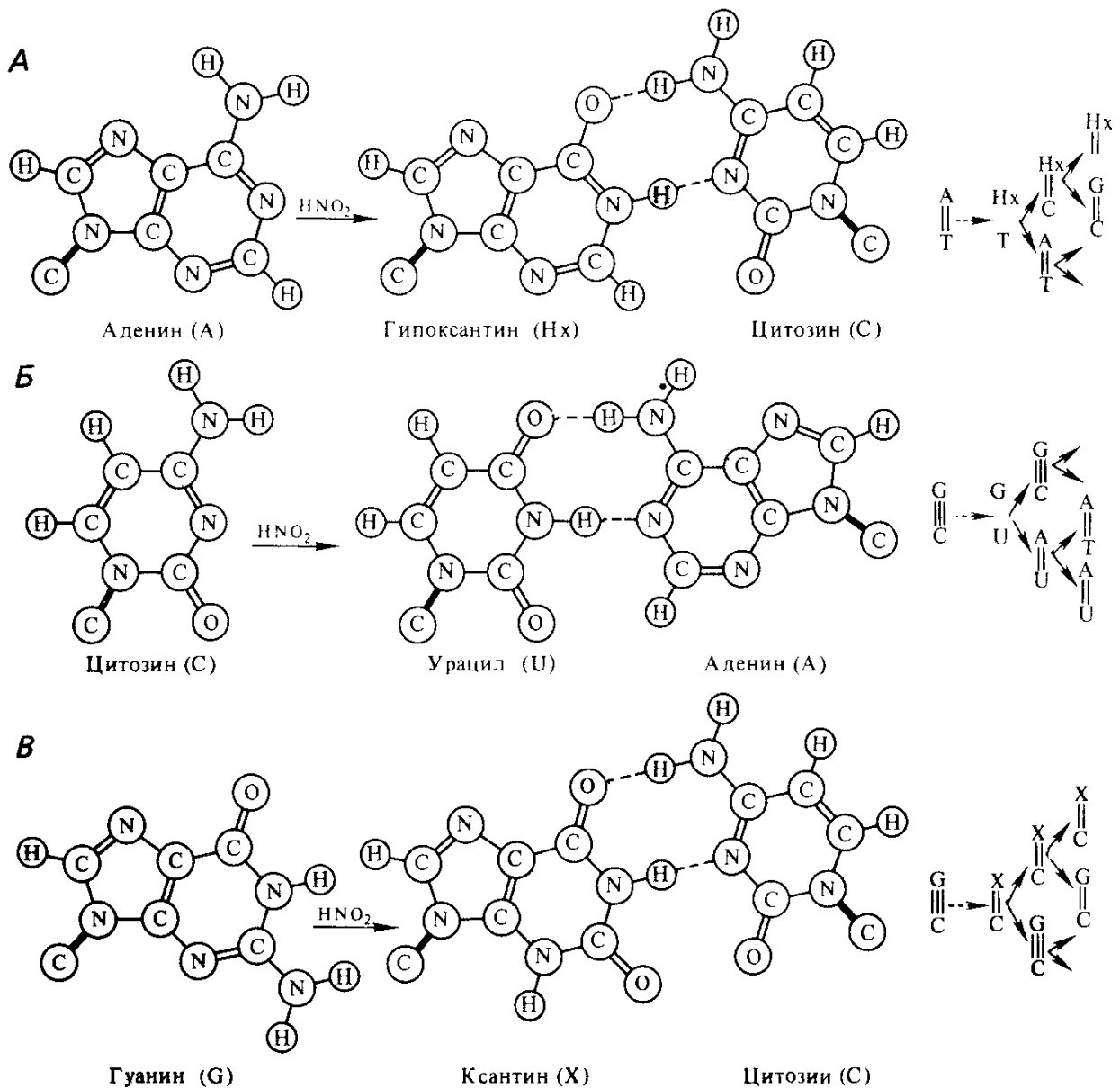


Рис. 12.12. Схема возникновения транзиций в результате окислительного дезаминирования оснований ДНК азотистой кислотой (по Дж. Уотсону, 1978, с дополнениями из Г. Стента, 1974).

А — аденин дезаминируется до гипоксантина, который спаривается с цитозином; Б — цитозин дезаминируется до урацила, который спаривается с аденином; В — гуанин дезаминируется до ксантина, который продолжает, как и гуанин, спариваться с цитозином.

Таким образом, дезаминирование гуанина не влечет за собой мутаций. Справа — последовательные стадии спаривания оснований при репликациях ДНК, обработанной азотистой кислотой

гена *dna E*, контролирующего ДНК-полимеразу III у *E. coli*, а также обнаружение мутагенной ДНК-полимеразы в клетках человека, больного лейкемией.

Изучение мутационного процесса в связи с репликацией ДНК позволило выявить некоторые высокоэффективные мутагены, действующие непосредственно в репликативной вилке. К их числу относится N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ), который взаимодействует с одноцепочечными участками в вилке репликации или действует непосредственно на ферменты реплисома.

Репарация и мутационный процесс. Мутации некоторых генов, ответственных за репарацию у *E. coli*, бактериофага Т4, дрожжей,

а также в клетках высших эукариот, проявляют мутаторный или антимутаторный эффект, подобно мутациям в генах, ответственных за репликативный комплекс.

Наиболее подробно участие процессов репарации в возникновении мутаций исследовано у бактерии *E. coli*. Показано, что мутация в гене *uvr E*, контролирующем ликвидацию однонитевых разрывов после ультрафиолетового (но не ионизирующего) облучения, повышает спонтанное возникновение транзиций АТ→ГС в 350—400 раз, а транзиций ГС→АТ в 150—200 раз. Она повышает также частоту мутаций, индуцированных ультрафиолетовым светом и метилметансульфонатом.

Изучение генетического контроля репарации (а также рекомбинации) позволило доказать участие некоторых нормальных процессов, происходящих в клетке, в превращении *предмутационных изменений* ДНК в мутации. В частности, оказалось, что процесс становления мутаций может быть генетически блокирован так же, как любой другой физиологический процесс. Так, изменение генов *lex A* или *rec A* ведет к частичному или полному подавлению мутационного процесса под действием ультрафиолетового света, ионизирующих излучений и некоторых химических мутагенов.

Э. Виткин обратила внимание на связь нескольких явлений, для которых общей причиной служит облучение клеток ультрафиолетовым светом: 1) индукция профага λ ; 2) повышение выживаемости облученного бактериофага λ при заражении им предварительно облученных клеток *E. coli* по сравнению с выживаемостью в необлученных клетках — так называемая *W-реактивация*, открытая Дж. Уэйглом; 3) блокирование клеточных делений у некоторых мутантов *E. coli*, в результате чего клетки приобретают нитевидную форму; 4) повышение частоты рекомбинации; 5) повышение частоты мутаций.

Оказалось, что *W-реактивация* бактериофага сопровождается повышением его мутабельности. Кроме того, явление *W-реактивации* так же зависит от дозы ультрафиолетового света, как и индукция профага λ . Для осуществления обоих процессов требуется нормальное состояние генов *rec A*⁺ и *lex A*⁺. У мутантов *rec A* и *lex A* они подавлены, как и образование нитей, не говоря уже о мутагенезе, индуцированном ультрафиолетовым светом.

Параллелизм в проявлении индукции профага и *W-реактивации* (сопровождаемой повышением мутабельности) указывает на существование индуцируемой системы репарации, которая в связи с этим получила наименование *SOS-репарации*, т. е. репарации, включаемой для спасения. (Подробнее о системах регуляции действия генов см. гл. 17.) Индуцибельная система репарации действует по механизму пострепликативной репарации. На это указывает ее зависимость от гена *rec A* (см. гл. 6). *SOS-репарация* включается в тех случаях, когда «безошибочная» дорепликативная система репарации не справляется с устранением повреждений или когда она блокирована мутационным путем. Для индукции системы *SOS-репарации* требуется 30—60 димеров тими́на на ге-

ном *E. coli*. Сигналом индукции служит задержка репликации, которая при этом наблюдается.

Связь повышенной спонтанной мутабельности с дефектами системы репарации у дрожжей-сахаромицетов была обнаружена в 1968 г. в лаборатории И. А. Захарова в СССР и в лаборатории Р. фон Борстела в США при изучении мутантов, чувствительных к действию излучений.

Связь репарации и мутационного процесса показана для *Drosophila melanogaster*. Так, при действии кофеина на недокармливаемых мух наблюдается четкий антимутагенный эффект, судя по критерию спонтанных потерь X-хромосомы. Известен мутатор *tu* у дрозофилы, в присутствии которого мухи проявляют повышенную чувствительность к рентгеновым лучам и метилметансульфонату. Мутатор *tu* находится в непосредственной близости к мутации *C(3)G*, блокирующей мейотическую рекомбинацию.

Рекомбинация и мутационный процесс. Связь между мутационным процессом и рекомбинацией следует из общности некоторых ферментативных этапов репликации, репарации и кроссинговера. Кроме того, источником мутаций могут быть ошибки рекомбинации, приводящие к появлению новых аллелей. Единство генетического контроля рекомбинации и мутационного процесса можно проиллюстрировать несколькими примерами: у дрожжей известны мутанты с повышенной частотой митотического кроссинговера, которые одновременно обнаруживают повышенную мутабельность и чувствительность к действию излучений. Мутанты, проявляющие способность к повышенной частоте рекомбинации и одновременно проявляющие повышенную спонтанную мутабельность, получены у *E. coli*.

На связь самого процесса рекомбинации с возникновением мутаций указывает корреляция обменов гомологичных участков хромосом с изменениями генов в непосредственной близости к ним. Так, у *Bacillus subtilis* трансформация сопровождается повышением мутабельности. Известно, что мутаген *профлавин* (диаминоакридин) вызывает вставки и выпадения оснований у бактериофагов, но он практически не мутагенен для бактерий. Тем не менее с его помощью удалось получить мутантов у *E. coli* в процессе конъюгации. Такой результат согласуется с точкой зрения о мутагенном действии акридинов в процессе рекомбинации.

Наиболее подробно охарактеризован мутагенный эффект рекомбинации у дрожжей. В начале 60-х годов К. Маньи и Р. фон Борстел описали у *Sacch. cerevisiae* так называемый *мейотический эффект*, который заключается в том, что некоторые типы спонтанных мутаций возникают в мейозе чаще, чем в митозе. Это касалось появления и ревертирования мутаций-вставок или выпадений пар оснований. У другого вида дрожжей — *Schizosaccharomyces pombe* У. Лойпольд с сотрудниками среди 118 спонтанных мутантов по локусу *ade 1*, полученных в митозе, не нашли ни одного, ревертирующего под действием производного акридин-иприта — ICR-170, способного вызывать вставки и выпадения оснований, в то время как

среди 59 мутантов, полученных в мейозе, 7 ревертировали под действием этого соединения. Следовательно, в ходе мейотической рекомбинации могут происходить мутации вставки и выпадения оснований.

Вклад рекомбинации в мутационный процесс не ограничивается только ее ошибками. Целый ряд мутаций может возникать в результате реципрокной рекомбинации, например хромосомные аберрации, а также некоторые другие, рассматриваемые в следующей главе.

12.6. Предмутационные изменения генетического материала

Закономерности изменчивости изучены значительно хуже, чем закономерности наследственности. Мутационный процесс случаен. Это значит, что неизвестно, когда и в каком гене произойдет мутация, какой признак будет изменен, будет ли мутация полезной или вредной для организма. Тем не менее, связывая мутационный процесс с системами регулируемой SOS-репарации, следует искать пути регулирования частоты мутаций.

Еще в начале 20-х годов А. Стертевант, а затем Н. И. Шапиро, на основе исследований *D. melanogaster* предложили рассматривать мутабельность как адаптивный признак вида. Действительно, зная о существовании генов-мутаторов и антимутаторов, повышающих и понижающих спонтанную частоту мутаций, характерную для организмов дикого типа, следует принять, что частота мутаций в природе оптимизирована на каком-то определенном уровне.

Так, Дж. Дрейк обратил внимание на то, что у различных микроорганизмов — бактерий, бактериофагов, грибов — общая частота спонтанного мутирования в пересчете на репликацию генома приблизительно одинакова — около 1 %. Поскольку величина генома у микроорганизмов варьирует более чем в 1000 раз, и средняя мутабельность в пересчете на пару нуклеотидов или на один ген среднего размера должна варьировать обратно пропорционально размеру генома, т. е. более чем в 1000 раз. Пока неизвестно, каким образом выравнивается частота мутаций в пересчете на гаплоидный геном и почему у диплоидных организмов эта величина, по некоторым данным, возрастает почти до 100% на геном за половое поколение.

Еще в конце 40-х — начале 50-х годов А. Новик и Л. Сциллард обнаружили, что при выращивании бактерий в хемостате частота мутаций пропорциональна продолжительности клеточной генерации, а не числу делений. Это означало, что мутации могут происходить не только при удвоении генов. Ф. Райан показал, что спонтанные мутации осуществляются в покоящихся клетках *E. coli*, в которых не удается обнаружить синтез ДНК. Спонтанные мутации накапливаются при хранении сухих семян, в покоящихся спорах актиномицетов, в нереплицирующихся частицах бактериофагов.

Учитывая, что мутационное изменение гена — процесс, длящийся во времени, по-видимому, можно говорить о том, что в покоящихся спорах, семенах, бактериофагах происходят предмутационные изменения, которые реализуются при последующем синтезе ДНК. При этом следует иметь в виду, что синтез ДНК идет не только при воспроизведении генов, но и при репарации и рекомбинации.

Какова природа предмутационных, или потенциальных, изменений генетического материала и какова их дальнейшая судьба? Из материала этой главы становится очевидным, что лишь небольшая часть повреждений генетического материала превращается затем в мутационные изменения. Большая часть их устраняется системами репарации. Один из способов выявления потенциальных изменений генов был предложен М. Е. Лобашевым. Это последова-

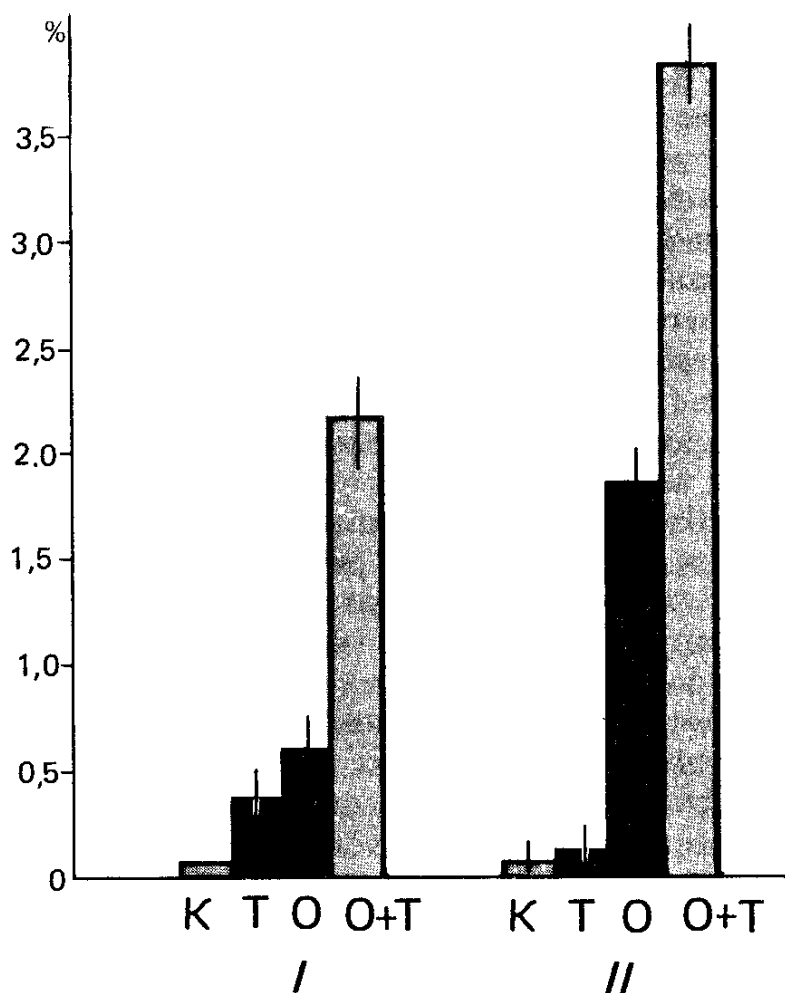


Рис. 12.13. Реализация потенциальных повреждений, вызываемых рентгеновскими лучами у *D. melanogaster* (К. В. Ватти, 1961; М. М. Тихомирова, 1979).

Показана зависимость частоты рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций от дополнительного действия повышенной температуры. I — самки линии uw/y^+Y (ооциты); II — самцы линии Кантон-С (сперматогонии). К — контроль (без воздействия); Т — температура 37°C в течение 8 ч; О — рентгеновские лучи 0,258 Кл/кг, т. е. 1000 р (I) или 4,07 Кл/кг, т. е. 1500 р (II); О + Т последовательное действие облучения и температуры

тельное действие двух факторов — мутагенного, например рентгеновых лучей, и немутагенного — повышенной температуры. М. М. Тихомирова и К. В. Ватти применили этот подход к исследованию мутационного процесса у дрозофилы. Оказалось, что значительная доля потенциальных изменений, вызываемых рентгеновыми лучами, обычно устраняемых репарацией, может быть превращена в мутации при последующем действии повышенной температуры (рис. 12.13). Это явление получило название *эффекта последствия*.

Изучение путей становления мутационного изменения имеет решающее значение для понимания механизмов мутационного процесса. Эти пути зависят от

действия различных агентов, например, аналоги азотистых оснований индуцируют мутации, по-видимому, «избегая» контроля со стороны систем репарации, а ультрафиолетовый свет, приводящий к локальным нарушениям структуры ДНК, запускает репарацию, склонную к ошибкам. Отсюда по аналогии с путями метаболизма возникает концепция путей мутационного процесса, которые могут быть исследованы с применением методов их генетического блокирования, как явствует из материала этой главы.

Разработка методов генной инженерии (см. гл. 11) позволила проводить мутагенез *in vitro* на выделенных индивидуальных генах, изменяя и заменяя участки ДНК по желанию экспериментатора. Такой подход — крупный шаг на пути к направленному изменению генетического материала, однако и он не избавляет от необходимости изучать закономерности мутационного процесса, происходящего в клетке и организме.

Вопросы к главе 12

1. Какие способы классификации мутаций вам известны?
2. Что такое транзиции? Трансверсии?
3. Чем отличается наследование соматических мутаций от наследования генеративных мутаций?
4. Каковы функции генов, мутации в которых приводят к повышению уровня спонтанной мутабельности?
5. В чем заключается физиологическая гипотеза мутационного процесса, кем впервые она была высказана?
6. Какие типы генных мутаций могут ревертировать под действием 5-бромурацила?
7. Какой из трех типов мутаций, происходящих у человека, — аутосомная рецессивная, аутосомная доминантная, сцепленная с полом рецессивная — имеет наибольшие шансы проявиться в следующем поколении?
8. Какие типы генных мутаций у бактериофага могут ревертировать под действием диаминоакридина?
9. Дайте определения понятий «мутация», «мутант».
10. Какие известны методы учета мутаций: а) у дрозофилы, б) у высших растений, в) у микроорганизмов?
11. Чем отличаются обратные мутации и реверсии?
12. При высеве на среду без гистидина 10^9 клеток культуры *E. coli*, нуждающейся в этой аминокислоте, выросло 175 колоний. Можно ли на основе этих данных определить частоту спонтанного мутирования $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$? Прокомментируйте ответ.
13. После воздействия ультрафиолетовым светом на среде со стрептомицином выросло в среднем по 12,5 колоний *E. coli* на чашку. Без облучения на среде без стрептомицина выросло в среднем по 173,7 колоний на чашку. Разведения в обоих вариантах одинаковы. Можно ли по этим данным определить частоту индуцированных мутаций устойчивости к стрептомицину? Необходимы ли дополнительные данные? Какие?
14. У самоопыляющегося растения в опыте, согласно схеме рис. 12.8, А, мутантное потомство возникло уже в F_1 . Предложите объяснение.
15. Подсчитайте частоту спонтанных реверсий на клетку за одно клеточное деление (рис. 12.4), если каждая микроколония содержит 1×10^5 клеток. Проведите аналогичные расчеты по данным рис. 12.4, Б.
16. Гидроксиламин вызывает замены GC→AT или GC→TA. Мутант *E. coli* ревертирует под действием 5-бромурацила и 2-аминопурина, но не под действием гидроксиламина. Что можно сказать о молекулярной природе прямой мутации?

Хромосомные перестройки

В соответствии с классификацией мутаций в зависимости от характера изменения генетического материала наряду с генными мутациями принято рассматривать хромосомные мутации. Их называют также хромосомными перестройками или хромосомными абберациями. Они представляют собой перемещения генетического материала, приводящие к изменению структуры хромосом в пределах кариотипа. В такие перестройки могут быть вовлечены участки одной хромосомы или разных — негомологичных — хромосом. В соответствии с этим критерием выделяют абберации внутрихромосомные и межхромосомные (рис. 13.1).

Внутрихромосомные перестройки подразделяют на *дефиенсии*, или концевые нехватки; *делеции* — выпадения частей хромосомы, не захватывающие теломеры; *дупликации*, или удвоения (умножения) части хромосомы; *инверсии* — изменения чередования генов в хромосоме вследствие поворота участка хромосомы на 180° .

Межхромосомные перестройки включают *транслокации* — перемещения части одной хромосомы на другую, не гомологичную ей.

Особое положение занимают *транспозиции* и *инсерции* — изменения локализации небольших участков генетического материала, включающих один или несколько генов. Транспозиции могут происходить как между негомологичными хромосомами, так и в пределах одной хромосомы. Поэтому транспозиции занимают промежуточное положение между внутрихромосомными и межхромосомными перестройками.

С точки зрения цитологически регистрируемых картин абберации подразделяют на *хромосомные* и *хроматидные*. Эта классификация связана исключительно со временем возникновения перестроек — до или после репликации хромосом.

При изучении хромосомных аббераций решающее значение имеет объединение цитологического и генетического методов. На их взаимодействии основывается большой раздел генетики — *цитогенетика*. Изменение структуры одной из пары гомологичных хромосом или двух и более хромосом, входящих в разные пары гомологов, удобнее всего изучать в профазе мейоза — во время конъюгации. Поскольку конъюгация осуществляется очень точно по длине хромосом — хромомер к хромомеру на стадии пахитены, абберации влекут за собой изменение характера конъюгации. Еще удобнее для этой же цели использовать

политенные (гигантские) хромосомы двукрылых, поскольку они находятся в состоянии соматической конъюгации.

Хромосомные перестройки часто приводят к различным фенотипическим изменениям, которые объясняются локализацией точек разрывов внутри или вблизи тех или иных генов.



Рис. 13.1. Типы хромосомных перестроек

13.1. Делеции и дефишенси

Вследствие нехваток хромосомы укорачиваются, и физическое отсутствие участка одного из гомологов приводит к гемизиготному состоянию генов, находящихся в нормальном гомологе. Если теряются доминантные аллели одного из гомологов гетерозиготы, то наблюдается фенотипическое проявление рецессивных аллелей хромосомы, не затронутой абберацией.

В X-хромосоме *D. melanogaster* известна доминантная мутация *Notch*, приводящая в гетерозиготе к появлению вырезки на крыле. В гомозиготном или гемизиготном состоянии эта мутация летальна, т. е. обладает летальным действием, поэтому она всегда поддерживается в гетерозиготе. При скрещивании гетерозиготных самок $N/+$ с самцами uwf в F_1 половина самок имеет дикий фенотип, половина — вырезку на крыле и белые глаза. Это объясняется тем, что *Notch* представляет собой делецию, захватывающую локус w , но не u и f , находящиеся слева и справа от w .

Поскольку вследствие делеций теряются участки хромосом, у гетерозигот по этим перестройкам наблюдаются характерные нарушения конъюгации гомологов. Более длинная нормальная хромосома образует петлю на участке, соответствующем делеции (рис. 13.2).

Уже отмечалось, что делеции и дефишенси были использованы для сравнения генетических и цитологических карт хромосом (см. гл. 5). Наборы независимо полученных и перекрывающихся делеций в одной хромосоме используют для точной локализации гена на цитологической карте. Это возможно для объектов с хорошо различимой дифференциацией хромосом по длине, например, пахитенных хромосом кукурузы или политенных хромосом двукрылых, а также благодаря дифференциальной окраске хромосом. Границы делеций уточняют по нарушению конъюгации и изменению рисунка хромосом. По проявлению или не проявлению рецессивной аллели в гетерозиготе с делецией устанавливают, захватывает ли данная делеция исследуемый ген. Таким образом, сопоставляя данные по перекрыванию делеций и по их влиянию на экспрессию рецессивной аллели, локализуют ген на

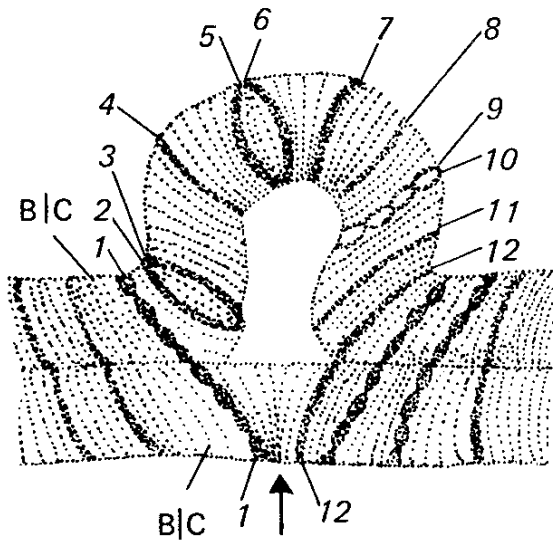


Рис. 13.2. Конъюгация гигантских хромосом *D. melanogaster* в случае делеции *Notch* в одном из гомологов (по F. Ayala, J. Kiger, 1980).

Буквы и цифры — обозначения участков X-хромосомы на цитологической карте

многих организмов, включая человека. Тяжелое наследственное заболевание *синдром кошачьего крика*, названное так по характеру звуков, издаваемых больными младенцами, обусловлено гетерозиготностью по дефиценсии в 5-й хромосоме. Этот синдром сопровождается умственной отсталостью. Обычно дети с таким синдромом рано умирают.

При отделении фрагмента хромосомы он, как правило, теряется, если не содержит центромеры. Фрагмент, содержащий центромеру, реплицируется и его копии нормально распределяются при клеточных делениях. Иногда наблюдается фрагментация хромосомы непосредственно в области центромеры. В этом случае могут возникнуть две телоцентрические хромосомы. Известны примеры, когда в результате разрыва в области центромеры возникали метацентрические хромосомы вследствие удвоения сохранившегося плеча без репликации центромеры. Это так называемые *изохромосомы*, содержащие одинаковый набор генов в обоих плечах в инвертированной последовательности: *ACDEOEDCA*, где *O* — центромера.

Фрагменты хромосом не теряются и в случае *диффузной* центромеры (см. гл. 4). По-видимому, различия по числу хромосом у некоторых видов оживки (род *Lusula*) возникли вследствие фрагментации хромосом с диффузной центромерой. Так, при скрещивании *L. sudetica*, имеющей в диплоидном наборе 48 мелких хромосом, и *L. campestris* с 12 хромосомами образуются гибриды с 30 хромосомами, которые в мейозе обнаруживают 6 унисвалентов и 6 тетравалентов. При этом с каждой из шести длинных хромосом *L. campestris* конъюгируют по три короткие хромосомы *L. sudetica*, располагаясь друг за другом вдоль длинной хромосомы.

Большие возможности для выявления делеций, дефиценсии и

хромосомной (цитологической) карте. В качестве примера на рис. 13.3 приведена локализация нескольких генов вблизи локуса *w* при помощи делеций типа *Notch*.

Делеции обычно летальны в гомозиготе, что указывает на выпадение каких-либо жизненно важных генов. Очень короткие делеции могут не нарушать жизнеспособности в гомозиготе.

Концевые нехватки, или дефиценсии, устанавливают по тем же критериям, что и делеции, однако вследствие их расположения при конъюгации не образуется петля, а одна хромосома оказывается короче другой. Примеры дефиценсии известны у

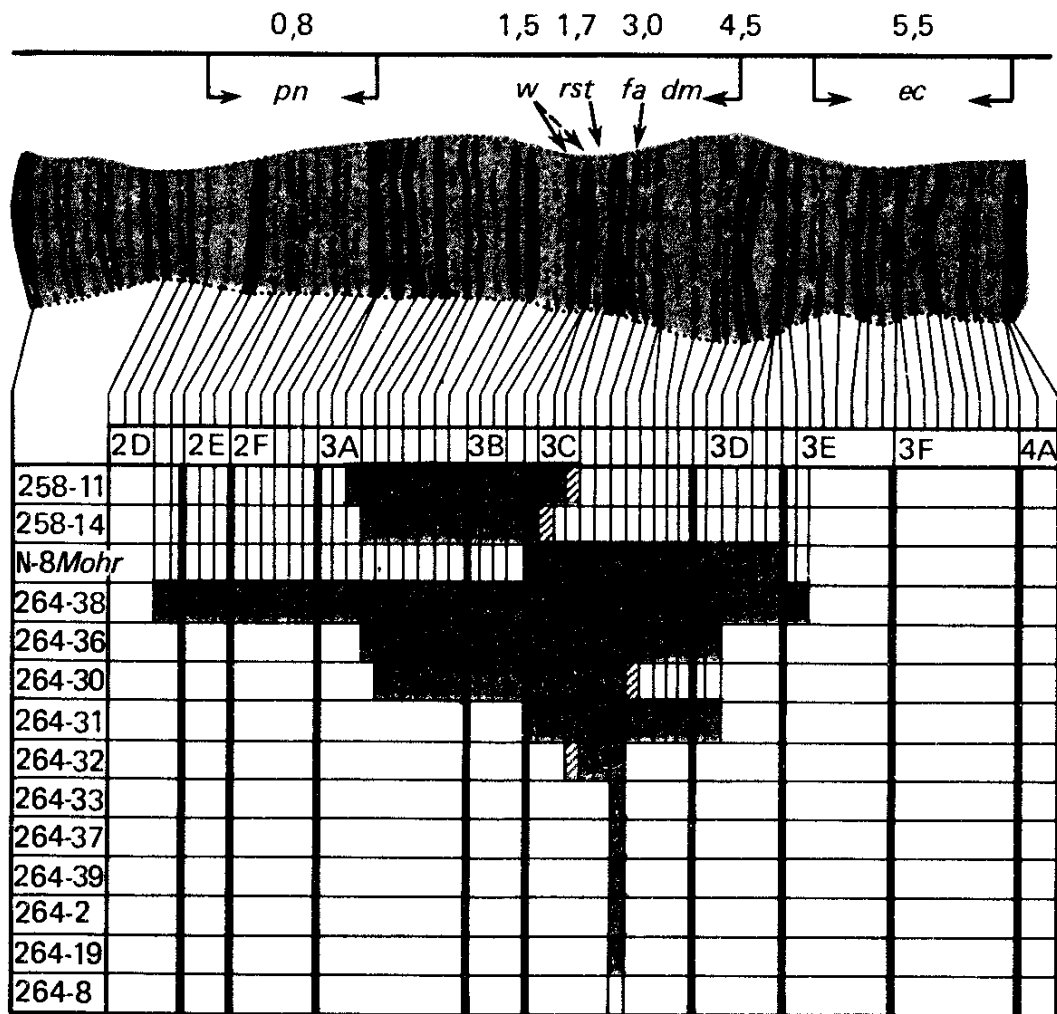


Рис. 13.3. Локализация генов в районе локуса *w* в X-хромосоме *D. melanogaster* (H. Slizynska, 1938).

В таблице показано перекрытие нескольких делеций, дающих эффект white — Notch в гетерозиготе с мутацией *w*. Красным цветом в таблице показаны делеции; если концы их локализованы неточно, участки заштрихованы. Цифры и буквы по горизонтали в таблице — обозначения дисков на политенных хромосомах; по вертикали — номера делеций. Вверху — генетическая карта: *pn* — prune, *w* — white, *rst* — roughest, *fa* — facet, *dm* — diminutive, *ec* — echinus. Над генами — их расстояния в морганидах от конца X-хромосомы

других хромосомных aberrаций открывает метод *дифференциальной окраски хромосом*. Он основан на том, что некоторые красители, например краситель Гимза, дифференциально окрашивают разные участки хромосом. Благодаря этому хромосомы приобретают характерную поперечную исчерченность. Таким методом определяют хромосомные перестройки на метафазных хромосомах.

13.2. Дупликации

Дупликации, в строгом смысле этого слова, представляют собой двукратное повторение одного и того же участка хромосомы. Известны случаи многократных повторений или *мультипликаций* какого-либо участка. Их называют также *амплификациями*.

Дупликации могут происходить в пределах одной и той же хромосомы или сопровождаться переносом копии участка генети-

ческого материала на другую хромосому (см. транспозиции, с. 336). Повторы, возникшие в одной хромосоме, могут располагаться *тандемно* (ABCBCDE...) или *инвертированно* (ABCCBDE...). Различают также *терминальные повторы*, если дупликация затрагивает конец хромосомы.

По-видимому, главной причиной множественных повторов участков генетического материала является так называемый *неравный кроссинговер*. Наиболее известный пример участия этого механизма в генерации повторов получен для локуса *Bar* (*B*) у *D. melanogaster*. Доминантная мутация *B* (полосковидные глаза) представляет собой дупликацию небольшого сегмента (16 А) у конца X-хромосомы (на 57,0 сМ от конца хромосомы). В линии, гомозиготной по *Bar*, изредка с частотой около $6 \cdot 10^{-4}$ на гамету наблюдаются реверсии — выщепление мух дикого типа B^+ , а также мух с еще более узкими глазами, чем у *B*. Этот усиленный вариант *Bar* назван ультра-*Bar* и обозначается *BB*. У мух *BB* сегмент 16 А в X-хромосоме оказался уже триплицированным, в то время как у ревертантов B^+ тот же сегмент представлен в единственном числе.

Механизм этого явления объяснил А. Стертевант еще в 1925 г. на основе генетического анализа. Участки слева и справа от *Bar* были маркированы тесно сцепленными мутациями: *f* — *forked* (56,7); *B* — *Bar* (57,0); *fu* — *fused* (59,5). Цифры в скобках — точки локализации (сМ). При скрещивании

$$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \downarrow \\ \frac{f^+ B fu^+}{f B fu} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{♂} \\ \rightarrow \\ \frac{f B^+ fu}{f B^+ fu} \end{array}$$

наряду со всеми ожидаемыми классами расщепления появлялись также мухи B^+ , нормальные по форме глаза, и *BB* — ультра-*Bar*. Те и другие были одновременно рекомбинантными по генам *f* и *fu*. Эти необычные сегреганты возникали только в результате мейоза у самок *B/B*. В реципрокной комбинации $\text{♀ } B^+/B^+ \times \text{♂ } B$ они не были получены.

Все эти результаты дали основание А. Стертеванту предположить, что мухи ультра-*Bar* и Bar^+ — реципрокные продукты неравного кроссинговера между дублированными участками X-хромосомы (рис. 13.4). Позже на материале гигантских хромосом было показано, что ультра-*Bar* — действительно тройное повторение сегмента 16 А, дублированного у мутанта и единичного у дикого типа Bar^+ .

По-видимому, и исходная «мутация» *Bar* возникла в результате неравного кроссинговера (рис. 13.5). В этом случае дупликации и делеции могут иметь общий механизм возникновения. При этом, как будет показано далее (с. 344), дупликации и делеции могут возникать в результате неравного кроссинговера между сестринскими хроматидами или даже в результате рекомбинации в пределах одной и той же хроматиды.

Фенотипическое проявление дупликаций показано на примере ряда генов у дрозофилы как рецессивных: *white* (*w*), *scute* (*sc*),

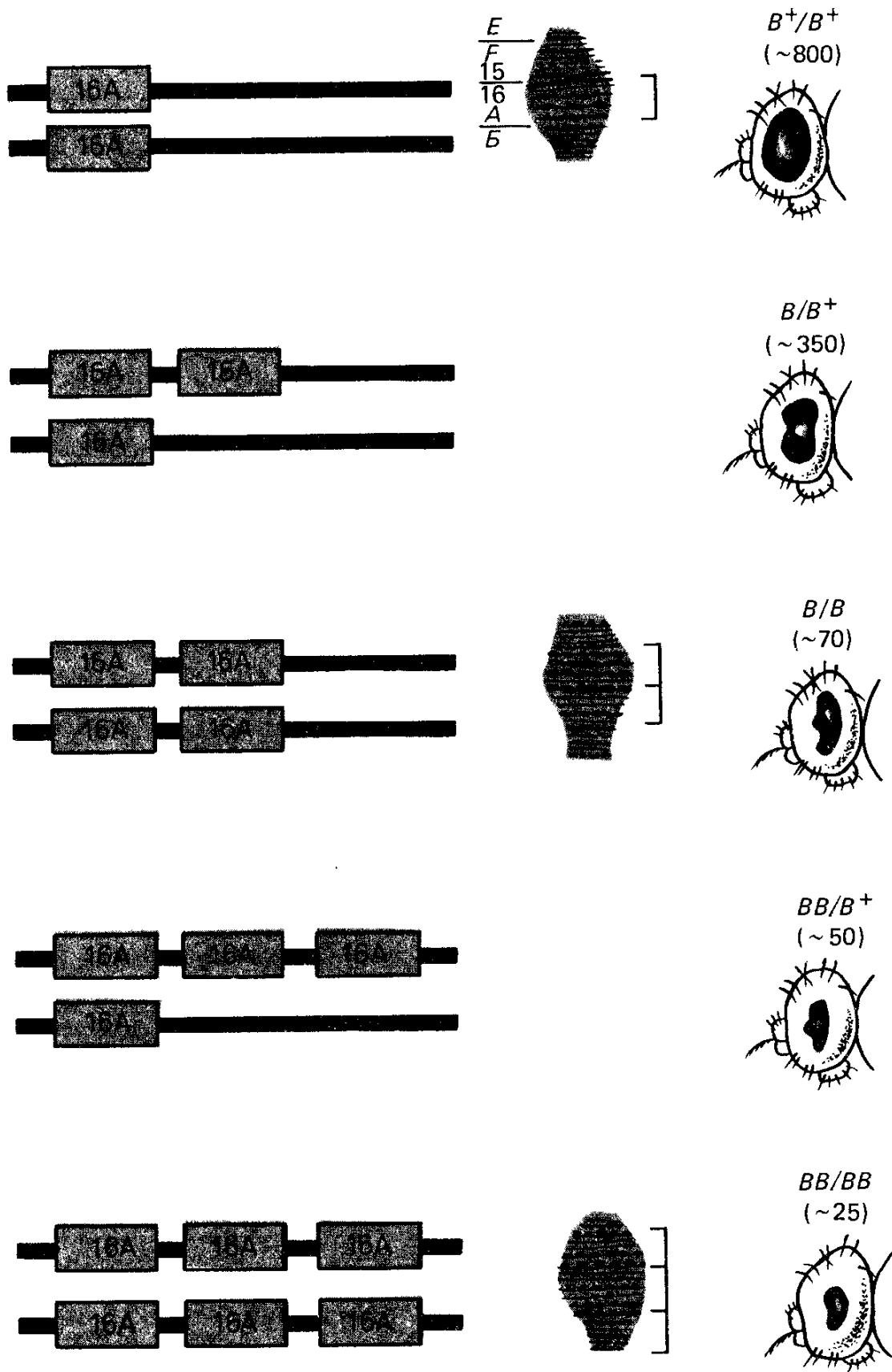


Рис. 13.4. Фенотипическое проявление повторов одного и того же участка (16A) в X-хромосоме *D. melanogaster* — изменение признака *Bar* (по Ф. Ауала, J. Kiger, 1980 с дополнениями).

В скобках — среднее число фасеток в глазах мух соответствующего генотипа

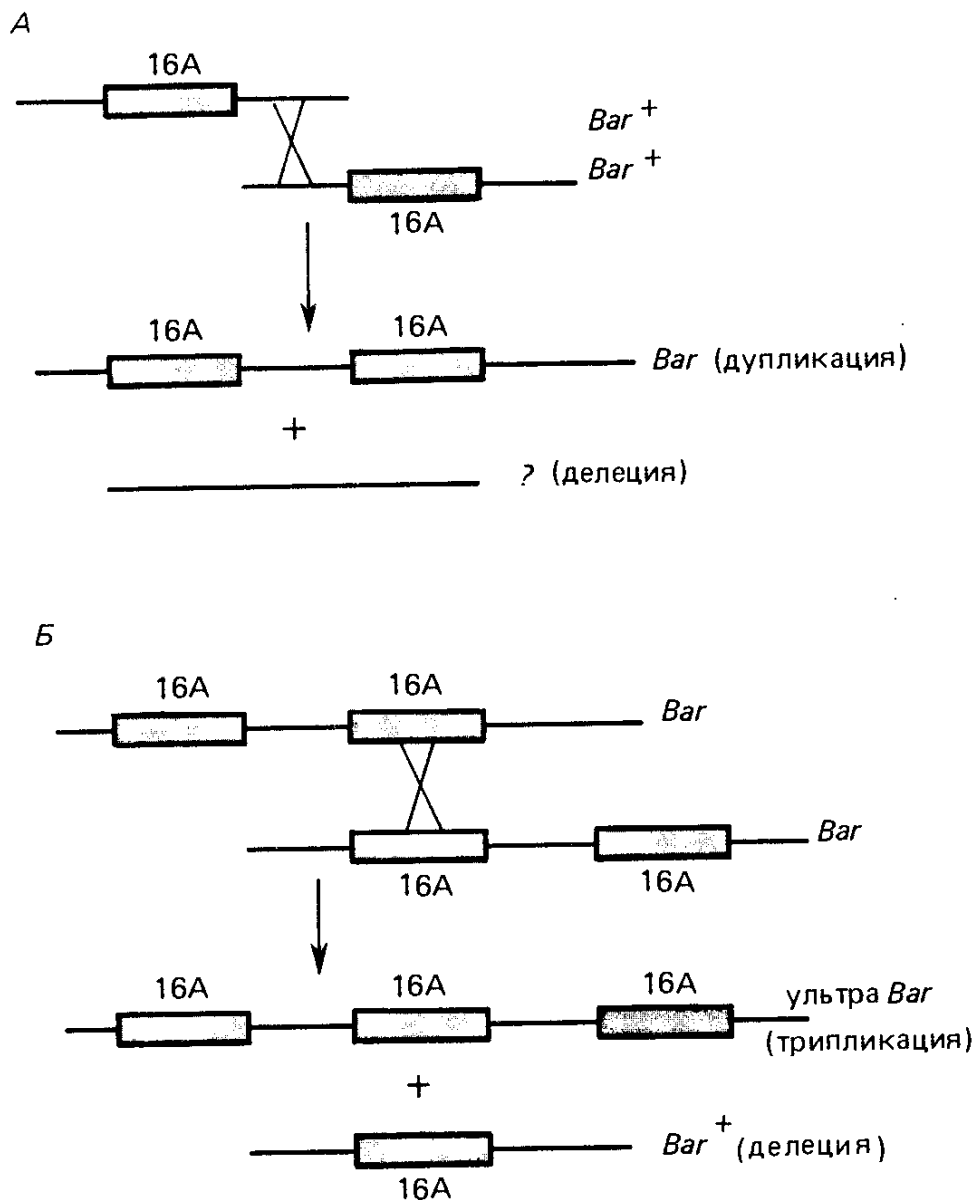


Рис. 13.5. Возможный механизм возникновения дупликаций и делеций в результате неравного кроссинговера на примере мутации *Bar* в X-хромосоме *D. melanogaster*. А — при возникновении мутации *Bar*; Б — ультра *Bar*.

16A — наименование диска, дублируемого в политенных хромосомах

achaete (*ac*) — редукция щетинок, *vermilion* (*v*) — ярко-красные глаза, так и доминантных: *Bar* (*B*), *Hairy wing* (*Hw*) — волосатые крылья.

Цитологически гетерозиготы по дупликациям выявляются сходно с гетерозиготами по делециям — образуется петля при конъюгации хромосом.

Дупликации и делеции часто возникают в результате разрывов хромосом, вызываемых различными повреждающими агентами, ионизирующей радиацией, химическими мутагенами, вирусами и др., а также факторами рекомбинации у самцов *D. melanogaster* (*MR*), представляющими компоненты системы гибридного дисгенеза. Кроме того, дупликации и делеции могут быть результа-

том кроссинговера у гетерозигот по инверсиям и транслокациям.

Дубликации и другие повторы обычно не оказывают такого отрицательного влияния на жизнеспособность, как делеции и дефишенсы. Сходные элементы часто повторяются в геномах различных организмов. Так, К. Бриджес обратил внимание на сходный рисунок расположения дисков в двух одинаково ориентированных участках II хромосомы дрозофилы. По-видимому, эти участки представляют собой прямой повтор. На гигантских хромосомах дрозофилы также обнаруживаются и инвертированные повторы. На существование повторов в геномах других организмов указывает, например, спаривание отдельных участков негомологичных хромосом при мейозе у гаплоидных растений, которые могут быть получены экспериментальным путем (см. гл. 14). В отсутствие гомологов у гаплоидов наблюдаются участки синapsиса. Это так называемое *гомеологическое спаривание*.

При дубликации доминантной аллели какого-либо гена, сопровождаемой транспозицией копии на другую хромосому, меняется и картина расщепления, если скрещивание проводят с рецессивным мутантом по тому же гену. Вместо моногибридного расщепления 3:1 у диплоидных организмов наблюдается полимерное расщепление 15:1. Возможность клонирования генов, проверка гибридизации их ДНК и определение первичной структуры генов часто вскрывает высокий уровень гомологии полимерных генов. Например, два гена, кодирующих изозимы (т. е. ферменты с одинаковой функцией) *кислой фосфатазы* у дрожжей *Sacch. cerevisiae* *pho 3* и *pho 5*, гомологичны на 80 %. Очевидно, эти гены некогда возникли в результате дубликации.

Как показал И. А. Раппопорт для локуса *Var*, экспериментальное повторение одного и того же гена (до 8 раз) может достигаться за счет многократных дубликаций. Многократные повторы — *амплификации* — обнаружены в культурах клеток млекопитающих, устойчивых к ряду повреждающих агентов: *метатрексату*, *колхицину*, ионам тяжелых металлов и др. В этих случаях кратность повторения одного и того же участка генетического материала, включающего, например, ген *дигидрофолатредуктазы*, связывающей метатрексат, может достигать нескольких сот и даже более тысячи. В присутствии метатрексата как селективирующего агента формируются целые хромосомы с центромерами, содержащие один и тот же повторяющийся фрагмент ДНК размером в 30 000—40 000 п. н. При этом устойчивость к метатрексату может повышаться до 100 тыс. раз. В процессе такой амплификации принимает участие механизм рекомбинации.

Аналогично амплифицируется участок, содержащий ген *CUP* у дрожжей, обуславливающий устойчивость клеток к ионам меди. В отсутствие селективного агента эти отобранные генетические конструкции оказываются нестабильными и устойчивость быстро теряется.

Многократные повторения одного и того же участка показаны для генов рибосомной ДНК у дрозофилы. Около 130 повторов

этих генов собрано в локусе *bb* (*bobbed*), который присутствует как в X-, так и в Y-хромосоме этого насекомого. Мутанты *bb* несут делеции генов рДНК. В течение нескольких поколений у мух, гомозиготных по делеции большей части рДНК, происходит восстановление числа генных копий, характерных для дикого типа. Мультипликация, или амплификация рДНК, сопровождается повышением частоты кроссинговера между X- и Y-хромосомами в районе *bb*.

Дупликации играют существенную роль в эволюции генома, поскольку они создают дополнительные участки генетического материала, функция которых может быть изменена в результате мутаций и последующего естественного отбора.

13.3. Инверсии

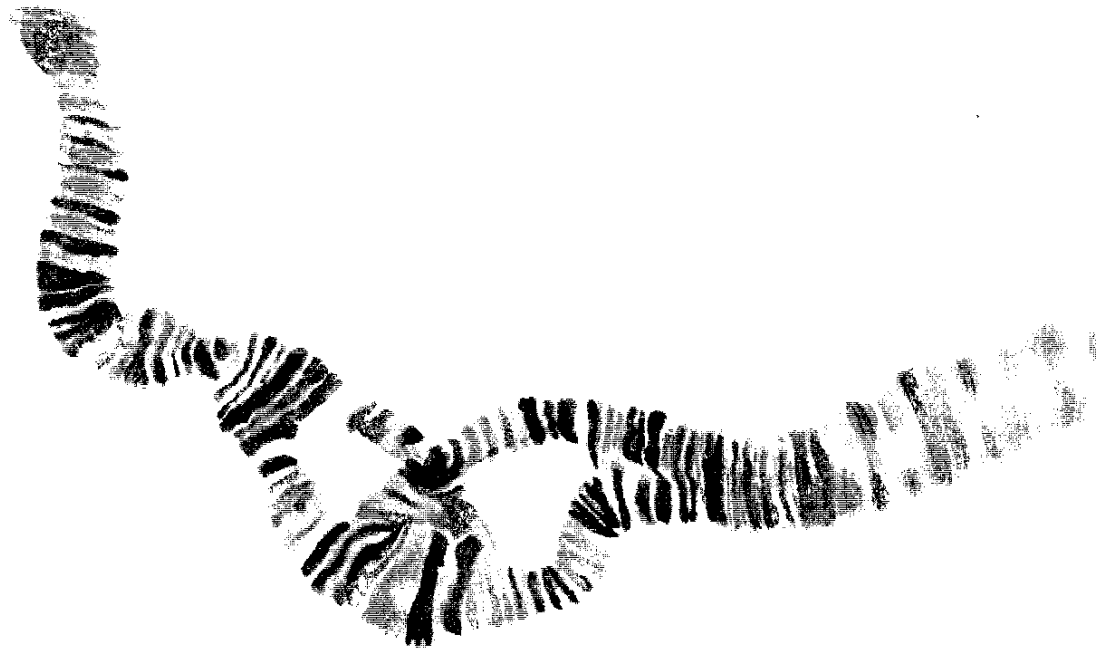
Изменение чередования генов в хромосоме в результате инверсии — тип перестроек, наиболее часто встречающихся в природных популяциях. В зависимости от расположения концов (границ) перестройки по отношению к центромере *инверсии* делят на *перицентрические*, захватывающие центромеру, и включающие ее в инвертированный участок, и *парацентрические*, не включающие центромеру в инвертированный участок.

Инверсии — это широко распространенный путь эволюционного преобразования генетического материала. Например, человек и шимпанзе отличаются по числу хромосом: у человека $2n = 46$, а у шимпанзе $2n = 48$. Хромосома 2 человека содержит большую часть материала, гомологичного дополнительной паре хромосом шимпанзе. Кроме того, различия касаются четырех хромосом: 4, 5, 12 и 17-й, в которых произошли перицентрические инверсии.

Инверсия приводит к изменению сцепления генов, иной их линейной последовательности, нежели у исходной формы. Этот эффект можно обнаружить, если инверсия в гомозиготе не летальна. Рецессивная летальность часто сопутствует инверсиям как результат локализации точек разрывов в жизненно важных генах или как следствие эффекта положения (см. далее).

Другое важное следствие инверсии — подавление кроссинговера, если инверсия находится в гетерозиготе. Это свойство инверсий широко используют при создании сбалансированных линий, гетерозиготных по летальным мутациям и не разрушаемых кроссинговером по нужной хромосоме. Примеры таких линий у дрозофилы (*SyL/Pm*, Мёллер-5) были рассмотрены в гл. 12. Говоря более строго, у гетерозигот по инверсиям кроссинговер не подавлен, но последствия его ведут к образованию нежизнеспособных спор у растений или зигот у животных.

У гетерозигот по инверсиям на цитологических препаратах обнаруживают характерные петли — результат конъюгации структурно измененной и нормальной хромосомы (рис. 13.6). Если в такой петле, т. е. в инвертированном участке, произойдет одиночный кроссинговер, то в случае парацентрической инверсии возникнет



A



Б

Рис. 13.6. Два примера (А и Б) петель, образуемых гетерозиготами по инверсиям при конъюгации гомологичных хромосом у двукрылого *Eusimulium securiforme* (фото В. Д. Симоненко)

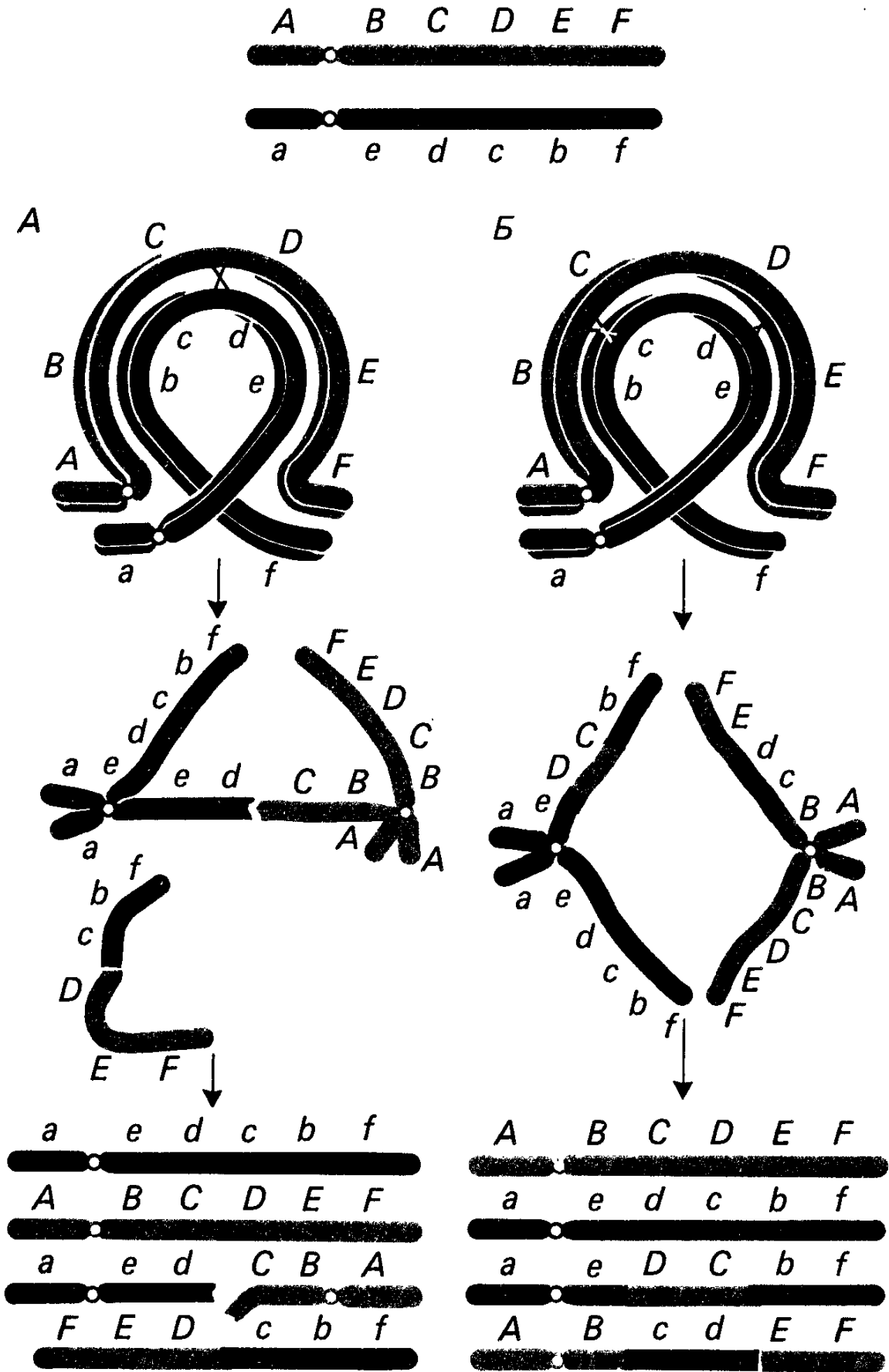


Рис. 13.7. Конъюгация хромосом и последствия одиночного (А) и двойного (Б) кроссинговера при гетерозиготности по парацентрической инверсии

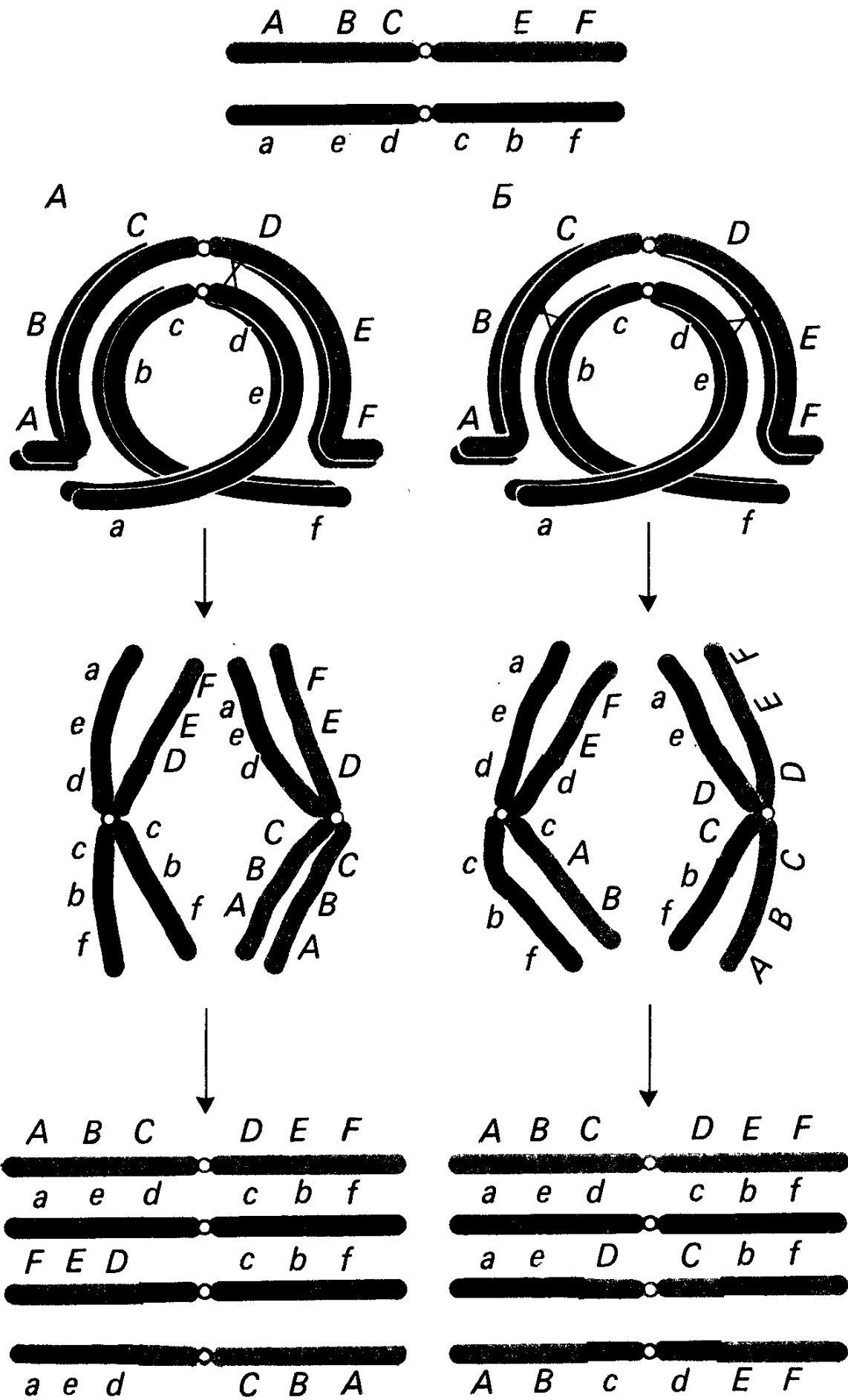


Рис. 13.8. Конъюгация хромосом и последствия одиночного (А) и двойного (В) кроссинговера при гетерозиготности по перичесентрической инверсии

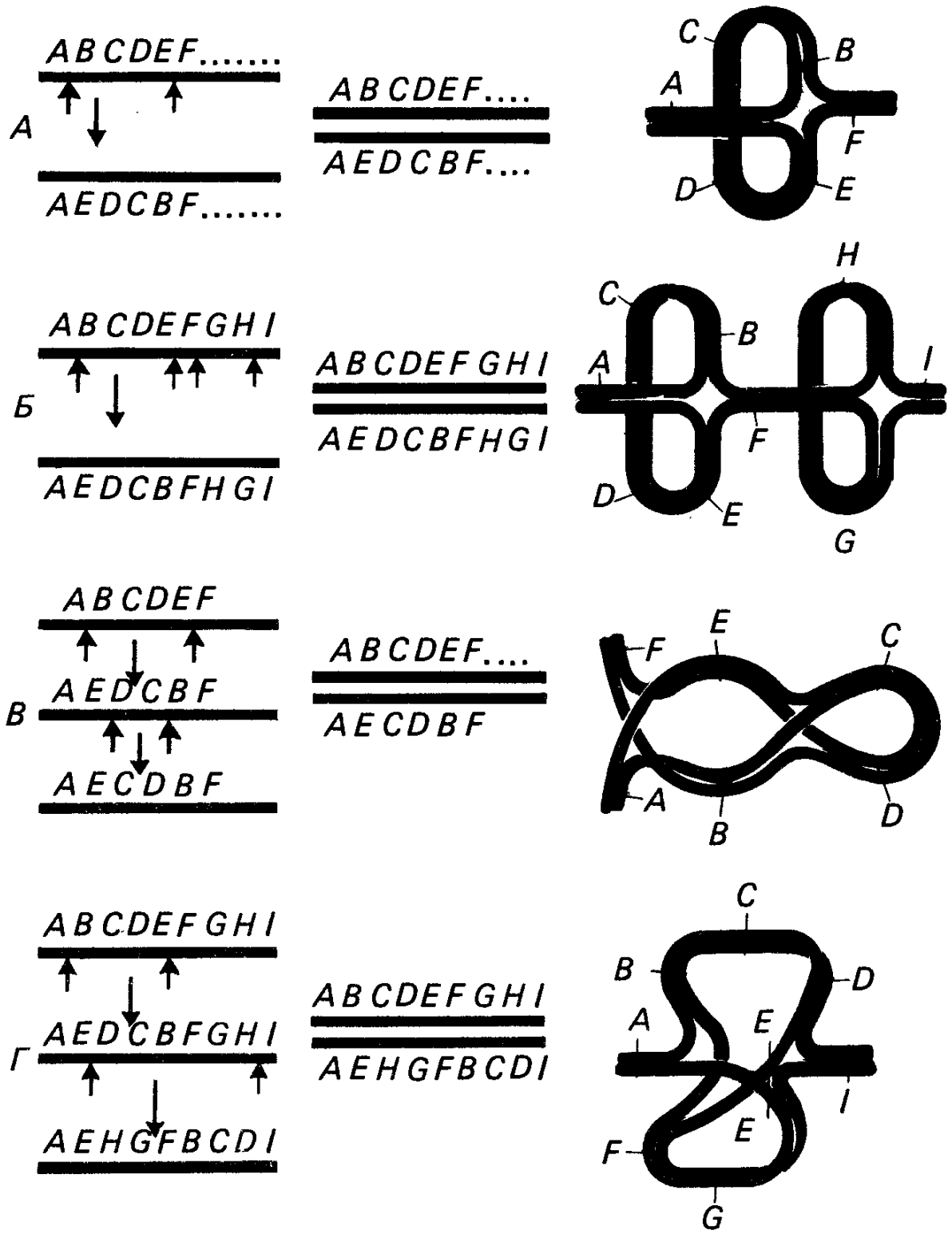


Рис. 13.9. Характер конъюгации хромосом при гетерозиготности (Ф. Г. Добжанский, 1951). А — по одной инверсии; Б — по двум неперекрывающимся инверсиям; В — по одной инверсии в пределах другой; Г — по двум частично перекрывающимся инверсиям.

Короткие стрелки слева — точки разрывов при образовании инверсии

кает одна хроматида с двумя центромерами, которые ее порвут при расхождении в анафазе. Образующийся также бесцентромерный фрагмент будет потерян. В результате из четырех гамет полноценными будут только две. Только они способны при оплодотворении дать жизнеспособные зиготы (рис. 13.7, А). При гетерозиготности по перичентрической инверсии кроссинговер не препятствует нормальному расхождению всех хроматид. Тем не менее полноценными вновь будут только два продукта мейоза из четырех, поскольку две хроматиды несут делеции некоторых генов (рис. 13.8, А).

У самок дрозофилы аномальные хромосомы, образовавшиеся в результате кроссинговера в гетерозиготных инверсиях, обычно отходят в полярное тельце и поэтому гетерозиготность по инверсиям не сказывается на их фертильности. У многих организмов гетерозиготы по длинным инверсиям оказываются полустерильными вследствие кроссинговера.

Мы рассмотрели неблагоприятный эффект одиночного кроссинговера. В то же время двойной кроссинговер у гетерозигот по инверсии может приводить к образованию вполне жизнеспособных гамет (см. рис. 13.7, Б и 13.8, Б). Конверсия (см. гл. 7) в пределах гетерозиготной инверсии происходит нормально, если она не сопряжена с реципрокной рекомбинацией, как показал А. Човник для локуса *ry* (темно-красные глаза) *D. melanogaster*.

Хромосома может нести не только одну инверсию, но две неперекрывающиеся и две, перекрывающиеся полностью или частично. Гетерозиготность по таким сложным перестройкам также идентифицируется цитологически по характеру конъюгации хромосом (рис. 13.9). Сравнение рисунка гигантских хромосом рода *Drosophila* показывает, что дивергенция их видов сопровождалась сложными перекрывающимися и неперекрывающимися инверсиями. Так, при изучении конъюгации хромосом у гибридов *D. virilis* и *D. littoralis* Н. Н. Соколов обнаружил, что хромосомы этих видов различаются шестью инверсиями.

Таким образом, учитывая последствия гетерозиготных инверсий для мейоза, следует подчеркнуть, что они могут служить факторами изоляции и способствовать эволюционной дивергенции новых форм, образующихся в пределах вида.

13.4. Транслокации

Транслокации представляют собой реципрокный обмен участками негомологичных хромосом. В результате такого обмена у гомозигот по транслокациям изменяется характер сцепления генов. В гетерозиготе по транслокации гены, принадлежащие к разным, негомологичным хромосомам, наследуются как принадлежащие к одной группе сцепления. Это объясняется тем, что полностью функциональными оказываются только те споры



Рис. 13.10. Конъюгация политенных хромосом *D. melanogaster* при гетерозиготности по транслокации (рис. с фото Л. А. Мамон)

(у растений) и гаметы (у животных), которые несут родительские сочетания хромосом.

Характер конъюгации транслоцированных хромосом меняется: образуется фигура креста (рис. 13.10). Плотная конъюгация вблизи точек разрывов оказывается затрудненной, что приводит к подавлению кроссинговера в этих участках (рис. 13.11).

У гетерозиготы по транслокации в профазе мейоза образуются квадριваленты, а не биваленты, как обычно, поскольку гомологичные участки оказываются у всех четырех конъюгирующих хромосом. Из шести возможных типов гаплоидных продуктов, возникающих при трех способах расхождения хромосом, только два типа функционируют нормально — те, которые получают полные наборы генов, характерные для исходных родительских форм (рис. 13.11). Остальные четыре типа несут дубликации и нехватки и потому, как правило, не дают жизнеспособного потомства или не участвуют в оплодотворении.

Гетерозиготы по реципрокным транслокациям у животных встречаются редко, но широко распространены у растений. Характерный пример в этом отношении представляют различные виды ослинника — *Oenothera*. Например, у *O. lamarckiana* из 14 хромосом 12 вовлечены в реципрокные транслокации. Поэтому в мейозе у этого растения наблюдают один бивалент и мультивалент, включающий остальные 12 хромосом (рис. 13.12). У других видов ослинника число хромосом, образующих мультиваленты, варьирует, что отражает число реципрокных транслокаций. У *O. muri-*

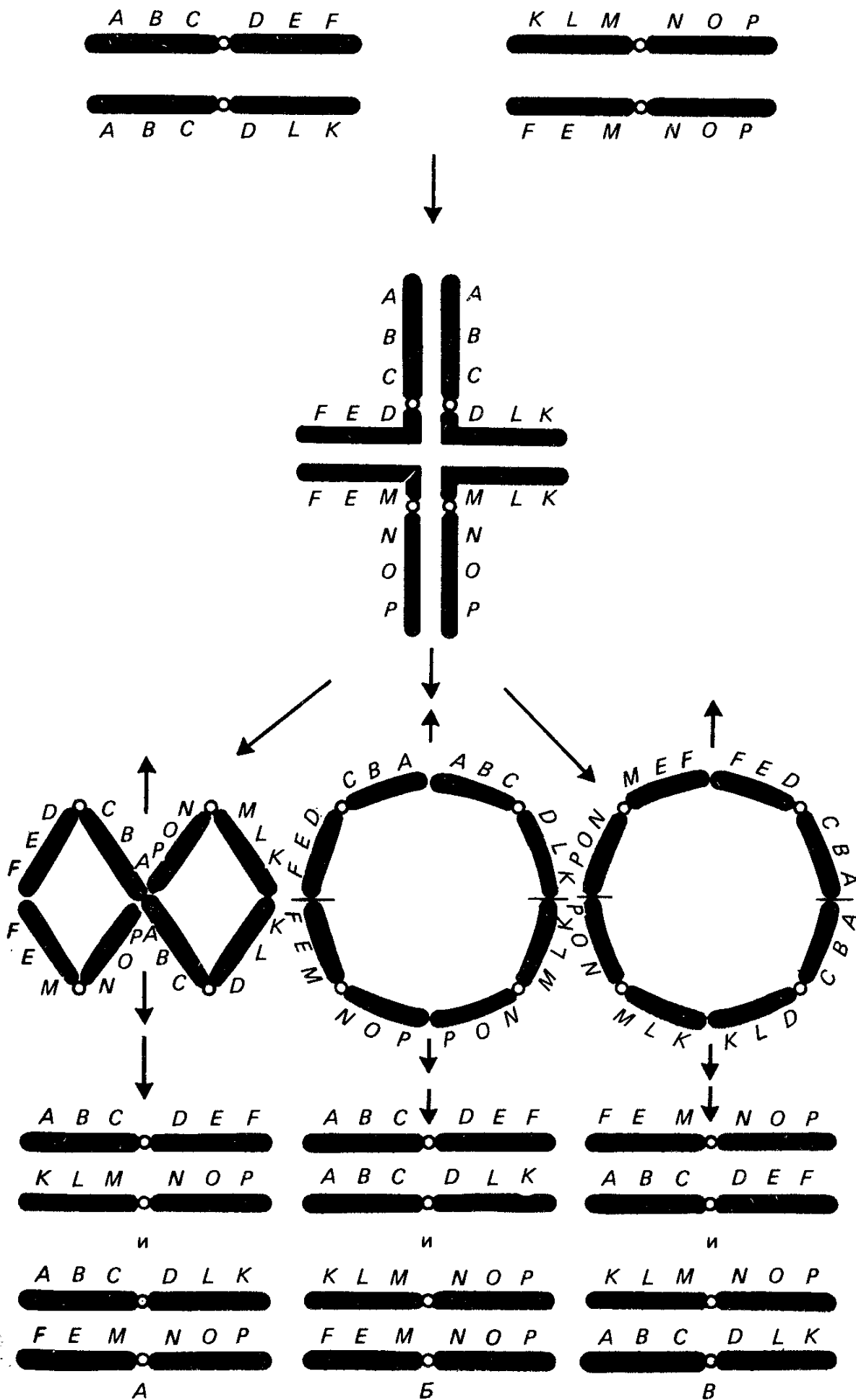


Рис. 13.11. Мейоз у гетерозиготы по реципрокной транслокации. Полноценны только два типа продуктов мейоза (А); четыре типа гаплоидных продуктов (Б) и (В) несут делеции и дупликации

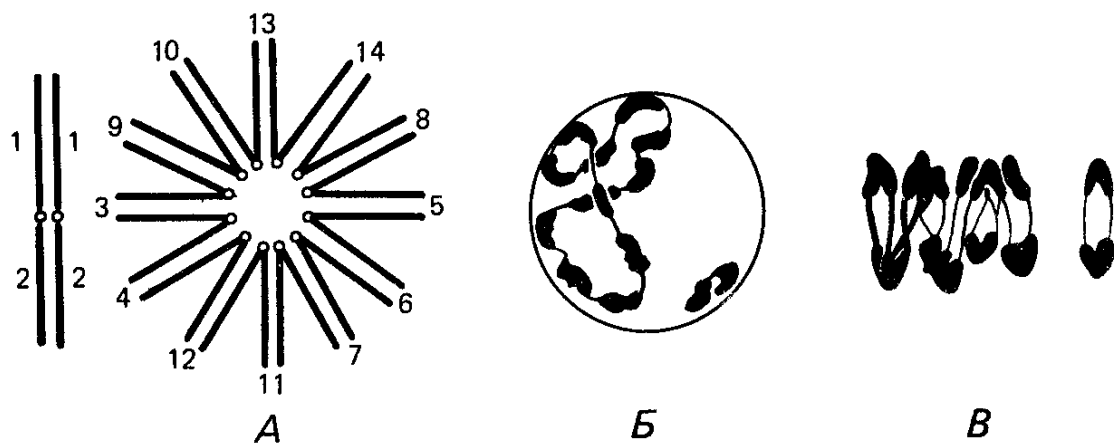


Рис. 13.12 Мейоз у *Oenothera lamarckiana* (А. Мюнтцинг, 1967, Ф. Айала, 1983). А — растение несет реципрокные транслокации между 12 из 14 хромосом, вследствие чего в профазе мейоза образуются один мультивалент и один бивалент; Б — в диакинезе видны кольцо из 12 хромосом и одна пара хромосом; В — метафаза I

cata и *O. biennis* все 14 хромосом образуют один мультивалент, а позже, в диакинезе, в результате терминализации хиазм — кольцо из 14 хромосом. Функционирующими оказываются только те два типа микро- и мегаспор, которые получили полные наборы плеч хромосом. И таким образом нормальное оплодотворение происходит только при объединении типов гамет, вносящих в зиготу целые родительские комплексы транслоцированных хромосом. Слияние гамет, несущих одинаковые хромосомные комплексы, летально, и совместимые при оплодотворении комплексы хромосом у разных видов *Oenothera* неодинаковы. Благодаря такому «комплексному» оплодотворению виды ослинника поддерживают сбалансированную гетерозиготность по транслокациям даже при самоопылении. В свое время редкие нарушения совместимых комплексов хромосом и были приняты Г. Де Фризом за мутации.

Подобно инверсиям, транслокации обеспечивают изоляцию новых форм и способствуют дивергенции в пределах вида. Особый тип транслокаций, так называемые *Робертсоновские транслокации*, или слияния, приводит к изменению числа хромосом. Если две телоцентрические хромосомы сливаются в области центромеры, то образуется одна метацентрическая хромосома. Этот тип хромосомных перестроек получил свое название по имени исследователя У. Р. Робертсона, выяснившего механизм такого слияния.

Знание механизма наследования и летального эффекта митозных aberrаций послужило основой генетического метода борьбы с вредными насекомыми. Принцип этого метода сформулировал А. С. Серебровский (1940). На волю выпускают большое число самцов подавляемого вида, предварительно подвергнутых действию ионизирующих излучений. В сперматозоидах таких самцов возникают многочисленные хромосомные перестройки. Облученные самцы конкурируют за спаривание с природными самцами, а образующиеся зиготы или зиготы, возникшие у их потомков, с большей частотой оказываются нежизнеспособными.

В последнее время синтезированы некоторые соединения, предпочтительно вызывающие хромосомные aberrации, а не точковые мутации. К их числу, например, относится *диэпоксиоктан*, который вызывает у нейроспоры и дрожжей преимущественно хромосомные перестройки. Такие мутагены применяют в качестве эталонных при изучении генетических эффектов загрязнения окружающей среды (см. гл. 21).

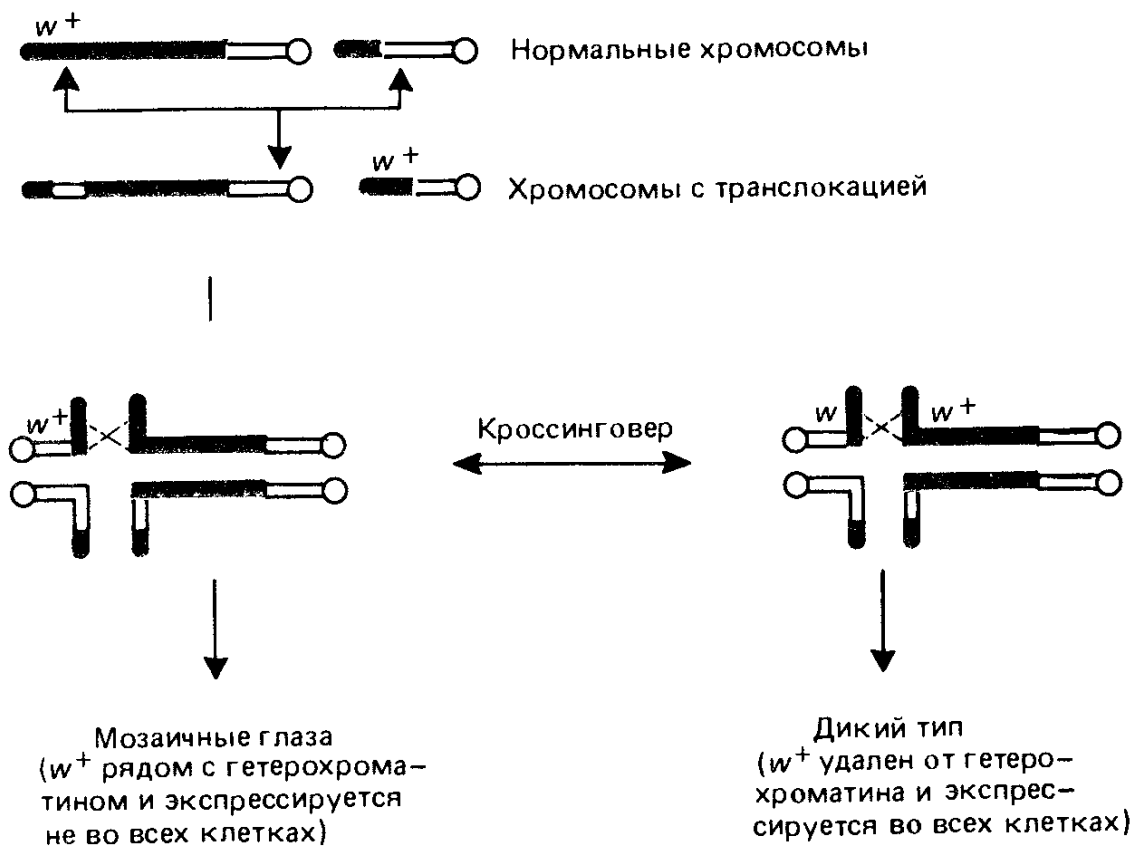
13.5. Эффект положения

Довольно часто хромосомные перестройки приводят к изменению фенотипа вследствие того, что переместившиеся гены оказываются в новом окружении. Один из примеров *эффекта положения гена* — проявление мутации *Var*. Как уже отмечалось, сама мутация *Var* — результат дупликации в X-хромосоме, а ультра-*Var* (*BB*) — результат трипликации того же участка. Если сравнить фенотип гомозигот *V/V* и гетерозигот *V⁺/BB*, то оказывается, что у первых глаза редуцированы меньше, чем у вторых. Подсчет числа фасеток показывает, что самки *V/V* имеют в среднем 68,1 фасетки на глаз, а самки гетерозиготы *V⁺/BB* — 45,4 фасетки. Несмотря на то что мухи обоих генотипов содержат по четыре одинаковых участка X-хромосомы, их различное расположение приводит к разнице в фенотипическом проявлении.

Объяснение фенотипического проявления *Var* как эффекта положения дал А. Стертевант (1925). Позднее оказалось, что сходный эффект (полосковидные глаза) обнаруживают не только дупликации диска 16 А X-хромосомы, но и некоторые инверсии, точка разрыва которых локализована вблизи этого района.

Эффект положения чаще всего сказывается на изменении доминирования гена. Так, Б. Н. Сидоров и Н. П. Дубинин в 30-е годы описали изменение доминирования гена *ci* (*cubitus interruptus*). Нормальная аллель этого гена доминантна по отношению к мутантной, приводящей к прерыванию одной из жилок на крыле дрозофилы. Если 4-я хромосома, где локализован ген *ci*, участвует в транслокации с точкой разрыва вблизи данного гена, то его доминантная аллель не проявляется в гетерозиготе. Эффект положения показан и для ряда других генов дрозофилы.

Эффект положения может быть стабильным и нестабильным, или мозаичным. Если, например, перенести посредством транслокации нормальную аллель *w⁺* с X-хромосомы на какую-либо другую, в участок, богатый гетерохроматином, то у гетерозигот *w⁺/w* в части фасеток аллель *w⁺* не проявляется и глаза становятся мозаичными. Если аллель *w⁺* удалить от гетерохроматина — поменять местами *w⁺* и *w* посредством кроссинговера (рис. 13.13), то доминантная аллель *w⁺* вновь работает нормально и глаза гетерозиготы *w⁺/w* оказываются полностью красными. Этот эксперимент доказывает, что здесь имеет место эффект положения гена, а не его мутация, не изменение самого гена. При стабильном эффекте положения исчезает и аномальное проявление



А

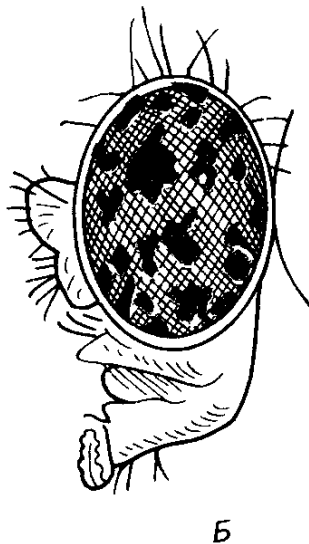


Рис. 13.13. Нестабильный (мозаичный) эффект положения гена у дрозофилы. В результате переноса в область гетерохроматина (А) при транслокации аллель w^+ проявляется в онтогенезе нестабильно, что выражается в мозаичности глаз (Б)

гена, если его вернуть на прежнее место. По-видимому, эффект положения — это результат нарушения регуляторных компонентов (см. гл. 16), локализованных в более или менее непосредственной близости к перемещаемому гену.

13.6. Транспозиции

Транспозиции представляют собой перемещение небольших участков генетического материала в пределах одной хромосомы или между разными хромосомами. Транспозиции происходят при

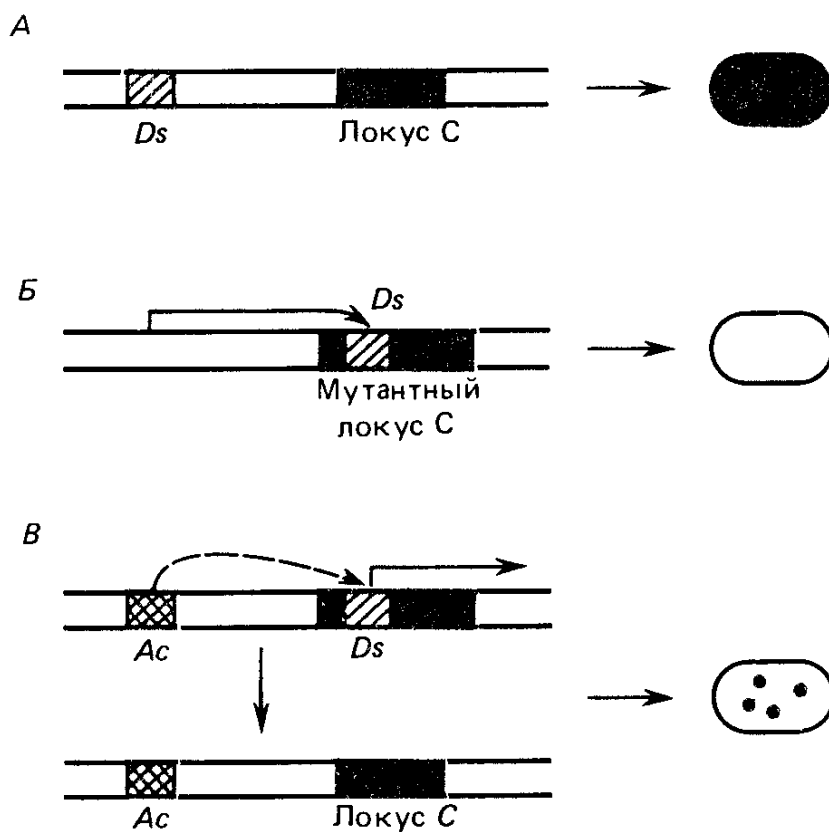


Рис. 13.14. Схема взаимодействия активатора (*Ac*) и диссоциатора (*Ds*), инактивировавшего локус *C* у кукурузы, объясняющая результаты, полученные Б. Мак-Клинтон (по Н. Федорофф, 1984). *A* — *Ds* отдален от локуса *C*; *Б* — *Ds* переместился в локус *C* и инактивировал его (проявляется как рецессивная аллель *c*); *В* — *Ac* стимулирует перемещение *Ds*, в результате чего он покидает локус *C*, что выражается в реверсиях $c \rightarrow C$ в ходе митотических делений (появление окрашенных пятен на зернах кукурузы)

участии особых подвижных или *мигрирующих генетических элементов*.

Впервые мигрирующие генетические элементы были описаны Б. Мак-Клинтон в 1947 г. в связи с изучением хромосомных разрывов у кукурузы. Был обнаружен мигрирующий локус *Ds* (*диссоциатор*), в котором предпочтительно происходят разрывы хромосом. Сам по себе *Ds* не вызывает разрывов. Они появляются в этом локусе, если только в геноме присутствует другой мигрирующий элемент — *Ac* (*активатор*). Оба эти элемента могут теряться с частотой нескольких процентов в мейотическом потомстве или менять свою локализацию при митотических делениях. При этом *Ds* перемещается только в присутствии *Ac*.

Внедрение *Ds* в непосредственной близости или внутри гена *C*, контролирующего окраску алейрона семян, приводило к инаktivации гена *C* и тем самым гетерозиготные семена $C/c/c$ (напомним, что эндосперм — триплоидная ткань, см. гл. 8) оказывались неокрашенными. В присутствии *Ac* диссоциатор (*Ds*) начинал перемещаться — иногда покидал локус *C*. В результате этого

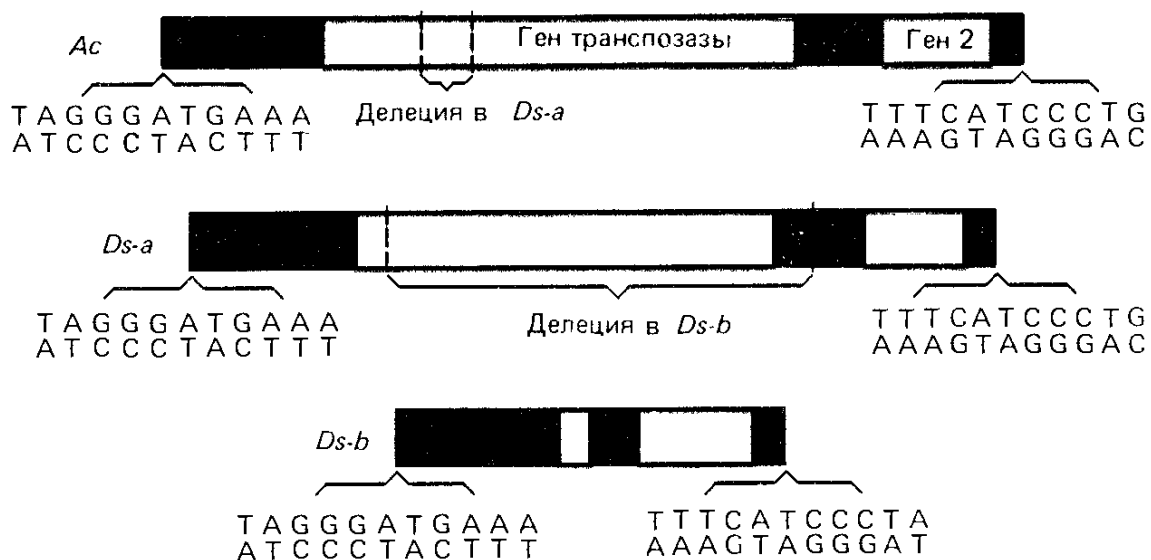


Рис. 13.15. Структура Ac- и Ds-элементов кукурузы (по Н. Федорофф, 1984). Показаны два гена (светлые), ответственные за транспозицию, и последовательности инвертированных несовершенных повторов на концах

появлялись окрашенные пятна алейрона на неокрашенных семенах (рис. 13.14).

Только в 80-х годах благодаря успехам генной инженерии удалось выделить и исследовать Ac, Ds и некоторые другие мигрирующие элементы кукурузы (рис. 13.15). Оказалось, что Ds — это дефектный делетированный вариант Ac. Структура элемента Ac оказалась типичной для мигрирующих элементов, которые к этому времени были изучены прежде всего у бактерий, а также у дрозофилы и дрожжей *Sacch. cerevisiae*.

Начало изучению молекулярной структуры мигрирующих генетических элементов положило открытие в конце 60-х годов необычных мутантов по лактозному оперону *E. coli*. У этих мутантов были инактивированы все три гена *lac*-оперона (см. гл. 17). Частицы бактериофага λ , трансдуцирующего *lac*-оперон из таких мутантов, обладали необычно высокой плавучей плотностью, что указывало на присутствие в *lac*-опероне мутантов лишней ДНК. Подобные мутации были найдены затем и в других генах *E. coli*, фагов λ и P2. Общими для всех этих мутантов были инсерции (вставки) большей или меньшей длины. Эти вставляемые в разные участки генома *E. coli* молекулы ДНК получили наименование IS-элементов (от англ. insertion sequences — *вставные последовательности*).

Размеры IS-элементов могут варьировать от 200 до 5700 п. н. Все IS-элементы характеризуются следующими структурными особенностями:

1. На концах IS-элементы несут несовершенные, т. е. неидентичные инвертированные повторы нуклеотидной последовательности размером от нескольких пар до нескольких десятков пар нуклеотидов.

2. Большинство *IS*-элементов содержит ген для фермента транспозазы, ответственной за их перемещение.

3. *IS*-элементы могут содержать по нескольку сигналов начала и конца трансляции, а также сочетание нуклеотидов, сходное с сигналами терминации транскрипции (см. гл. 16).

4. В точке внедрения каждого *IS*-элемента, на его флангах всегда обнаруживается дупликация (в прямой ориентации) размером от 4 до 9 п. н. Эта дупликация не является частью *IS*-элемента, а представляет собой результат повторений сайта-мишени, в который внедряется элемент.

Обычно хромосома *E. coli* имеет несколько *IS*-элементов, например 8 копий *IS1*, 5 копий *IS2* и т. д. Они перемещаются по хромосоме с частотой около $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ на клеточное деление. *IS*-элементы локализованы также в *F*-факторе *E. coli*: два *IS3*, один *IS2* и еще один элемент, обозначаемый $\gamma\delta$. Именно по этим мигрирующим элементам и происходит рекомбинация, когда *F*-фактор интегрирует с хромосомой *E. coli*, образуя *Hfr*-штаммы. На это указывают результаты изучения ДНК *F'*-факторов (см. гл. 9), у которых участок ДНК бактериальной хромосомы, включенный в *F'*-фактор, оказывается отделенным от ДНК *F*-фактора по обоим концам одной и той же последовательностью *IS*-элемента. *IS*-элементы *F*-фактора и такие же последовательности, разбросанные по бактериальной хромосоме, создают условия для образования *Hfr*-доноров с различными началами и направлениями переноса бактериальной хромосомы.

Миграция *IS*-элементов, очевидно, связана с рекомбинацией, однако ее механизм отличен от классической гомологичной рекомбинации. На это указывает возможность транспозиций даже в клетках бактерий, несущих мутацию *rec A*, блокирующую общую гомологичную рекомбинацию у *E. coli*.

В дальнейшем у бактерий были обнаружены более сложные мигрирующие элементы — *транспозоны*, которые отличаются от *IS*-элементов тем, что в них включены некоторые гены, не имеющие отношения к самому процессу транспозиции. Известны транспозоны, включающие гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов и другим ингибиторам. Транспозоны обычно фланкированы длинными прямыми или инвертированными повторами, в роли которых часто выступают *IS*-элементы (см. рис. 13.17). Сходно устроены и транспозоны эукариот, например *Ty I*-элемент *Sacch. cerevisiae* размером 5700 п. н., вызывающий дупликации 5 п. н. в точках интеграции с ДНК хромосом (рис. 13.16). Подобное строение имеют и *множественные диспергированные гены D. melanogaster* (МДГ), и ДНК-копии ретровирусов.

Изучение нуклеотидной последовательности дублируемых сайтов-мишеней на концах мигрирующих элементов показало, что они, как правило, неодинаковы как у различающихся элементов, так и у одного и того же элемента, локализованного в разных местах. Следовательно, мигрирующие элементы внед-

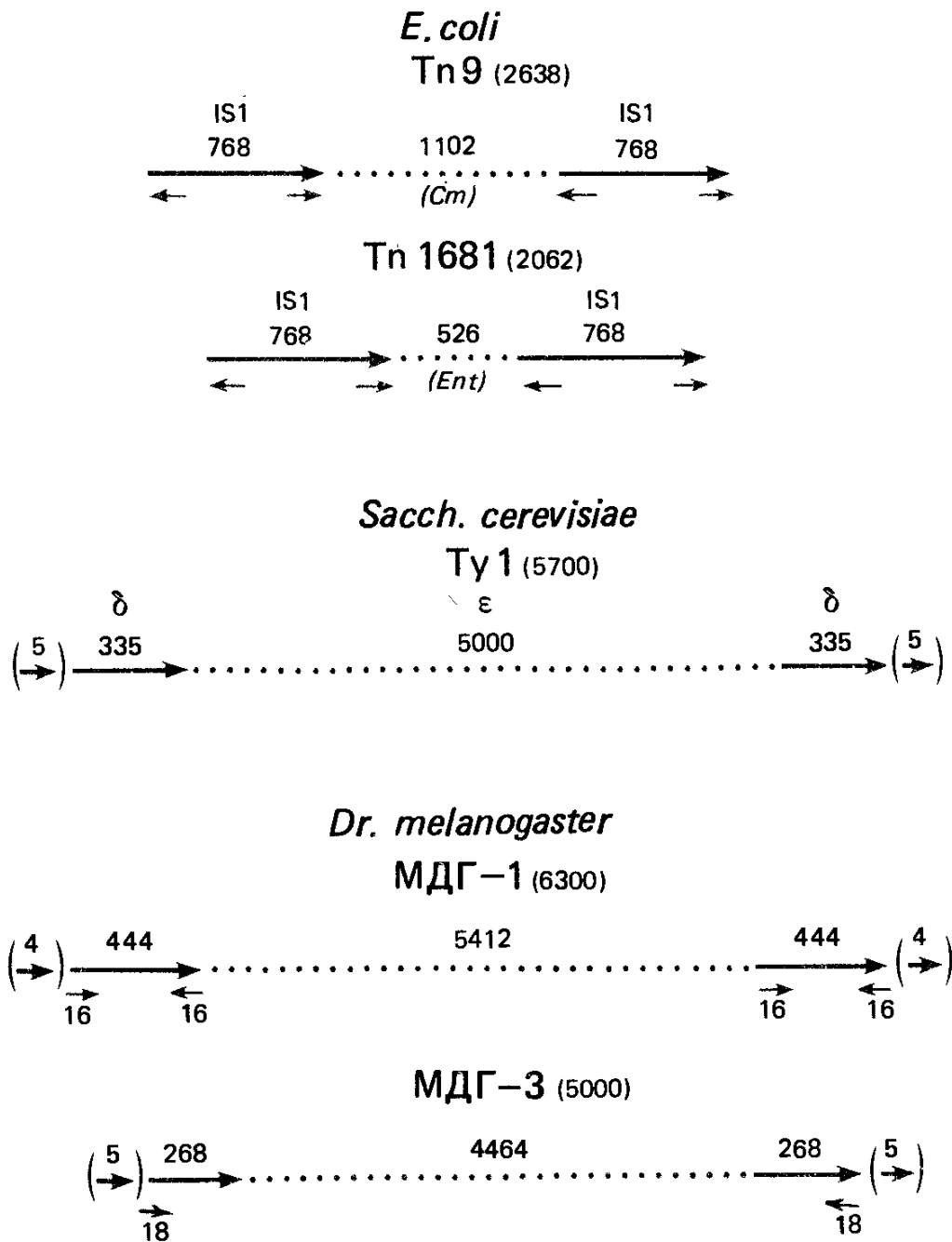


Рис. 13.16. Строение некоторых транспозонов *E. coli*: Tn 9 и Tn 1681; *Sacch. cerevisiae*: Ty 1; *D. melanogaster*: МДГ-1 и МДГ-3.

Цифры — размер в числе пар нуклеотидов. Стрелки — прямые и инвертированные повторы. Стрелки в скобках — прямой повтор сайта мишени. Cm — устойчивость к хлорамфениколу; Ent — продукция энтеротоксина; δ , ϵ — обозначения участков Ty 1

ряются в те или иные точки генома независимо от их структуры. Правда, предпочтение во многих случаях отдается АТ-богатым районам.

Некоторые мигрирующие элементы, покидая точку своей локализации, претерпевают внутриврохромосомную гомологичную рекомбинацию по фланкирующим их длинным концевым повторам. В результате этого транспозон оставляет после себя одну копию своего концевого повтора, как это показано, например, для дрожжевого транспозона Ty 1 (рис. 13.17), оставляя-

ющего после себя одну копию δ -повтора. По-видимому, сходно могут вести себя и МДГ *D. melanogaster*. Этим объясняется повторное появление некоторых мигрирующих элементов в оставленных ими сайтах — за счет гомологичной рекомбинации с оставшимся концевым элементом.

Для транспозонов эукариот рассматривают три механизма транспозиции:

1. Эксцизия предсуществующего транспозона с переносом на новое место — *нерепликативная транспозиция*.

2. Репликация ДНК транспозона с последующей транспозицией — *репликативная транспозиция*.

3. Обратная транскрипция РНК-копии транспозона и перемещение ДНК-копии на новое место — *РНК-опосредованная транспозиция*.

Как уже упоминалось ранее, обычно перемещения мигрирующих

элементов не направлены и довольно редки. Они происходят с частотой около $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-8}$, о чем можно судить по частоте ревертирования мутантов, возникших в результате внедрения этих элементов в непосредственной близости от генов или внутрь конкретных генов. В то же время можно создать такие экспериментальные ситуации, при которых частота транспозиций резко возрастает, а перемещения транспозонов перестают быть случайными. Так, в работе В. А. Гвоздева и Л. З. Кайданова было показано, что в линиях дрозофилы, длительное время (более 500 поколений) селектировавшихся на понижение половой активности самцов и общей жизнеспособности, отбирается неслучайный рисунок расположения МДГ в хромосомах (рис. 13.18). Об этом можно судить по гибридизации клонированных и радиоактивных копий МДГ с ДНК гигантских хромосом *D. melanogaster in situ*, т. е. непосредственно на цитологических препаратах слюнных желез личинок дрозофилы. Как только селекция в отрицательную сторону прекращалась, происходило быстрое (в течение нескольких поколений) перемещение копий МДГ, резко изменявшее картину их расположения на хромосомах. Это указывает на то, что миграция транспозонов чутко отражает направление селекции и связана с адаптивной ценностью организма.

В этой связи можно напомнить уже приводившийся пример появления бактериальных эписом — факторов устойчивости, «собранных» по нескольким генам, обеспечивавших выживание бактерий в период массовой терапии антибиотиками (см. гл. 9).

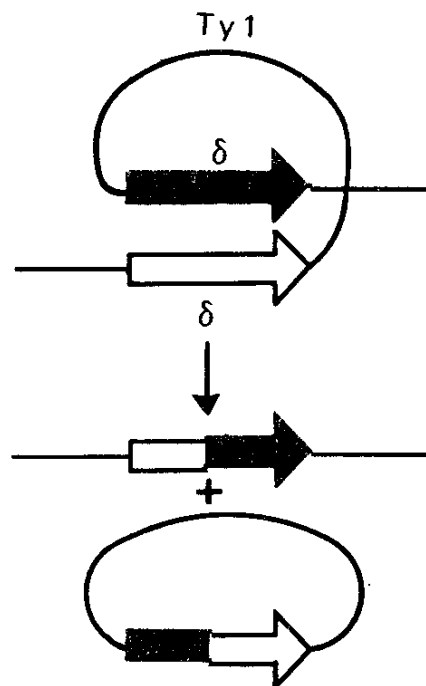


Рис. 13.17. Эксцизия (вырезание) дрожжевого транспозона Tu1 за счет рекомбинации между терминальными повторами элемента δ (дельта)

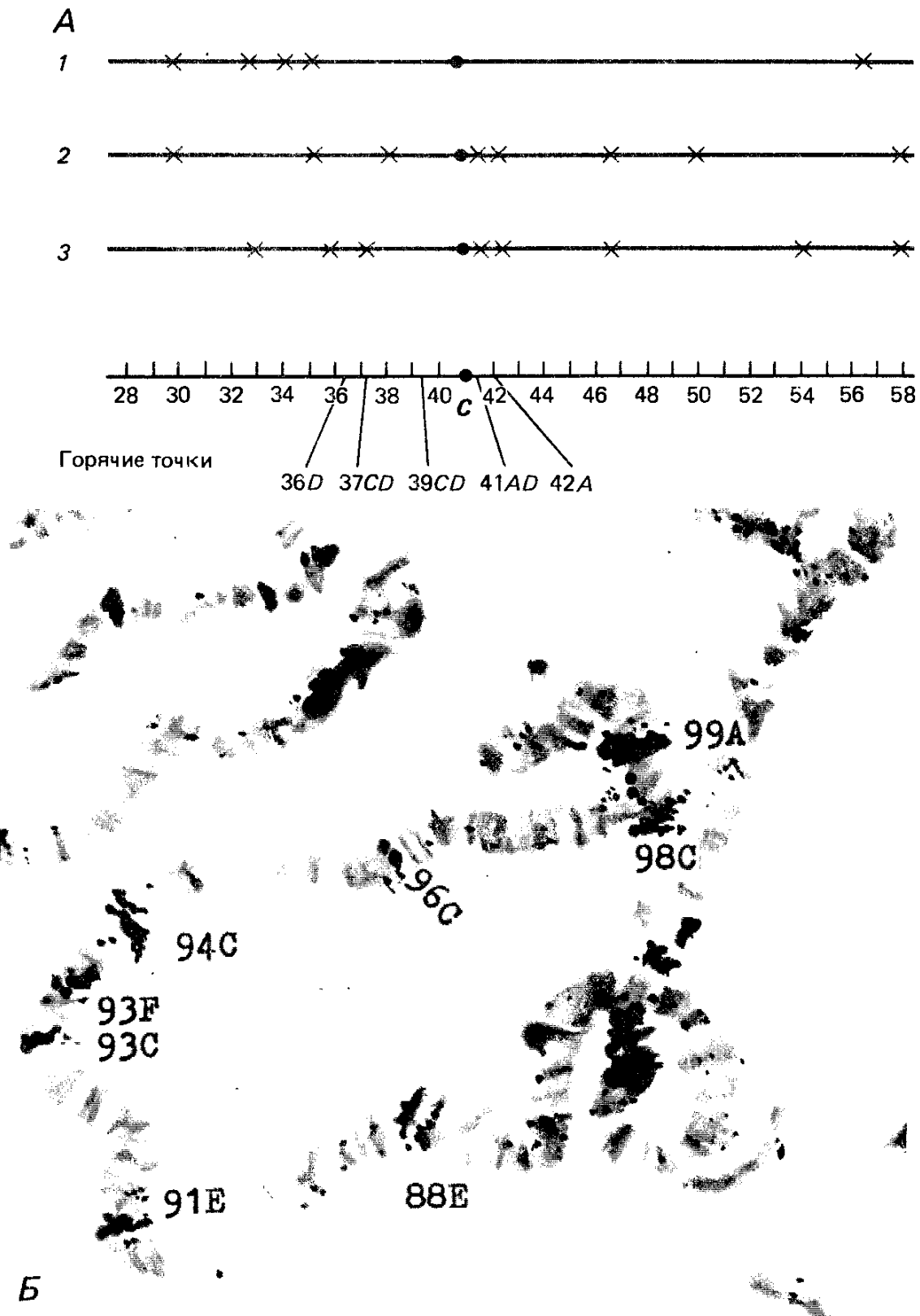


Рис. 13.18. Распределение копий мигрирующего элемента МДГ-1 в хромосоме 2 у *D. melanogaster* (В. А. Гвоздев, Л. З. Кайданов, 1986). А — увеличение числа и изменение локализации копий МДГ-1 при повышении адаптивной ценности линий. 1 — низкоактивная линия (НА), селектировавшаяся в течение 500 поколений, 2 и 3 — высокоактивные линии, восстановившие приспособленность (производные линии НА). Числа указывают номера секций по цитологической карте Бриджеса. С — центромера. Крестиками отмечены сайты локализации копий МДГ-1. Цифры и буквы — участки цитологической карты.

Б — результат гибридизации радиоактивного элемента МДГ-1 с ДНК политенных хромосом дрозофилы (3 хромосома).

Сайты гибридизации 88Е, 96С, 98С, 99А свойственны линии НА. При увеличении приспособленности появляются новые сайты: 91Е, 93С, 93F, 94С

13.7. Рекомбинационный механизм хромосомных перестроек

Впервые предположение о рекомбинационном механизме хромосомных aberrаций высказал А. С. Серебровский (1929). Он исходил из реципрокного характера транслокаций, рекомбинационного происхождения дупликаций и делеций, а также предполагал необходимость реципрокного обмена в случае инверсий.

Было замечено также, что точки разрывов при транслокациях у дрозофилы предпочтительно локализуются в районах *эктопического спаривания*, т. е. в районах негомологичных хромосом, время от времени синаптирующих на препаратах слюнных желез. Это указывало на существование в негомологичных хромосомах участков частичной гомологии и позволяло искать рекомбинационный механизм хромосомных перестроек. Несомненный успех в этом направлении был достигнут только с открытием мигрирующих элементов генома и в связи с применением техники рекомбинантной ДНК для их выделения и изучения.

Одним из наиболее интригующих моментов, связанных с изучением мигрирующих элементов, является обнаружение частых хромосомных перестроек вблизи точек внедрения IS-элементов и транспозонов. Это справедливо как для бактерий, так и для одноклеточных и многоклеточных эукариот. В настоящее время с учетом перемещения мигрирующих элементов и механизма обычной — гомологичной рекомбинации, а также рекомбинации между IS-элементами удается объяснить все типы известных хромосомных перестроек.

Делеции и дупликации могут происходить, если два мигрирующих элемента в одной и той же хромосоме одинаково ориентированы. Тогда рекомбинация по гомологии между этими элементами после репликации между сестринскими хроматидами или гомологичными хромосомами приведет к дупликации (трипликации) и делеции в качестве реципрокных продуктов рекомбинации (рис. 13.19, А). Делеции могут возникать и в результате рекомбинации двух гомологичных элементов, расположенных в одной хромосоме и одинаково ориентированных (рис. 13.19, Б). При этом дупликация отсутствует.

Инверсии возникают в случае противоположной ориентации двух гомологичных элементов в одной хромосоме (рис. 13.19, В).

Транслокации могут быть результатом рекомбинации двух копий одного и того же элемента, интегрированных в разные хромосомы и расположенных одинаково в направлении от центромеры или к центромере (рис. 13.19, Г).

Мосты и фрагменты, часто наблюдаемые в анафазе при индукции хромосомных aberrаций ионизирующими излучениями — результат рекомбинации копий одного и того же мигрирующего элемента в негомологичных хромосомах и по-разному

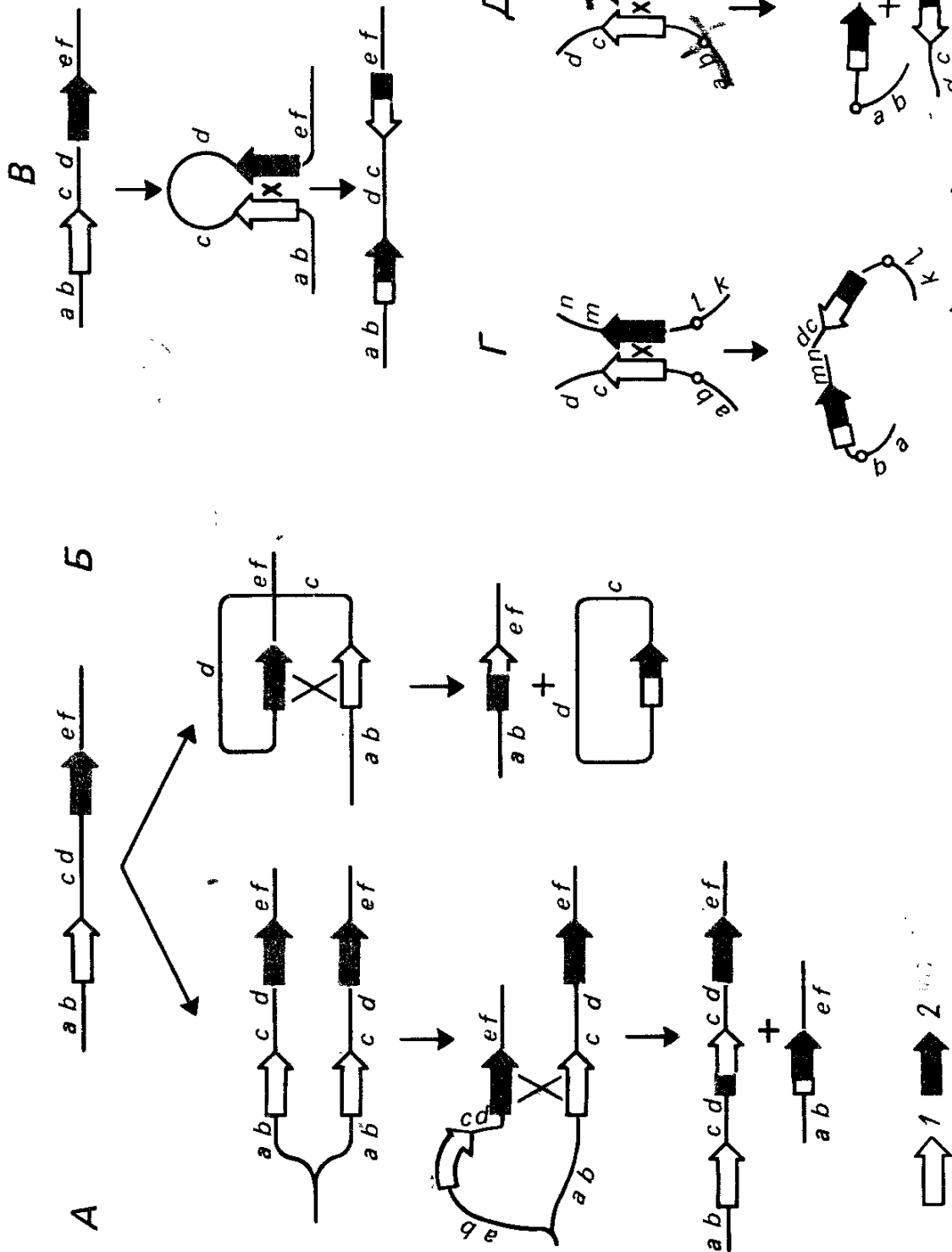


Рис. 13.19. Механизм возникновения хромосомных перестроек: опосредованных мигрирующими элементами. А — делеции и дупликации; В — делеции без дупликации; С — инверсии; D — транслокации; Е — образование мостов и фрагментов в анафазе I; I — исходная копия мигрирующего элемента, 2 — копия мигрирующего элемента, переместившаяся в новое место

ориентированных к центромере; в одной хромосоме от центромеры, в другой — к центромере (рис. 13.19, Д).

Большинство перечисленных здесь рекомбинационных механизмов возникновения хромосомных aberrаций продемонстрированы в экспериментальной работе с бактериями и дрожжами. Мигрирующие элементы способны захватывать и переносить на новое место гены, рядом с которыми они располагаются. По образному выражению Р. Б. Хесина, «попав в плохую компанию, гены из «добропорядочных» превращаются в «бродяг»¹. Тем самым осуществляется дупликация отдельных генов, необходимая для дивергенции генетического материала, т. е. возникновения генов с новыми функциями. Кроме того, повторы одинаковых или сходных участков генетического материала сами по себе создают условия для рекомбинации по гомологии между генами, располагающимися в негомологичных участках генетического материала. Подобная рекомбинация происходит значительно реже, чем полностью гомологичная рекомбинация — кроссинговер, но она также связана с иницирующей рекомбинацию конверсией. Это показано для дрожжей-сахаромицетов, имеющих два одинаковых гена *his 3*: один на своем месте в хромосоме XY, а другой — внесенный с плазмидой в результате интегративной трансформации (см. гл. 11). Второй ген *his 3* был интегрирован в другую часть генома благодаря рекомбинации плазмиды с *Tu1*-элементом, который она также несла. С помощью такой модели была продемонстрирована конверсия между негомологичными хромосомами. Аналогичный результат был получен и для разных генов дрожжей с высоким уровнем гомологии нуклеотидных последовательностей: *сус 1* и *сус 7*, кодирующих изо-1 и изо-2-цитохромы С. У другого вида дрожжей «негомологичная» конверсия показана между генами, кодирующими очень близкие по структуре тРНК. В редких случаях «негомологичная» конверсия сопровождается реципрокными транслокациями.

Рассмотренные здесь способы возникновения повторов в геноме при участии мигрирующих элементов следует назвать *первичными дупликациями*, т. е. дупликациями, возникающими *de novo*. Очевидно, существует большая группа так называемых *вторичных дупликаций*, примерами которых могут быть повторы, возникающие вследствие кроссинговера в гетерозиготных инверсиях и транслокациях (см. рис. 13.7, 13.8, 13.11), а также вследствие нерасхождения хромосом и полиплоидии (см. гл. 14).

События, изменяющие структуру хромосом в геноме, всегда традиционно связывали с эволюционными преобразованиями генетического материала. Дупликации поставляют материал для созидания новых генов в процессе естественного отбора. Инверсии и транслокации способствуют генетической изоляции новых форм в процессе их внутривидовой дивергенции. В то же время механизм возникновения хромосомных перестроек долгое вре-

¹ Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1984. С. 73.

мя не был известен и aberrации хромосом считались нерегулярными событиями, о чем говорит сам термин «aberrация», т. е. отклонение от нормы. Раскрытие механизма рекомбинации как основного источника перестроек хромосом заставляет по-новому увидеть проблему соотношения стабильности и лабильности генетического материала.

Хромосомные перестройки, традиционно рассматриваемые как один из типов мутаций, оказались связанными с процессами рекомбинации. Это объясняет, почему их обсуждение выделено в отдельную главу. Быть может, в будущем перестройки хромосом вовсе следует исключить из категории мутаций?

Дальнейшее изучение механизма перестроек хромосом позволит превратить этот раздел генетики в область направленной перестройки геномов, которая по праву получит наименование хромосомной инженерии.

Вопросы к главе 13

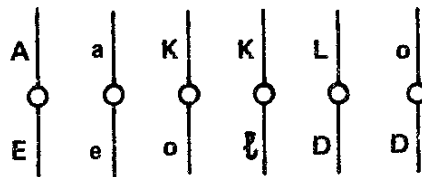
1. При облучении рентгеновыми лучами иногда возникают хромосомные aberrации, а иногда — хроматидные. Как это можно объяснить?

2. Особь $ABCDE/abcde$ гетерозиготна по инверсии, затрагивающей участок ABC . Каким образом это скажется на частоте выявляемого кроссинговера между генами A и B ? A и D ? D и E ?

3. Почему инверсии называют запирателями кроссинговера?

4. Какое влияние на конъюгацию хромосом и жизнеспособность продуктов мейоза оказывает гетерозиготность по транслокации?

5. Нарисуйте схему конъюгации следующих хромосом в мейозе:



6. Изобразите конъюгацию хромосом, имеющих следующие расположения генов: $ABCDEFGHI$ и $AEDCBFHGI$. Какие события могут способствовать превращению первой последовательности генов во вторую?

7. Особь $\frac{abce}{abce}$ скрещивают с особью $\frac{ACBE}{ACBE}$. Какие полноценные и дефектные продукты мейоза будет образовывать потомство этой пары? Проиллюстрируйте схемой.

8. Как выглядит картина конъюгации в мейозе двух гомологичных хромосом (обозначения генов в хромосомах произвольные), если одна из них утратила три гена примерно в середине хромосомы?

9. Как можно объяснить образование в анафазе I мейоза моста и фрагмента?

10. При скрещивании гомозигот фенотипа $ABCD$ и $abcd$ с нормальной фертильностью у особей F_1 фертильность снижена, а в диакинезе мейоза у них наблюдаются кольца, включающие более двух хромосом. Объясните этот феномен и проиллюстрируйте схемой.

11. В диакинезе мейоза в клетках образуется кольцо из шести хромосом. Объясните наблюдаемую картину.

12. В хромосоме ABCDEFGH произошли инверсии: 1) AEDCBFGH и 2) ABCGFEDH. Изобразите конъюгацию хромосом у гетерозиготы, несущей обе инверсии в гомологичных хромосомах.

Глава 14

Полиплоидия и анеуплоидия

Всеобъемлющая изменчивость затрагивает любые признаки и любые генетические структуры: гены, хромосомы, геномы. Полиплоидия и анеуплоидия представляют собой результат изменений числа хромосом, которые, согласно традиционной классификации, относят к геномным мутациям, т. е. изменениям генома — гаплоидного набора хромосом с локализованными в них генами.

Наряду с последовательными регулярными изменениями пloidности или числа наборов хромосом ($2n \rightleftharpoons n$) в жизненных циклах эукариот встречаются случаи сверхнормального умножения числа хромосом. Если такие изменения пропорциональны (кратны) гаплоидному набору (n), то говорят о полиплоидии или полиплоидизации. Если изменяется число экземпляров только одной или некоторых хромосом набора, то говорят об анеуплоидии.

Уже говорилось о том, что вопрос об отнесении хромосомных перестроек к мутациям становится дискуссионным по мере выяснения механизма этих изменений. Аналогичные сомнения касаются анеуплоидии и полиплоидии. Рассмотрение этих типов изменчивости генетического материала как мутаций скорее отражает еще недостаточную изученность изменчивости в целом. Полиплоидия (а также гаплоидия) — это в строгом смысле показатель степени повторений одного и того же генома в составе комплексов более высокого порядка. При автополиплоидии повторен один и тот же геном, а при аллополиплоидии — два или более разных генома.

Полиплоидия широко и неравномерно распространена в природе. Известны полиплоидные эукариотические микроорганизмы — грибы и водоросли, часто встречаются полиплоиды среди цветковых растений, но не среди голосеменных. Макронуклеусы большинства простейших в высокой степени полиплоидны. Полиплоидия всего организма у животных редка, хотя у них часто встречается *эндополиплоидия* некоторых дифференцированных тканей, например печени у млекопитающих, а также тканей ки-

щечника, слюнных желез, мальпигиевых сосудов ряда насекомых.

Степень распространения полиплоидии среди разных групп организмов связывают с ограничениями, которые накладывает, в частности у животных, хромосомный механизм определения пола. Поэтому полиплоидия встречается у гермафродитов и тех животных, которые размножаются апомиктически, утратив регулярный половой процесс. Причинами возникновения полиплоидов могут быть нарушения в митотических и мейотических делениях клеток и гибридизация.

Частота встречаемости полиплоидных форм зависит от географической широты местности. В высоких широтах полиплоидия чаще в северном полушарии, и аналогичные тенденции наблюдаются в южном полушарии. Частота полиплоидии увеличивается также в высокогорных районах. Эти факты принято связывать с лучшей адаптированностью полиплоидов к холодным условиям.

14.1. Автополиплоидия

Автополиплоидия, или повторение в клетке одного и того же хромосомного набора, свойственна простейшим и часто встречается у растений. Известно, что макронуклеус инфузорий полиплоиден в высокой степени. Это состояние закономерно возобновляется после мейоза диплоидного макронуклеуса и дифференцировки макронуклеуса (см. гл. 8). Пloidность макронуклеуса простейших может достигать нескольких сот и более тысячи (точная оценка в этих случаях затруднительна).

Значительно меньший уровень ploидности известен для полиплоидов растений: как правило, в пределах 10n. При этом бывают ди-, три-, тетраплоиды и т. д., имеющие соответственно два, три, четыре и т. д. повторений одного и того же генома. Такие полиплоиды могут возникать спонтанно в результате полиплоидизации соматических клеток растений, в результате чего получают *мозаики* — особи, содержащие как диплоидные, так и полиплоидные ткани. Часто полиплоидные формы получают из них путем вегетативного размножения различных частей растения.

Для искусственного получения полиплоидов применяют агенты, блокирующие расхождение удвоившихся хромосом; например, алкалоид *колхицин*, вырабатываемый безвременником (*Colchicum autumnale*), связывается с субъединицами белка *тубулина*, обычно полимеризующегося с образованием нитей веретена. Колхицин, а также другие митозные яды, например *винбластин*, препятствуют полимеризации тубулина и тем самым блокируют расхождение хромосом. *Камфора* вызывает эндомитотическую полиплоидизацию у дрожжей, при действии на которые колхицин, в частности, не эффективен.

Другой путь возникновения автополиплоидов у растений — образование *нередуцированных микро- и макроспор*, которое

может происходить под влиянием повышения или понижения температуры, действия наркотических веществ и др. В этих случаях хромосомы не конъюгируют в профазе I и могут быть включены в одно ядро в телофазе I. Далее это ядро проходит II деление и образует не четыре, а две клетки — диады. Возможно также нарушение II деления мейоза. В обоих случаях в итоге образуются нередуцированные — диплоидные пыльцевые зерна или яйцеклетки.

Полиплоиды можно получить у некоторых животных, в частности у амфибий. Если на свежееплодотворенные яйца тритона воздействовать высокой или низкой температурой, из них иногда возникают триплоидные экземпляры. Особым гигантизмом они не отличаются и обычно рано погибают. Находили и триплоидных головастиков лягушек.

Полиплоидные формы получены Б. Л. Астауровым у шелкопряда *Bombix mori*. В результате температурной обработки яйца шелкопряда переходят к партеногенетическому развитию (см. гл. 8). В некоторых случаях в результате таких воздействий были получены и тетраплоидные самки.

Полиплоидия довольно подробно исследована у эукариотического микроорганизма — дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Полиплоиды обнаружены среди производственных штаммов. Кроме того, у этого объекта можно получить полиплоидные серии от 2 до $8n$ на основе контролируемой гибридизации.

Принято различать *сбалансированные полиплоиды* с четным числом наборов хромосом: $4n$, $6n$, $8n$ и т. д. — и *несбалансированные полиплоиды* с нечетной плоидностью: $3n$, $5n$, $7n$ и т. д. Последние обычно имеют пониженную фертильность, поскольку нечетное повторение каждой из хромосом создает препятствие для их регулярной конъюгации и последующего распределения в мейозе. Такой проблемы не возникает у сбалансированных полиплоидов.

Полиплоидные формы, особенно сбалансированные, отличаются от своих диплоидных прародителей большей относительной мощностью: имеют более крупные листья, цветки, семена, более мощные и грубые стебли (рис. 14.1). Полиплоидные клетки и их ядра также крупнее. Не случайно, что первым описанным полиплоидом оказался «мутант» *Oenothera lamarckiana*, который получил Г. Де Фриз. Эта гигантская энотера имела 48 хромосом в отличие от обычной формы, у которой $2n = 24$. По критерию большей мощности проводится первичная оценка при получении полиплоидных растений или их побегов в случае химерных организмов. При этом окончательными критериями служат подсчет числа хромосом, оценка количества ДНК на ядро или данные генетического анализа.

Для многих растений известны так называемые полиплоидные ряды (см., например, табл. 14.1). Они включают формы от 2 до $10n$ и более. Большинство родов цветковых растений представляет собой полиплоидные ряды. Не всегда можно с уверен-

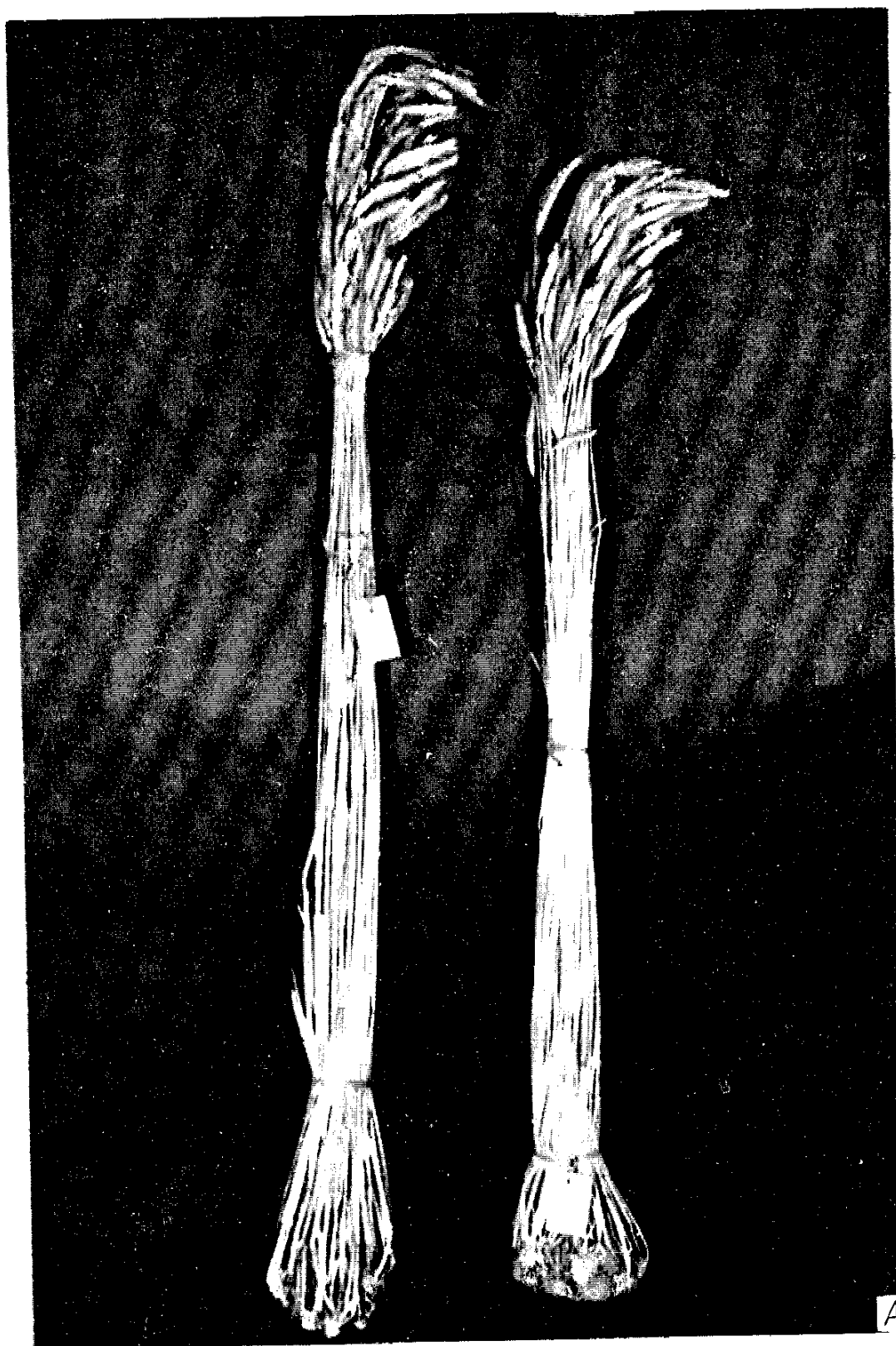


Рис. 14.1. Полиплоидия у ржи. *A* — снопы; *Б* — зерна и *В* — метафазные пластинки диплоидной (слева) и тетраплоидной (справа) ржи

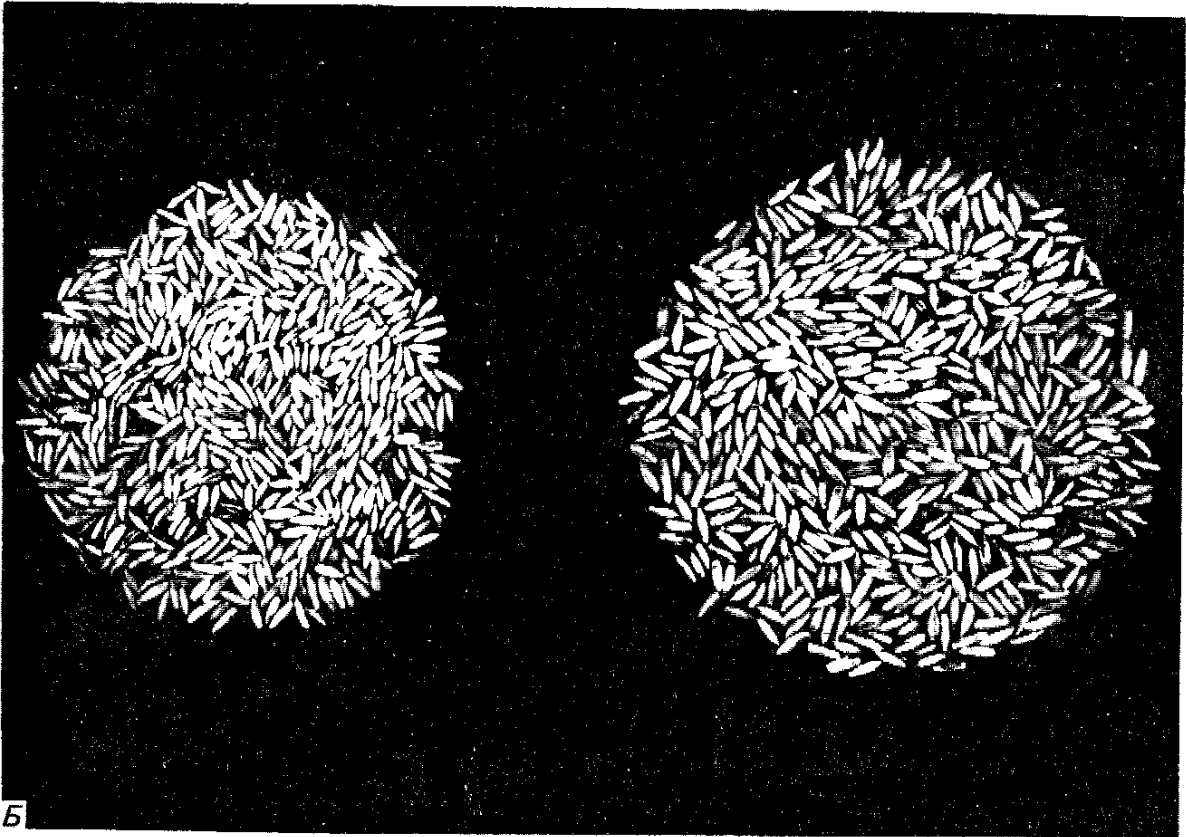


Рис.14.1. Продолжение

Таблица 14.1. Полиплоидные ряды у злаковых трав (из У. Вильямса, 1968)

Вид	Числа хромосом								
	14	21	28	35	42	49	56	63	70
<i>Agrostis stolonifera</i>	—	—	+	+	+	—	—	—	—
<i>Holcus mollis</i>	+	—	+	+	+	+	—	—	—
<i>Calamagrostis brewerii</i>	—	—	+	—	+	—	—	—	—
<i>C. epigejos</i>	—	—	+	—	+	—	+	—	—
<i>Festuca rubra</i>	+	—	—	—	+	—	+	—	+
<i>F. ovina</i>	+	+	+	—	+	+	+	—	+
<i>Alopecurus pratensis</i>	—	—	+	—	+	—	—	—	—
<i>Agropiron repens</i>	—	—	+	—	+	—	—	—	—
<i>A. duvalii</i>	—	—	—	+	+	—	—	—	—
<i>Phalaris arundinacea</i>	—	—	+	+	+	—	+	—	—
<i>Bromus ramosus</i>	+	—	+	—	+	—	—	—	—
<i>B. erectus</i>	—	—	—	—	+	—	+	—	—
<i>B. inermis</i>	—	—	—	—	+	—	+	—	+

Примечание. «+» — наличие, «—» — отсутствие данного хромосомного набора у вида.

ностью сказать, происходят ли те или иные природные полиплоидные формы в результате автополиплоидии или в результате аллоплоидии, поскольку существование в одном организме нескольких, даже исходно идентичных геномов неизбежно при-



Рис. 14.2. Диплоидная (А), триплоидная (Б) и тетраплоидная (В) формы земляники *Fragaria vesca* L. (фото Н. М. Иркаевой)

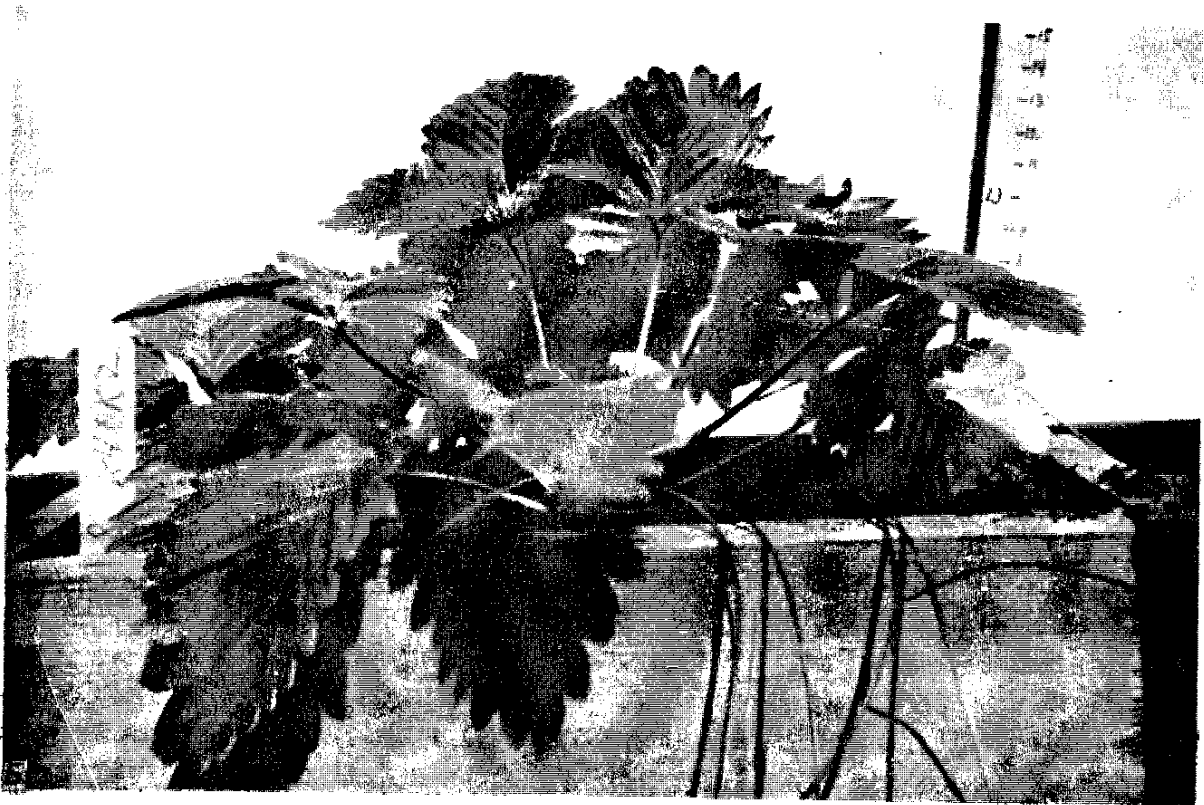


Рис. 14.2. Продолжение

водит к их дивергенции. Полиплоидные формы обычны среди культурных растений, и наиболее продуктивные формы имеют наибольшие числа хромосом. Это справедливо для пшеницы, овса, картофеля, табака, люцерны и др., а также для многих плодовых деревьев и декоративных растений. Это правило имеет ряд исключений: например, рожь, ячмень, свекла — диплоидные формы.

Не всегда полиплоидизация влечет за собой улучшение исходной формы. Так, у пшеницы с 42 хромосомами при удвоении их числа до 84 развиваются слабые растения, в то время как тетраплоидная рожь ($4n=28$) по многим показателям превосходит диплоидную ($2n=14$). Эта разница последствий полиплоидизации может быть связана с тем, что 42-хромосомные пшеницы сами по себе — уже гексаплоиды (аллополиплоиды), и, по-видимому, увеличение плоидности для каждого вида имеет свои пределы, по достижении которых дальнейшая полиплоидизация приводит к отрицательным эффектам. В то же время рожь — диплоидная культура, являющаяся оптимальной формой для дальнейшей полиплоидизации-тетраплоидизации.

Чаще всего оптимальна четная плоидность; например, опыление тетраплоидного сорта ржи пылью диплоидного сорта приводит к образованию триплоидных зародышей, которые погибают на ранних стадиях развития.

Тем не менее у многих растений именно триплоиды проявляют признаки большей мощности и более высокой продуктивности, чем диплоиды или тетраплоиды. Известна гигантская осина — автотриплоид ($3n=57$), встречающаяся в природе. Автотетраплоиды осины в природе не найдены, а созданные искусственно уступали триплоидам. Триплоидная свекла ($3n=27$) превосходит как диплоидную, так и тетраплоидную формы, от скрещивания которых она получена. Известны удачные триплоидные сорта яблонь ($3n=51$). Триплоиды земляники по мощности развития вегетативной массы превосходят диплоидные и тетраплоидные формы (рис. 14.2).

В любом случае получение первичной полиплоидной формы всегда означает только начало селекционного процесса, в ходе которого путем скрещивания полиплоидов и последующей рекомбинации удается оптимизировать выражение признаков и получить гармонично развитые растения.

—14.2. Мейоз у автополиплоидов

Принципиальное значение для понимания сущности полиплоидии имеет знание поведения хромосом в мейозе у полиплоидов. Например, в клетках тетраплоида содержатся четыре экземпляра каждой хромосомы. Если у диплоидной ржи *Secale cereale* в профазе мейоза образуются 7 бивалентов ($2n=14$), то у тетраплоидной формы могут возникнуть 7 квадριвалентов

($4n = 28$) — групп, состоящих из четырех конъюгирующих хромосом. В действительности образуются не только квадριваленты, но и *триваленты* — три конъюгирующие хромосомы плюс унивалент или биваленты. Обычно среднее число квадριвалентов на клетку ниже их максимально возможного числа. У некоторых полиплоидных видов квадριвалентов вообще не бывает и конъюгация происходит исключительно бивалентами.

Квадριвалентная конъюгация — условие образования сбалансированных — диплоидных продуктов мейоза. Из-за нарушений конъюгации хромосом часто возникают анеуплоидные споры, что приводит к их пониженной жизнеспособности у растений и в результате к пониженной фертильности тетраплоидов. Обычно стерильность сильнее выражена при микроспорогенезе, чем при мегаспорогенезе. Эти негативные явления в то же время предоставляют известные преимущества для сохранения полиплоидии в природных условиях. У многих родов растений очень высока чувствительность к анеуплоидии — анеуплоидные особи не выживают. Благодаря этому в природе сохраняются почти исключительно полиплоидные формы с числом хромосом, кратным гаплоидному набору.

Максимальные нарушения в распределении хромосом наблюдаются в мейозе у несбалансированных полиплоидов с нечетным числом хромосомных наборов. Так, триплоидные формы почти всегда полностью стерильны. Это связано с тем, что три экземпляра каждой из негомологичных хромосом, даже при тривалентной конъюгации, расходятся независимо: две к одному полюсу, одна — к другому. Вероятность того, что у одного полюса окажутся два полных набора хромосом, а у другого — один полный набор, очень мала: $(1/2)^n$, где $1/2$ — вероятность расхождения для каждой серии гомологов в соотношении 1:2 к разным полюсам, а n — число хромосом в гаплоидном наборе. Тогда для триплоида с $3n = 21$ эта величина составит $(1/2)^7 = 1/128$. Такой расчет отражает ситуацию лишь приблизительно, поскольку у триплоидов не всегда происходит тривалентная конъюгация, так же как не всегда осуществляется и квадριвалентная конъюгация у тетраплоидов. В итоге вероятность образования сбалансированных спор у триплоидов оказывается еще ниже величины, рассчитанной указанным способом. Следствием этого является высокий уровень стерильности — почти полное отсутствие семян.

Использование тетрадного анализа для изучения полиплоидных дрожжей-сахаромицетов показало, что их триплоиды никогда не дают четырех жизнеспособных продуктов мейоза и очень редко жизнеспособными бывают два. Общая фертильность (жизнеспособность аскоспор) триплоидов не превышает 10—15 %, а выживающие продукты мейоза обычно анеуплоидны.

Стерильны природные триплоиды растений банана, ясеня, осины. Искусственно полученный триплоидный арбуз не образу-

ет семян. Эта форма воспроизводится путем скрещивания тетраплоидного и диплоидного арбузов. Так же получают и семена триплоидной свеклы.

—14.3. Генетический анализ у автополиплоидов

Особенности *расщепления полиплоидов* связаны с наличием более двух гомологов каждой хромосомы и определяются характером их конъюгации. Если обратиться к тетраплоидным гибридам, наиболее изученным в генетическом отношении, то прежде всего следует отметить то, что в данном случае возможно существование двух полностью гомозиготных и трех гетерозиготных форм. В зависимости от числа доминантных аллелей в гетерозиготе их называют соответственно: *AAAA* — *квадриплекс*, *aaaa* — *нуллиплекс*, *AAAa* — *триплекс*, *AAaa* — *дуплекс*, *Aaaa* — *симплекс*. Эта ситуация существенно отличается от наблюдаемой у диплоидов, где возможны только три генетически различные конституции по одному гену: гомозиготы *AA*, *aa* и гетерозигота *Aa*. Кроме того, у полиплоидов естественно *нарушается правило чистоты гамет*, поскольку в результате мейоза с большей или меньшей частотой образуются гетерозиготные гаметы.

Соотношение типов гамет, продуцируемых полиплоидами, прежде всего определяется наличием или отсутствием сцепления между исследуемым геном и центромерой. При полном сцеплении ген-центромера расщепление идет по *хромосомному типу*, т. е. гомологичные хромосомы ведут себя как случайно комбинирующиеся единицы.

Другой вариант расщепления полиплоидов — *хроматидное расщепление*, когда ген не обнаруживает сцепления с центромерой и случайно комбинируются не хромосомы, а хроматиды (табл. 14.2).

Хромосомное и хроматидное расщепление часто рассматривают как крайние варианты и сопоставляют с ними соотношения, наблюдаемые в потомстве гибридов-полиплоидов. Подобные сравнения приблизительны, поскольку строго хромосомное расщепление наблюдается очень редко — при абсолютном сцепле-

Таблица 14.2. Соотношение типов гамет у тетраплоидов

Тетраплоид	Генотип	Соотношение типов гамет при	
		хромосомном расщеплении	хроматидном расщеплении
Квадриплекс	<i>AAAA</i>	<i>AA</i>	<i>AA</i>
Триплекс	<i>AAAa</i>	<i>1AA : 1Aa</i>	<i>15AA : 12Aa : 1aa</i>
Дуплекс	<i>AAaa</i>	<i>1AA : 4Aa : 1aa</i>	<i>3AA : 8Aa : 3aa</i>
Симплекс	<i>Aaaa</i>	<i>1Aa : 1aa</i>	<i>1AA : 12Aa : 15aa</i>
Нуллиплекс	<i>aaaa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>

нии ген — центромера. Исключительно хроматидное расщепление не может наблюдаться и по причинам, на которые впервые указали К. Мазер и Р. Фишер. Причины следующие.

Во-первых, этому препятствует частичное сцепление генов с центромерами. Во-вторых, огромное влияние на характер расщепления у полиплоидов оказывает поведение гомологичных хромосом в мейозе: а) тип конъюгации (мультивалентная или бивалентная), б) характер расхождения в анафазе I.

Последовательность событий, в результате которых, например у тетраплоида триплекса (AAAA), образуются гаметы *aa*, называется *двойной редукцией*. Рассмотрим эти события.

Первое условие, необходимое для осуществления двойной редукции, — регулярная конъюгация квадривалентами. Поскольку для центромеры I деление мейоза всегда редукционное, частота *редукции* по маркеру при I делении зависит от расстояния ген — центромера, т. е. от частоты кроссинговера на этом участке. Кроссоверные хроматиды при I делении мейоза могут отойти к одному полюсу (рис. 14.3). Только в этом случае обе хроматиды с рецессивной аллелью имеют шанс оказаться в одной гамете при II делении, и тогда появится гомозиготная гамета *aa*. Таким образом, редукция по гену *A/a* происходит при двух делениях мейоза, отсюда и термин «двойная редукция».

К. Мазер предложил рассматривать вероятность двойной редукции (α) как произведение вероятностей. $\alpha = e \cdot a$, где e — частота «эквационного» расхождения факторов *A* и *a* при I делении мейоза. Она определяется частотой рекомбинации на участке ген — центромера и может варьировать от 0 до 1, когда между геном и центромерой регулярно происходит один обмен (50 % кроссинговера). Вторая величина — a — частота *генетического нерасхождения*, которая определяется вероятностью того, что в анафазе I обе кроссоверные хроматиды отойдут к одному полюсу. Это служит предпосылкой для образования в дальнейшем гаметы *aa*. Очевидно, максимальное значение генетического нерасхождения — $1/3$ (см. рис. 14.3). Непременным условием при этом являются конъюгация гомологов квадривалентами или бивалентами в случайных сочетаниях и случайное расхождение центромер.

Таким образом, максимальное значение двойной редукции: $\alpha = 1 \cdot 0,33$.

Соотношение типов гамет, образуемых триплексом, с учетом максимальной двойной редукции будет 13AA:10Aa:1aa.

Итак, на примере гаметического расщепления у тетраплоида триплекса видно, насколько изменяется сама основа менделевских соотношений у полиплоидов. В табл. 14.3 представлены соотношения типов гамет и фенотипов, ожидаемые при скрещивании различных тетраплоидов с учетом случайного хроматидного расщепления и при максимальной двойной редукции. Расчеты показывают, что так называемое случайное хроматидное

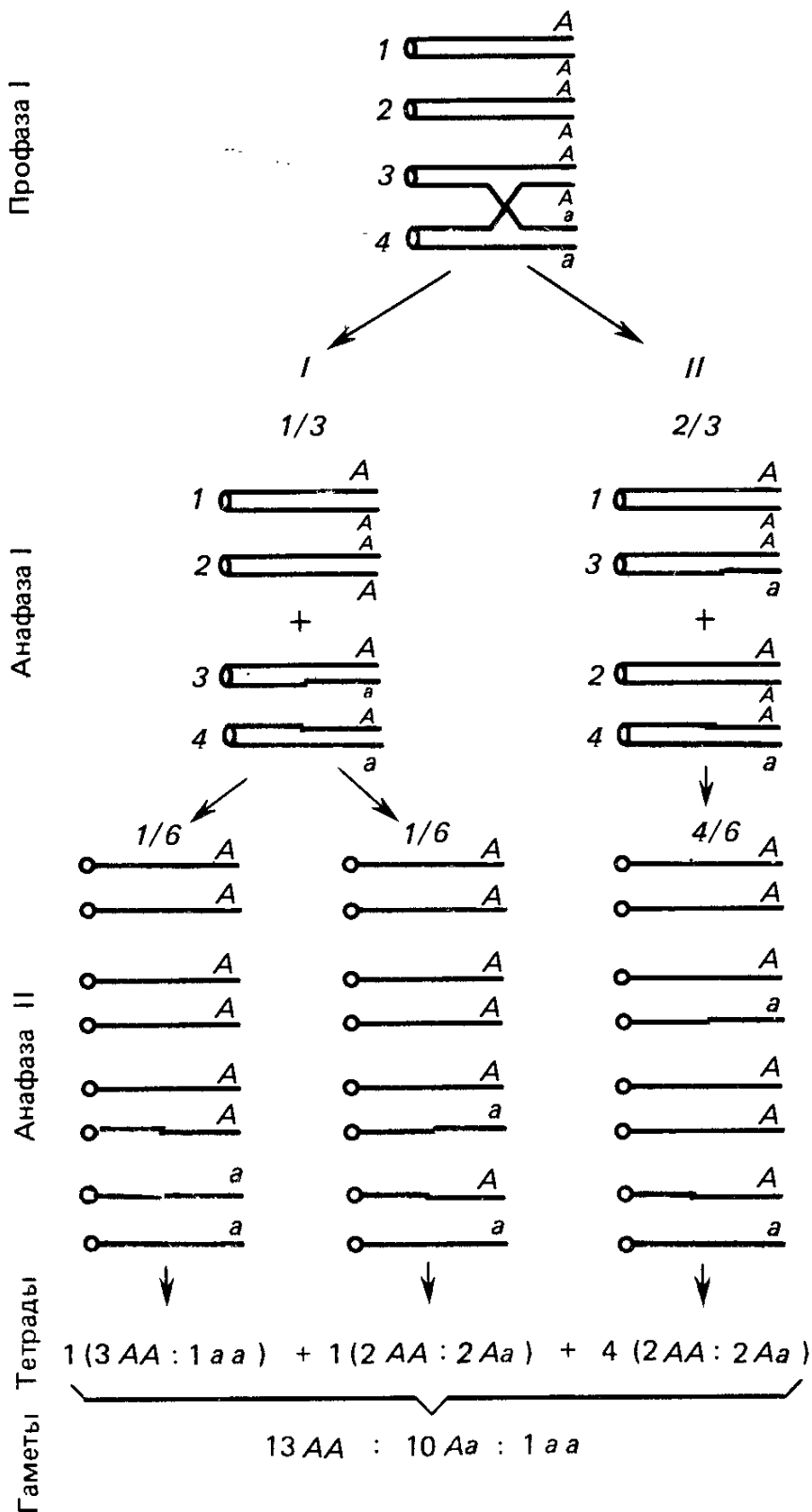


Рис. 14.3. Образование гамет у тетраплоида триплекса (AAAA) при условии максимальной двойной редукции.

Вероятность кроссинговера на участке ген — центромера равна 1. Конъюгация происходит тетравалентами. Цифры 1—4 — номера центромер. I и II — типы расхождения центромер в анафазе I. Тип II может быть получен двумя способами: когда у полюсов группируются центромеры 1, 3 и 2, 4 (способ показан на рисунке), а также 1, 4 и 2, 3 (не показан). Поэтому тип II должен встречаться в два раза чаще, чем тип I, который может быть получен только одним способом

Таблица 14.3. Случайное хроматидное расщепление и расщепление при максимальном значении двойной редукции (50 % кроссинговера между *A* и центромерой) у тетраплоидов (У. Уильямс, 1968)

Родители	Случайное хроматидное		50 % кроссинговера	
	соотношение гамет	соотношение фенотипов	соотношение гамет	соотношение фенотипов
AAAa } × AAAa	15AA : 12Aa : 1aa	783A : 1a	13AA : 10Aa : 1aa	575A : 1a
AAAa } × Aaaa	15AA : 12Aa : 1aa } 3AA : 8Aa : 3aa	389A : 3a	13AA : 10Aa : 1aa } 2AA : 5Aa : 2aa	107A : 1a
AAAa } × Aaaa	15AA : 12Aa : 1aa } 1AA : 12Aa : 15aa		769A : 15a	
Aaaa } × AAAa	15AA : 12Aa : 1aa } все aa	27A : 1a		13AA : 10Aa : 1aa } все aa
aaaa } × AAAa	3AA : 8Aa : 3aa		187A : 9a	2AA : 5Aa : 2aa
Aaaa } × Aaaa	3AA : 8Aa : 3aa	347A : 45a	2AA : 5Aa : 2aa } 1AA : 10Aa : 13aa	95A : 13a
Aaaa } × Aaaa	1AA : 12Aa : 15aa } 3AA : 8Aa : 3aa		11A : 3a	
aaaa } × Aaaa	1AA : 12Aa : 15aa } 1AA : 12Aa : 15aa	599A : 225a		1AA : 10Aa : 13aa } 1AA : 10Aa : 13aa
Aaaa } × Aaaa	1AA : 12Aa : 15aa } все aa		13A : 15a	1AA : 10Aa : 13aa } все aa
aaaa } × Aaaa	1AA : 12Aa : 15aa } все aa			

Примечание. Во всех случаях доминирование полное.

расщепление в действительности соответствует частоте кроссинговера на участке ген — центромера — 42,85 % с учетом двойной редукции.

Итак, теоретическое рассмотрение результатов расщепления у полиплоидов — это рассмотрение идеальной ситуации. В действительности параметры двойной редукции изменчивы: частота кроссинговера, характер конъюгации и расхождения хромосом находятся под генетическим контролем, следовательно, варьируют в зависимости от генотипа, а также под воздействием факторов среды.

Величину двойной редукции можно определить экспериментально. Как предложил К. Мазер (1941), имея данные по расщеплению при самоопылении тетраплоида, величину α находят в зависимости от частоты рецессивного фенотипа (Z). Для симплекса: $\alpha_s = 8\sqrt{Z} - 4$; для триплекса: $\alpha_T = 8 \cdot \sqrt{Z}$; для дуплекса: $\alpha_D = 6\sqrt{Z} - 1$.

Учитывая расщепление на гаметическом уровне с примене-

нием тетрадного анализа, что возможно у полиплоидных дрожжей, величину α можно определить для тетраплоида — триплекса как удвоенную частоту тетрад с соотношением (3AA:1aa), которые будут появляться наряду с тетрадами (2AA:2Aa). Этот вывод согласуется с данными рис. 14.3.

Таким образом, генетический анализ у автополиплоидов по сравнению с таковым у диплоидов отличается следующими особенностями.

1. Частота выщепления рецессивных фенотипов значительно ниже, чем у диплоидов. Кроме того, из-за нарушений расхождения хромосом в мейозе наблюдается высокий процент стерильности.

2. Типичное расщепление у автополиплоидов может быть хромосомным и хроматидным. Последнее модифицируется величиной двойной редукции.

3. Часто отмечается неодинаковая жизнеспособность различных классов расщепления, зависящая от соотношения дозы доминантных и рецессивных аллелей. В то же время полное доминирование затрудняет идентификацию генотипов.

4. Некоторым преимуществом генетического анализа полиплоидов служит возможность определения сцепления генов с центромерами на основе сопоставления наблюдаемого расщепления при моногибридном скрещивании с ожидаемым при хроматидном и хромосомном расщеплении. У диплоидов этого сделать нельзя.

5. Наконец, у видов с гаметофитным типом несовместимости (см. гл. 8) может нарушаться реакция самостерильности, что способствует выведению самофертильных полиплоидных форм.

14.4. Аллополиплоидия

Как уже отмечалось, многие растения являются природными полиплоидами. Однако чаще всего их полиплоидные ряды не результат автополиплоидизации, а следствие объединения различных геномов посредством гибридизации. Очевидно, при гибридизации двух разных видов даже с одинаковым числом хромосом у полученного *амфигаплоида* трудно ожидать нормального течения мейоза. Конъюгация хромосом в профазе I мейоза будет нарушена из-за отсутствия гомологов. Если же геномы *A* и *B*, объединившиеся в амфигаплоиде, удвоятся (*AABB*), т. е. произойдет полиплоидизация, то фертильность такого *амфидиплоида*, или *аллотетраплоида*, будет восстановлена, поскольку теперь хромосомы могут образовывать нормальные пары при конъюгации. Собственно именно так и поступают при синтезе новых форм путем отдаленной гибридизации.

Классический пример искусственного амфидиплоида — получение плодового гибрида между капустой (*♂ Brassica oleracea*) и редькой (*♂ Raphanus sativus*), которое в начале 20-х годов осуществил Г. Д. Карпеченко. Числа хромосом у этих растений

одинаковы ($2n = 18$), однако они принадлежат к разным родам и созданный Г. Д. Карпеченко межродовой гибрид был полностью стерильным, несмотря на то что у него также было 18 хромосом. От этого гибрида путем слияния редких нередуцированных гамет удалось получить аллотетраплоид. Аллотетраплоид имел 36 хромосом (по 18 от каждого исходного вида) и был фертильным (рис. 14.4). По фенотипу этот новый растительный организм, названный *Raphanobrassica*, совмещал признаки редьки и капусты, например в строении стручка (рис. 14.4), и оставался константным при размножении за счет самоопыления.

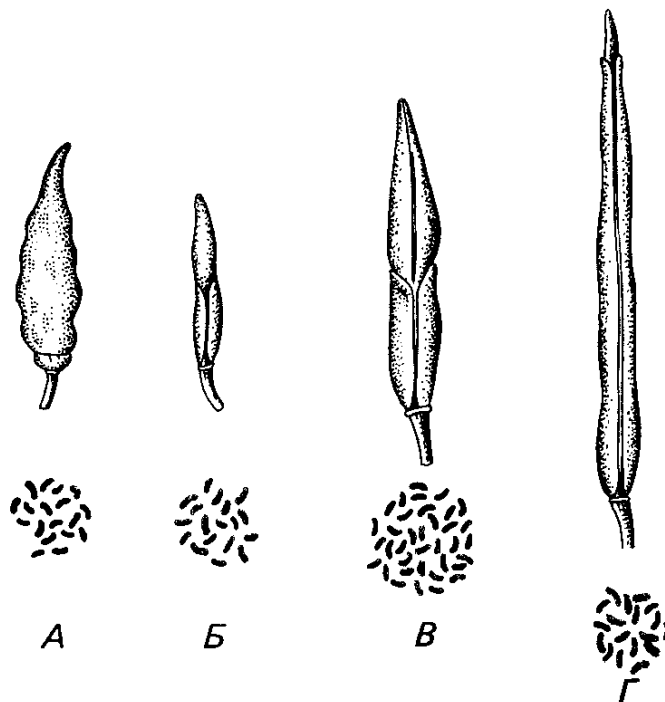


Рис. 14.4. Стручки и хромосомные наборы (по Г. Д. Карпеченко, 1927): А — редьки (*R. sativus*); Г — капусты (*B. oleracea*); Б — амфигаплоида и В — амфидиплоида, полученных от их скрещивания

Эти и подобные эксперименты прекрасно подтверждают теорию О. Винге (1917), согласно которой полиплоидные ряды в природе возникают путем гибридизации видов и последующего удвоения обоих родительских хромосомных наборов. Многие растения действительно представляют собой аллополиплоиды. Например, пшеница *Triticum aestivum* ($2n = 42$) имеет геномную формулу: *AABBDD*, т. е. является гексаплоидом с тремя разными геномами. Ее геномы *AB* соответствуют другому виду пшеницы — аллотетраплоиду *T. dicoccum*. Третий геном *D*, скорее всего, происходит от злака другого рода — *Aegilops squarrosa*, имеющего 14 хромосом. Путем скрещивания *A. squarrosa* ($2n = 14$) с *T. dicoccoides* ($4n = 28$) удалось получить гибрид с 21 хромосомой. Удвоение этого набора дало форму с 42 хромосомами, очень похожую на *T. aestivum*. Синтетический и природный 42-хромосомные аллогексаплоиды скрещивают с образованием плодовых гибридов, у которых хромосомы в мейозе распределяются регулярно. Таким образом, осуществляется *ресинтез видов*, существующих в природе, и выясняются пути их возникновения. По-видимому, аналогичным путем возникли и 28-хромосомные пшеницы.

Исследования такого рода, дополненные цитологическим методом — изучением мейоза и конъюгации хромосом, составляют содержание раздела генетики, известного как *геномный анализ*. Геномный анализ выявляет не только геномную формулу дикорастущих и культурных растений, но и сходство и разли-

чия самих геномов и отдельных хромосом у аллополиплоидов. Тем самым создается картина эволюции на уровне генома как единицы дискретности генетического материала.

Часто геномы, входящие в состав аллополиплоидов, содержат гомологичные гены и целые участки хромосом, которые называют *гомеологичными*. Гомеология хромосом выявляется по их способности к гомеологичной конъюгации отдельными участками, содержащими гомологичные гены, что лучше всего показано при изучении абберантных мейозов у амфигаплоидов. Расщепление по гомологичным генам у аллополиплоидов часто носит характер некумулятивной или кумулятивной полимерии (см. гл. 3).

14.5. Анеуплоидия

Анеуплоидия, или гетероплоидия, возникает вследствие изменения числа хромосом, не кратного гаплоидному набору. Об этом уже упоминалось в гл. 5, где обсуждалось нерасхождение и потери X-хромосом у *D. melanogaster*. В результате нерасхождения хромосом при гаметогенезе могут возникать половые клетки с лишними хромосомами, и тогда при последующем слиянии с нормальными гаплоидными гаметами они образуют зиготы $2n+1$, или *трисомики*, по определенной хромосоме. Если в гамете оказалось меньше на одну хромосому, то последующее оплодотворение приведет к образованию зиготы $2n-1$, или *моносомика*, по какой-либо из хромосом. Полисомия и моносомия могут иметь самостоятельное фенотипическое проявление вследствие изменения соотношений доз некоторых генов или нарушения генного баланса. Так, А. Блексли и Дж. Беллинг в 20-х годах показали, что создание трисомиков по каждой из 12 хромосом у дурмана (*Datura stramonium*) приводит к появлению характерного, отличного от других типа растения. В частности, это выражалось в специфическом изменении формы семенной коробочки.

Часто, особенно у животных и человека, лишняя хромосома обуславливает депрессию развития и летальность. Например, лишняя X-хромосома или 21-я хромосома у человека обуславливает тяжелые аномалии (см. гл. 20).

Расщепление по генам, локализованным в лишней хромосоме, подчиняется законам расщепления полиплоидов с учетом явления двойной редукции. В этом случае при скрещивании трисомика и нормального диплоида анализ ведется, как и при скрещивании триплоида и диплоида (табл. 14.4). Существенная разница заключается в том, что фертильность трисомика, особенно если он используется в качестве материнской формы, бывает нормальной или по меньшей мере значительно превосходит фертильность триплоида.

Даже в простейших случаях при сравнении расщепления в скрещивании гетерозиготных трисомиков: симплекса (*Aaa*) и ду-

Таблица 14.4. Расщепления, ожидаемые при скрещивании трисомиков и диплоидов-дисомиков при полном сцеплении гена и центромеры (хромосомное расщепление)

Генотип (соотношение типов гамет)	aa (a)	Aa (1A : 1a)	AA (A)	aaa (1aa : 1a)	Aaa (2Aa : 1aa : 1A : 2a)	AAa (1AA : 2Aa : 2A : 1a)	AAA (1AA : 1A)
AAA (1AA : 1A)	1AAa : 1Aa <u>Все A</u>	1AAA : 1AAa : 1AA : 1Aa <u>Все A</u>	1AAA : 1AA <u>Все A</u>	1AAaa : 1AAa : 1Aaa : 1Aa <u>Все A</u>	2AAAA : 1AAA : 5AAa : 1Aaa : 1AA : 2Aa <u>Все A</u>	1AAA : 2AAAa : 3AAA : 3AAa : 2AA : 1Aa <u>Все A</u>	1AAA : 2AAA : 3AAA : 1AA : 1Aa <u>Все A</u>
AAa (1AA : 2Aa : 2A : 1a)	1AAa : 2Aaa : 2Aa : 1aa <u>Все A</u>	1AAA : 3AAa : 2AAa : 2AA : 3Aa : 1aa <u>Все A</u>	1AAA : 2AAa : 2AA : 1Aa <u>Все A</u>	1AAaa : 2Aaaa : 1Aaaa : 1Aaa : 1AAa : 4Aaa : 2Aa : 1aa <u>Все A</u>	2AAAA : 2Aaaa : 1AAA : 8AAa : 8Aaa : 1aaaa : 2AA : 5Aa : 2aa <u>Все A</u>	1AAA : 4AAAa : 4AAA : 10AAA : 4AAa : 4AA : 4Aa : 1aa <u>Все A</u>	1AAA : 4AAAa : 4AAA : 10AAA : 4AAa : 4AA : 4Aa : 1aa <u>Все A</u>
Aaa (2Aa : 1aa : 1A : 2a)	5A : 1a 2Aaa : 1aaa : 1Aa : 2aa <u>Все A</u>	11A : 1a 2AAa : 3Aaa : 1aaa : 1AA : 3Aa : 2aa <u>Все A</u>	2AAa : 1Aaa : 1AA : 2Aa <u>Все A</u>	2Aaaa : 1Aaaa : 3Aaa : 1Aa : 2aa <u>Все A</u>	4AAAA : 4Aaaa : 1aaaa : 4AAA : 10AAA : 4Aaa : 4aa <u>Все A</u>	35A : 1a	
aaa (1aa : 1a)	1aaa : 1aa <u>Все a</u>	1Aaa : 1aaa : 1Aa : 1aa <u>Все a</u>	1Aaa : 1Aa <u>Все A</u>	1aaaa : 2aaa : 1aa <u>Все a</u>			
AA (A)	Aa <u>Все A</u>	1AA : 1Aa <u>Все A</u>	AA <u>Все A</u>				

Генотип (соотношение типов гамет)	aa (a)	Aa (1A : 1a)	AA (A)	aaa (1aa : 1a)	Aaa (1Aa : 1aa : 1A : 2a)	AAa (1AA : 2Aa : 2A : 1a)	AAA (1AA : 1A)
Aa (1A : 1a)	1Aa : 1aa <u>1A : 1a</u>	1AA : 2Aa : 1aa <u>3A : 1a</u>					
aa (a)	aa <u>Все a</u>						

Примечание. Представлено расщепление по генотипу и фенотипу (подчеркнуто).

плекса (AAa) — с диплоидом, гомозиготным рецессивом (aa), обнаруживается отличие от того, что ожидается при обычном анализирующем скрещивании (табл. 14.4).

Пыльцевые зерна, содержащие лишнюю хромосому, обычно не функционируют, в то время как мегаспоры и яйцеклетки жизнеспособны и с лишней хромосомой. Это правило специфически модифицирует соотношения, наблюдаемые при скрещивании трисомиков. Их легко вывести из данных табл. 14.4.

Нарушения в расщеплении при моногибридном скрещивании при трисомии широко используются для локализации генов в определенных хромосомах у растений. Если иметь набор трисомиков по отдельным хромосомам, то сравнительно просто получить дуплекс AAa по вновь локализуемому гену a, и при скрещивании таких форм отклонение от соотношения 3A — : 1aa будет указывать на то, что изучаемый ген находится в хромосоме, представленной тремя копиями.

Генетический анализ полисомиков позволяет определять сцепление гена с центромерой путем сопоставления формул хромосомного и хроматидного расщеплений с наблюдаемым в эксперименте.

Наряду с трисомией у некоторых организмов (грибы, некоторые растения, животные) можно наблюдать и моносомию, т. е. особей, имеющих $2n - 1$ хромосом. У диплоидных дрожжей-сахаромицетов моносомики жизнеспособны, однако при тетрадном анализе дают расщепление по жизнеспособности 2 : 2.

У диплоидных высших растений моносомия обычно летальна, несмотря на сохранение второго гомолога. Жизнеспособны моносомики у аллополиплоидов. Это объясняется гомеологией хромосом разных наборов аллополиплоида, как это, например, наблюдается у гексаплоидной пшеницы. Такую особенность аллополиплоидов используют для локализации генов в хромосомах

на основе моносомического анализа. У пшеницы получены также нуллисомики, у которых полностью отсутствует одна из пар хромосом. Очевидно, подобные нарушения не приводят к летальности только у аллополиплоидов со значительной гомологией хромосом разных наборов.

Моносомики известны и у животных: например, у *D. melanogaster* особи только с одной хромосомой 4 (*гапло-4*) жизнеспособны, однако такие мухи имеют меньшие размеры, чем обычно, менее плодовиты и имеют ряд морфологических отклонений от дикого типа. Моносомия по 2-й или 3-й хромосомам у дрозофилы летальна. Видимо, жизнеспособность гапло-4 связана с небольшой информационной емкостью 4-й хромосомы и отсутствием в ней жизненно важных генов, нарушение баланса которых с генами других хромосом резко сказывается на развитии организма.

Наряду с избытком или недостатком отдельных хромосом, характерных для данного вида, иногда встречаются так называемые *добавочные или В-хромосомы*. Эти добавочные хромосомы почти полностью состоят из гетерохроматина. Число их может варьировать и они, единожды появившись, имеют тенденцию накапливаться из поколения в поколение. Правда, избыток В-хромосом неблагоприятно влияет на развитие организма и таким образом особи с большим числом добавочных хромосом элиминируются. В-хромосомы описаны у многих растений, некоторых животных, например у лис, некоторых мышей, ящериц, насекомых. Число В-хромосом варьирует в широких пределах, например, у кукурузы их от 1 до 22. Растения разных популяций различаются по числу и частоте встречаемости В-хромосом. Значение их, несмотря на интенсивное изучение, пока не выяснено.

14.6 Замещение и дополнение хромосом

Явление анеуплоидии, в частности возможность получения нуллисомиков у некоторых растений, используется для создания линий, замещенных по отдельным хромосомам. Этот прием применяют в селекционной практике для выяснения роли отдельных хромосом в определении признаков продуктивности, устойчивости к болезням и т. д., а также для перенесения хромосом с известными генетическими детерминантами в тот или иной улучшаемый сорт, как это делается, например, в селекции гексаплоидной пшеницы (рис. 14.5).

Для этой цели форму, гомозиготную по рецессивной аллели замещаемой хромосомы, скрещивают с нуллисомиком, лишенным соответствующей хромосомы. В качестве нуллисомика используют, например, сорт Чайниз Спринг, для которого такая коллекция нуллисомиков была получена впервые. Гибрид от такого скрещивания будет иметь двадцать пар хромосом, образуя-

P

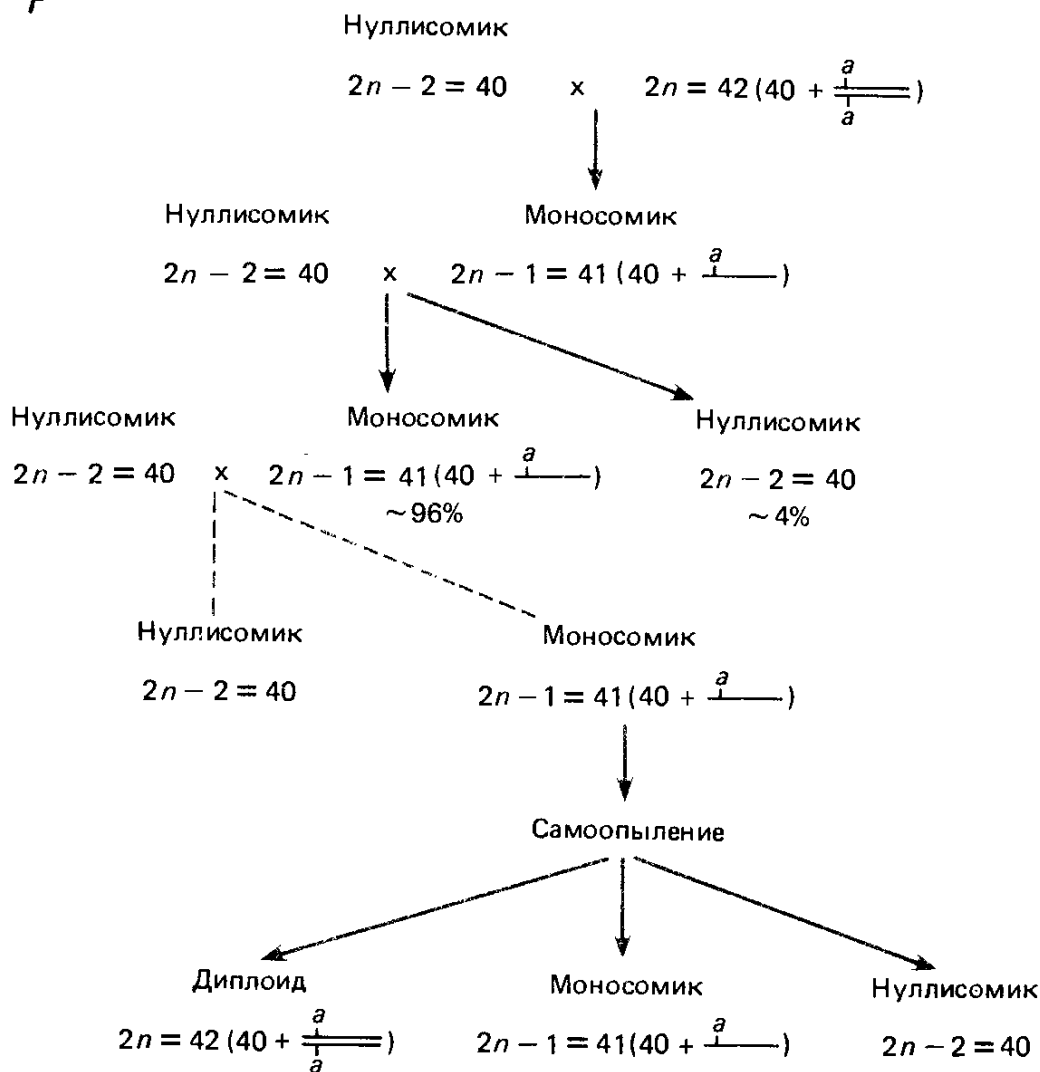


Рис. 14.5. Замещение хромосом у пшеницы путем многократных скрещиваний с родительским нуллисомиком (по Ф.Эллиот, 1961)

щих биваленты в мейозе и одну хромосому непарную. В мейозе она будет представлена унивалентом.

Далее проводят серию насыщающих скрещиваний с нуллисомной линией, в результате чего все хромосомы будут замещены на хромосомы сорта Чайниз Спринг, за исключением унивалентной. На последнем этапе проводят самоопыление, в результате которого выделяют диплоидную линию с замещенной парой хромосом.

Полный цикл насыщающих скрещиваний при замещении одной пары хромосом завершается в течение 6—12 поколений. Это трудная и длительная работа, требующая постоянного цитологического контроля. Разработка методов клеточной инженерии, о которых говорилось в гл. 11, призвана интенсифицировать решение подобных задач. Достаточно напомнить, что аналогичные проблемы с использованием элементов парасексуального цикла у эукариотических микроорганизмов решаются со значительно меньшими затратами труда и времени.

Линии с замещением отдельных хромосом выводят как при внутривидовых, так и при межвидовых скрещиваниях. Например, некоторые хромосомы пшеницы можно замещать хромо-

сомами ржи. Получают также анеуплоиды с дополнительными хромосомами одного и того же или разных видов растений. В качестве примера рассмотрим конструирование генома пшеницы с дополнительной хромосомой ржи.

При скрещивании ржи ($2n=14$) и пшеницы ($2n=42$) образуется ржано-пшеничный гибрид с $2n=28$, который в результате колхициновой полиплоидизации дает форму с 56 хромосомами, называемую *Triticale*. Скрещивая *Triticale* с мягкой пшеницей ($2n=42$), получают растения с $2n=49$, содержащие диплоидный набор пшеницы и гаплоидный набор ржи ($2n=42+7$). При последующих скрещиваниях этих растений с пшеницей может появиться потомство с числом хромосом от 42 до 49. Формы с набором хромосом $2n=43$ в дополнение к диплоидному набору пшеницы (в действительности это аллогексаплоид) несут одну хромосому ржи. При самоопылении таких растений (с $2n=43$) можно ожидать потомство с 42, 43 и 44 хромосомами. Растения с $2n=44$ — дисомики по одной паре хромосом ржи в дополнение к хромосомному набору пшеницы ($2n=42+2$).

Создание таких *дополненных по хромосомам линий*, кроме практической ценности — объединение полезных признаков обоих злаков, представляет и большой теоретический интерес в плане изучения гомологии генов, гомеологии хромосом и взаимодействия генетического материала разных видов. Сходным образом получают линии пшеницы с дополнительными хромосомами других злаков: *Haynaldia villosa* ($2n=14$), *Aegilops umbellulata* ($2n=14$) и др.

14.7. Гаплоидия

На примере гаплоидии особенно наглядна условность отнесения изменения пloidности к разряду мутаций. Во-первых, существуют организмы (как одноклеточные, так и многоклеточные), для которых гаплоидное состояние соматических клеток нормально: грибы, водоросли, а также самцы некоторых насекомых: пчел, муравьев, паразитических ос. Во-вторых, в жизненном цикле большинства эукариот смена гапло- и диплофазы закономерна (см. гл. 8).

Тем не менее *гаплоидию как аномальное состояние генома*, при котором гаплоидными оказываются организмы, в норме содержащие двойной набор хромосом, следует рассматривать особо. Гаплоидия на стадии спорофита описана для некоторых цветковых растений: томата, табака, льна, дурмана, некоторых злаков и др.

Обычно гаплоиды меньше диплоидов. Они более депрессивны у перекрестноопыляющихся растений, чем у самоопыляемых, что вероятнее всего объясняется сохранением у первых в гетерозиготе рецессивных аллелей с неблагоприятным действием. Во всех случаях клетки у гаплоидов мельче, чем у диплоид-

дов, что в основном и объясняет их более миниатюрные размеры.

Мейоз у гаплоидов протекает крайне аномально, поскольку хромосомы не имеют гомологов, отсутствуют конъюгация и образование хиазм, в связи с чем нарушено распределение хромосом в мейозе. Лишь в редких случаях при скрещивании гаплоидов за счет образования нередуцированных гамет может произойти нормальное оплодотворение. Обычно же они стерильны.

Несколько сложнее обстоит дело с *полигаплоидами* или гаплоидами, полученными от аллополиплоидных видов. Полигаплоиды содержат более одного генома. Эти геномы могут быть эволюционно близкими, и тогда полигаплоиды в мейозе образуют биваленты и бывают фертильными. Пример такого рода — мейоз у полигаплоидов тимофеевки ($2n=42$), являющейся аллогексаплоидом.

Спонтанно гаплоиды у растений возникают редко. Обычно их получают несколькими способами:

1. Задержкой опыления, которая приводит к тому, что яйцеклетка начинает делиться без оплодотворения.

2. Опылением пыльцой, ядра которой убиты большими дозами излучений.

3. Опылением пыльцой другого вида.

4. Близнецовым методом. Если в одном семени два или несколько зародышей, один из них бывает гаплоидным. Причины этого явления не ясны.

5. В культуре пыльников, например у петунии или табака, довольно часто удается получать гаплоидные растения — регенеранты.

Возможность получения гаплоидных растений привлекает тем, что открывает перспективы селекции на гаплоидном уровне, позволяет непосредственно изучать проявление рецессивных мутаций и переводить перспективные формы в диплоидное состояние за счет образования нередуцированных спор или диплоидизации при воздействии колхицина и других митозных ядов.

Материал, представленный в данной главе, показывает, что хромосомный набор, составляющий основу кариотипа каждого вида, может варьировать кратно гаплоидному числу, а также претерпевать изменения за счет избытка или недостатка отдельных хромосом. Следовательно, изменчивость затрагивает и геномный уровень и служит основным источником материала, за счет которого происходит эволюция кариотипа в некоторых группах организмов, в частности у растений.

Рассматривая три основных типа изменений генетического материала: генные мутации, хромосомные перестройки, геномные изменения (полиплоидию и анеуплоидию), можно убедиться, что первый из них универсален и распространен в равной мере у всех живых существ, по-видимому, так же, как и хромо-

сомные перестройки, которые широко распространены как среди прокариот, так и эукариот.

В то же время явления анеуплоидии и полиплоидии значительно реже встречаются в естественных популяциях животных, нежели в естественных популяциях растений и вероятно некоторых эукариотических микроорганизмов, например дрожжей. Непостоянство числа хромосом как особый способ изменений генетического материала сам по себе стал эволюционным приобретением эукариотической клетки в связи с возникновением компартиментализации и дифференцировки хромосомного аппарата, появлением митоза и мейоза. Таким образом, само усложнение генетического материала открыло новые пути его изменчивости.

Вопросы к главе 14

1. Что такое двойная редукция?
2. Какие хромосомные ассоциации — униваленты, биваленты, мультиваленты — могут наблюдаться в диакинезе мейоза у гибрида, полученного от скрещивания форм с хромосомными наборами $KKDDDDDEE \times KKDDEEEE$?
3. Почему резко повышается фертильность при удвоении числа хромосом у межвидовых гибридов?
4. Напишите формулу плодового гибрида, если геном K одного вида имеет $n = 20$, а геном P другого вида — $n = 10$.
5. Как объяснить присутствие унивалентов в мейозе у гибридной формы? На какой стадии мейоза они обнаруживаются?
6. Как называется организм с набором хромосом $2n - 1$?
7. Проведено скрещивание трисомика с диплоидом. Расщепление по фенотипу в потомстве $11A : 1a$. Каковы генотипы родителей? Назовите тип расщепления.
8. Проведено скрещивание моносомика с диплоидом. В потомстве получено расщепление по фенотипу $1A : 1a$. Каковы возможные генотипы родителей и потомства?
9. Каким образом используют трисомики для локализации генов в определенных хромосомах?
10. Один из видов дурмана представляет собой диплоид, имеющий в соматических клетках по 24 хромосомы. Чему равно соматическое число хромосом у моносомика данного вида, у трисомика, тетрасомика, триплоида, автотетраплоида?
11. Какое соотношение по фенотипу следует ожидать среди потомства растений при скрещивании тетраплоида-симплекса с трисомиком-дуплексом при хромосомном расщеплении? При максимальной двойной редукции? Будет ли оно одинаковым в реципрокных скрещиваниях?
12. Каким будет расщепление по фенотипу при самоопылении трисомиков Aaa ?
13. Определите соотношение фенотипов в потомстве от самоопыления автотетраплоида $AAaaBbbb$ при полном доминировании и хромосомном типе расщепления.
14. Определите расщепление в тетрадах при скрещивании дисомика по III хромосоме у дрожжей ($LEU2/leu2$) с гаплоидом ($leu2$), если ген $LEU2$ расположен на расстоянии 10 сМ от центромеры.
15. Суммируйте данные табл. 14.1 (число плюсов) по вертикали. Прокомментируйте полученный результат.
16. У многих организмов известны асинаптические мутанты, для которых характерно отсутствие конъюгации хромосом в мейозе. Что можно сказать о продуктах мейоза у такого мутанта? Как поддерживать такую форму в кол-лекции?

4

ЧАСТЬ

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ГЕНА

Глава 15

Теория гена

В настоящее время *ген* определяют как структурную единицу генетической информации, далее неделимую в функциональном отношении. Ген представлен участком молекулы ДНК (реже РНК).

Проблема гена — центральная проблема генетики. Представления о гене всегда отражали в концентрированной форме уровень развития, достижения и нерешенные проблемы генетики. Понятие «ген» как дискретной единицы, выявляемой менделевским гибридологическим анализом, ввел В. Л. Иоганнсен (1909). Он не связывал это понятие с какими-либо гипотезами о его сущности и материальной природе.

«Слово «ген» совершенно свободно от какой бы то ни было гипотезы; оно выражает лишь тот точно установленный факт, что многие признаки организма обуславливаются в гаметах особыми, отделимыми и потому самостоятельными «состояниями», «основами», «задатками», короче — тем, что мы будем называть «генами», — писал В. Л. Иоганнсен. Такое представление о гене было характерно для периода классической, или формальной, генетики.

С тех пор произошла не только «материализация» гена, но сами гены — участки молекул ДНК — стали объектами и рабочими инструментами генной инженерии и биотехнологии.

Расшифрована первичная структура тысяч генов, выяснены основные черты и разнообразие их строения у разных объектов. Все эти сведения хранятся в компьютерных банках информации, используемых и пополняемых учеными всего мира.

15.1. Критерии аллелизма

Первая успешная попытка конкретизации представлений о гене принадлежит Т. Х. Моргану, который один из своих классических трудов назвал «Теория гена» (1926). Представления школы Т. Х. Моргана о гене можно кратко резюмировать следующим образом. Гены находятся в хромосомах и представляют собой далее неделимые единицы мутации, рекомбинации и функции. Ген — это:

- 1) единица мутации, т. е. ген изменяется как целое;
- 2) единица рекомбинации, т. е. кроссинговер никогда не наблюдали в пределах гена;
- 3) единица функции, т. е. все мутации одного гена нарушают одну и ту же генетическую функцию, что выражается в их некомплементарности у особей F_1 при попарном скрещивании мутантов.

Гены контролируют элементарные менделевские признаки. Собственно в этих положениях и были предложены основные критерии аллелизма (рекомбинационный и функциональный), при помощи которых мутационные изменения относят к одному и тому же или к разным генам. Длительное время сопоставление этих критериев аллелизма и противоречия, возникающие между ними, были основными движущими силами в развитии теории гена.

Представления о гене всецело зависели от разрешающей способности генетического анализа, которая определяется возможностью (вероятностью) обнаружения редких событий — рекомбинаций между тесно сцепленными мутациями. В свою очередь, выявление таких событий зависит от численности потомства, которое можно исследовать при скрещиваниях. Очевидно, разрешающая способность генетического анализа резко повышается при использовании селективных методов, которые успешно применяются при работе с микроорганизмами и с культурами клеток высших организмов.

Не следует забывать и о значении индуцированного мутагенеза в повышении разрешающей способности генетического анализа. Повышение частоты мутаций гарантирует возможность создания обширных генетических коллекций и тем самым увеличивает вероятность все более «плотного» маркирования хромосом. Только при этом возникает возможность и необходимость изучения рекомбинации и взаимодействия между тесно сцепленными участками генетического материала.

Рекомбинационный критерий аллелизма гласил: если мутации не рекомбинируют, то они аллельны, т. е. затрагивают один и тот же ген.

Функциональный критерий аллелизма основан на скрещивании мутантов (рис. 15.1) и выяснении, нарушают ли мутации одну и ту же функцию или разные функции. Функциональный критерий аллелизма применим только к рецессивным мутаци-

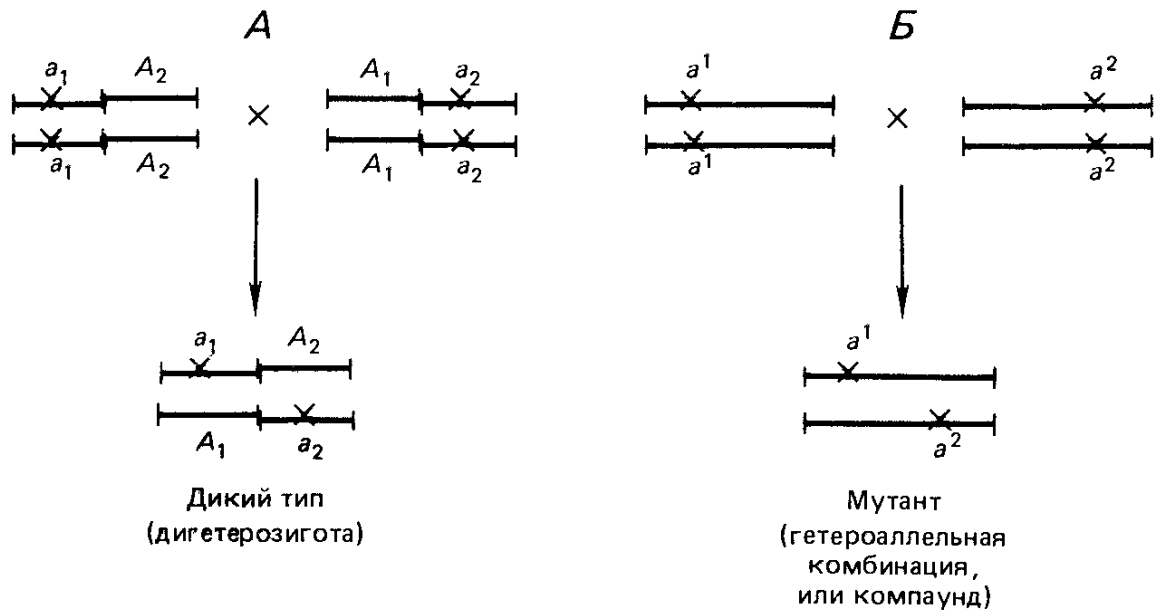


Рис. 15.1. Функциональный критерий аллелизма. А — мутации в разных генах; Б — мутации в одном гене. Крестиками помечены мутации

ям. Согласно этому критерию если две мутации объединяются путем скрещивания в F_1 и не поврежденные мутациями участки генетического материала взаимодействуют комплементарно, т. е. образуется гибрид дикого типа, то мутации относят к разным функциональным единицам — разным генам. В этом случае имеет место классическая дигетерозигота. Если же при объединении в F_1 двух мутаций возникает гибрид мутантного фенотипа, это означает, что обе мутации повреждают одну и ту же функциональную единицу — один и тот же ген. В этом случае имеет место *гетероаллельная комбинация, или компаунд*.

Рекомбинационный и функциональный критерии аллелизма совпадали в экспериментах школы Т. Х. Моргана, что вполне объясняется уровнем разрешающей способности генетического анализа того времени.

15.2. Противоречия критериев аллелизма

Импульсом к дальнейшему развитию теории гена послужили противоречия, наблюдаемые при последовательном строгом применении критериев аллелизма в экспериментах школы А. С. Серебровского с дрозофилой в конце 20-х — начале 30-х годов.

А. С. Серебровский и его молодые сотрудники доказали протяженность и сложную структуру гена в работах по исследованию так называемого *ступенчатого аллеломорфизма*. Явление это было открыто при изучении локуса $sc - ac$ (*scute - achaete*), который контролирует развитие щетинок у *D. melanogaster*. Его мутации приводят к редукции щетинок, а также к некоторым дополнительным фенотипическим эффектам. Разные мутантные аллели приводят к различающимся изменениям фенотипа.

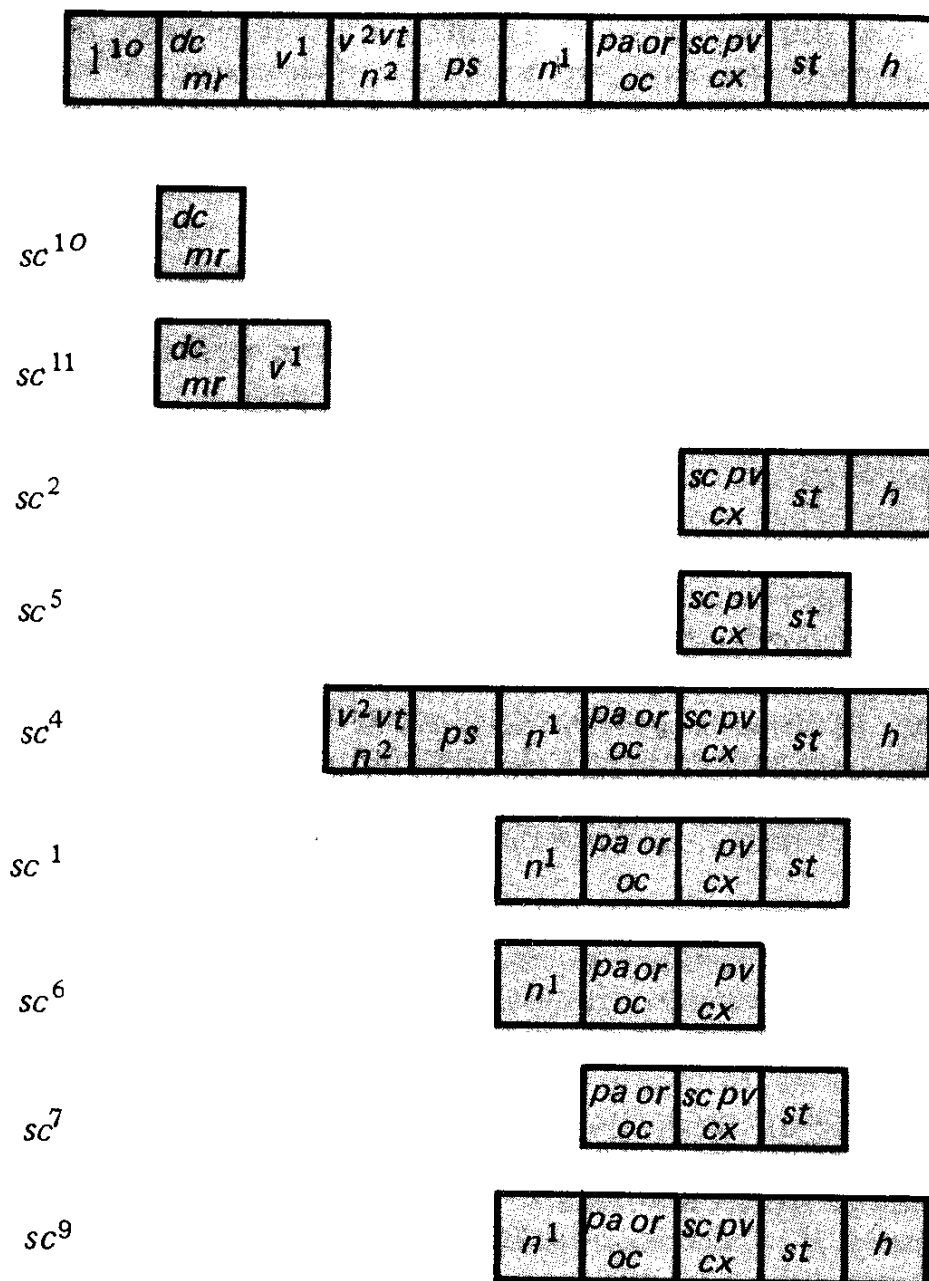


Рис. 15.2. Линейный план гена *scute* — *achaete* *D. melanogaster* (по Н. П. Дубинину, 1976).

Слева по вертикали — номера аллелей. В квадратах — условные наименования щетинок, редуцируемых вследствие мутаций. Перекрывание аллелей показывает сходство в их проявлении порознь и в компаундах (см. текст). Вверху — линейный план гена

Оказалось, что независимо возникшие мутации в локусе *sc* — *ac*, полученные под действием X-лучей, вступают в сложные отношения аллелизма. Две аллели могут иметь как сходство, так и различия в фенотипическом проявлении: в редукции определенных щетинок. При объединении независимо возникших мутантных аллелей в компаунде обычно редуцировались лишь те щетинки, которые были утрачены у обоих родителей. При графическом изображении взаимодействия нескольких пар аллеломорфов в компаундах получалось нечто вроде лестницы, ступенями которой служили отдельные аллели. Это явление и получило наименование ступенчатого аллеломорфизма. На основе исследования ступенчатого аллеломорфизма удалось построить линейный план гена *sc* — *ac* (рис. 15.2). Кроме того, Н. П. Дубининым был сделан

вывод о том, что ген *sc—ac* состоит из более мелких элементов—центров. Предполагалось, что в случае мутирования изменяется не весь ген, а лишь некоторые его центры.

Механизм ступенчатого аллелизма до сих пор не расшифрован. Тем не менее исследование в 1929—1933 гг. локуса *sc—ac* у *D. melanogaster*, показавшее, что ген не является единицей мутации, было первым прорывом в область сложной структуры гена, которая определилась лишь к середине 50-х годов.

С начала 40-х годов нашего века начали публиковаться работы по проблеме так называемого «псевдоаллелизма». В них развиваются представления о сложной структуре гена. В работах К. Оливера, М. Грина, Е. Льюиса с *D. melanogaster* были получены примеры рекомбинации мутаций, которые в соответствии с функциональным тестом должны были считаться аллельными. Это противоречие между рекомбинационным и функциональным критериями аллелизма и породило термин «псевдоаллелизм».

Число примеров «псевдоаллелизма» (рекомбинации между мутациями, аллельными на основании функционального теста) быстро возрастало, особенно с развитием генетики микроорганизмов. Стало ясно, что «псевдоаллелизм» — правило, а не исключение.

Так, «противоречия» между рекомбинационным и функциональным критериями аллелизма послужили причиной первого кризиса теории гена, выход из которого стал возможен только благодаря тому, что сам ген стал объектом тщательного исследования.

15.3. Анализ тонкой структуры гена

Огромный вклад в понимание структуры и функции гена внесли Дж. Бидл и Е. Тэйтум, в начале 40-х годов впервые исследовавшие биохимические мутации у *N. crassa*. Эти исследования показали, что мутации ауксотрофности у нейроспоры прерывают цепи метаболизма на конкретных этапах. При этом аллельные мутации всегда затрагивали один и тот же этап биосинтеза.

На основе своих результатов Дж. Бидл и Е. Тэйтум сформулировали принцип «один ген — один фермент», означавший, что каждый ген контролирует синтез какого-либо фермента. Этот принцип в готовом виде формулировал дальнейшую методологию исследования: необходимо изучать не только мутанты и соответствующие гены, но и контролируемые ими белки-ферменты. Так родилось целое направление в генетике — разработка систем «ген — фермент»; получение и изучение мутантов по одному или немногим генам, исследование мутантных белков. Все это способствовало конкретизации представлений о гене, его структуре и функции.

В конце 50-х — начале 60-х годов структуру гена изучали на основе рекомбинации аллельных мутаций у целого ряда объектов: эукариотических микроорганизмов, бактерий, бактериофагов, дрозофилы, мышей и высших растений. Венцом этого периода в раз-

витии теории гена стали исследования С. Бензера, работавшего с мутациями в локусе *rII* (*r* — от англ. rapid lysis — быстрый лизис) бактериофага Т4 *E. coli*. Мутанты типа *rII* образуют более крупные стерильные пятна (по сравнению с фагом дикого типа) на газоне *E. coli* В (рис. 15.3). Мутации *rII* изменяют структуру некоторых мембранных белков в инфицированных клетках *E. coli*. Особенность этих мутантов состоит также в том, что они вообще не могут размножаться в клетках штамма *E. coli* К12, лизогенного по фагу λ .

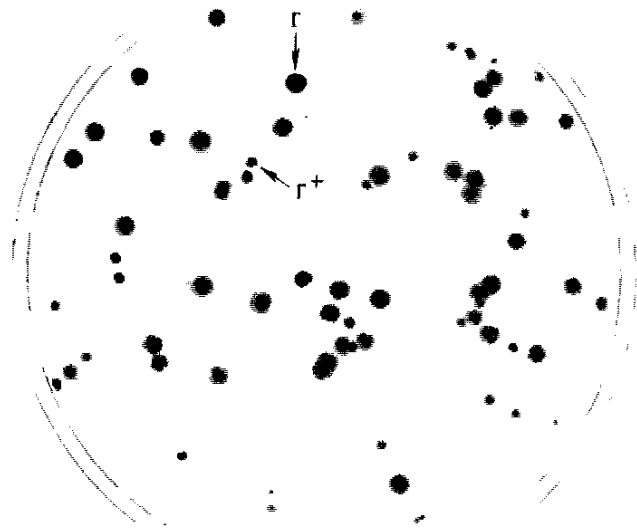


Рис. 15.3. Негативные «колонии» (стерильные пятна) бактериофага Т4 на газоне *E. coli* (из F. Ayala, J. Kiger, 1980).

Стрелками показаны негативные «колонии» r^+ и *rII*

Эти взаимоотношения мутантов *r II* со штаммами *E. coli* создают возможность: 1) выращивать только ревертанты и рекомбинанты r^+ на штамме *E. coli* К 12 (λ); 2) одновременно исследовать мутанты *rII* и фаги дикого типа — r^+ на штамме *E. coli* В (табл. 15.1).

При заражении бактериальной клетки двумя фаговыми частицами между их геномами возникают функциональные отношения, аналогичные отношениям между гомологичными хромосомами диплоида (см. гл. 9). При этом обнаруживается доминирование признаков нормального фага, выражающегося в образовании мелких стерильных пятен как на штамме В, так и на штамме К12 (λ). Таким образом, между различными мутациями *rII* возможен функциональный тест на аллелизм. На основе функционального теста на аллелизм выяснилось, что локус *rII* включает два гена: А и В.

В ходе репликации фаговых геномов после инфекции бактериального штамма двумя мутантами *rII* могут образовываться рекомбинанты дикого типа. Частота появления этих рекомбинантов пропорциональна расстоянию между мутантными точками в геноме бактериофага.

При попарном исследовании способности к рекомбинации трех различных мутантов *rII* получаемые значения частот рекомбинации могут быть ис-

Таблица 15.1. Стерильные пятна бактериофага Т4 дикого типа и мутантов *rII* на двух штаммах *E. coli*

Штамм <i>E. coli</i>	Генотип Т4	
	Дикий тип	<i>rII</i>
В	Мелкие	Крупные
К	»	Не образуются

пользованы для линейного расположения мутаций на основе принципа аддитивности (см. гл. 5).

В пределах генов *A* и *B* локуса *rII* картировано более 2000 мутаций. Легко подсчитать, что если бы С. Бензер использовал только метод попарных скрещиваний мутантов, то для точной локализации мутаций, сопряженной с их испытанием во всевозможных комбинациях, ему потребовалось бы около 2 млн. скрещиваний. Даже при работе с таким объектом, как бактериофаг, подобная перспектива выглядит удручающе.

Общее количество необходимых скрещиваний удалось резко сократить благодаря методу *перекрывающихся делеций*. Среди мутантов, исследованных С. Бензером, большинство было способно ревертировать к дикому типу, однако встречались и стабильные мутанты. Они же не могли образовывать рекомбинантов при скрещивании с несколькими мутантами, рекомбинировавшими друг с другом. С. Бензер решил, что такие «стабильные» мутанты возникли в результате выпадения целых участков локуса *rII*.

Справедливость этого вывода была подтверждена сначала данными рекомбинационного анализа: стабильные мутации (делеции), введенные в скрещивание, сокращали генетические расстояния между фланкирующими мутациями, т. е. расположенными справа и слева от делеций. В дальнейшем выпадение участка ДНК продемонстрировали на гетеродуплексах, полученных путем гибридизации ДНК из фага дикого типа и из делеционного мутанта. При этом в участке, соответствующем делеции *rII*, образовывалась однонитевая петля за счет «лишней» ДНК из дикого типа, хорошо различимая в электронный микроскоп.

Использование делеций при картировании позволяет заменить количественный учет частоты рекомбинации качественным тестом. При скрещивании точкового и делеционного мутантов рекомбинанты могут появиться, только если делеция не перекрывает участок, в котором локализована точковая мутация.

С. Бензер сначала картировал концы делеций *rII* по отношению к некоторым точковым мутациям, а затем использовал набор делеционных мутантов для предварительной грубой локализации всех вновь получаемых мутаций *rII* в том или ином из 47 сегментов участка *rII* (рис. 15.4).

В дальнейшем взаимное положение мутаций, оказавшихся в одном сегменте, определяли попарными скрещиваниями. В локусе *rII* удалось выявить 308 мутационных точек, или *сайтов*, расположенных в линейной последовательности (рис. 15.4). На карте ген *A* занимает участок примерно в 2 раза больше, чем ген *B*. Отдельные точки локуса *rII* обладают различной мутабельностью. Наиболее мутабельные из них получили наименование горячих точек. Одна горячая точка в гене *B* насчитывает 500 спонтанных мутаций. В гене *A* также имеется одна горячая точка спонтанной мутабельности, насчитывающая около 250 мутаций.

При индуцированном мутагенезе в локусе *rII* горячие точки распределяются характерно для каждого использованного мута-

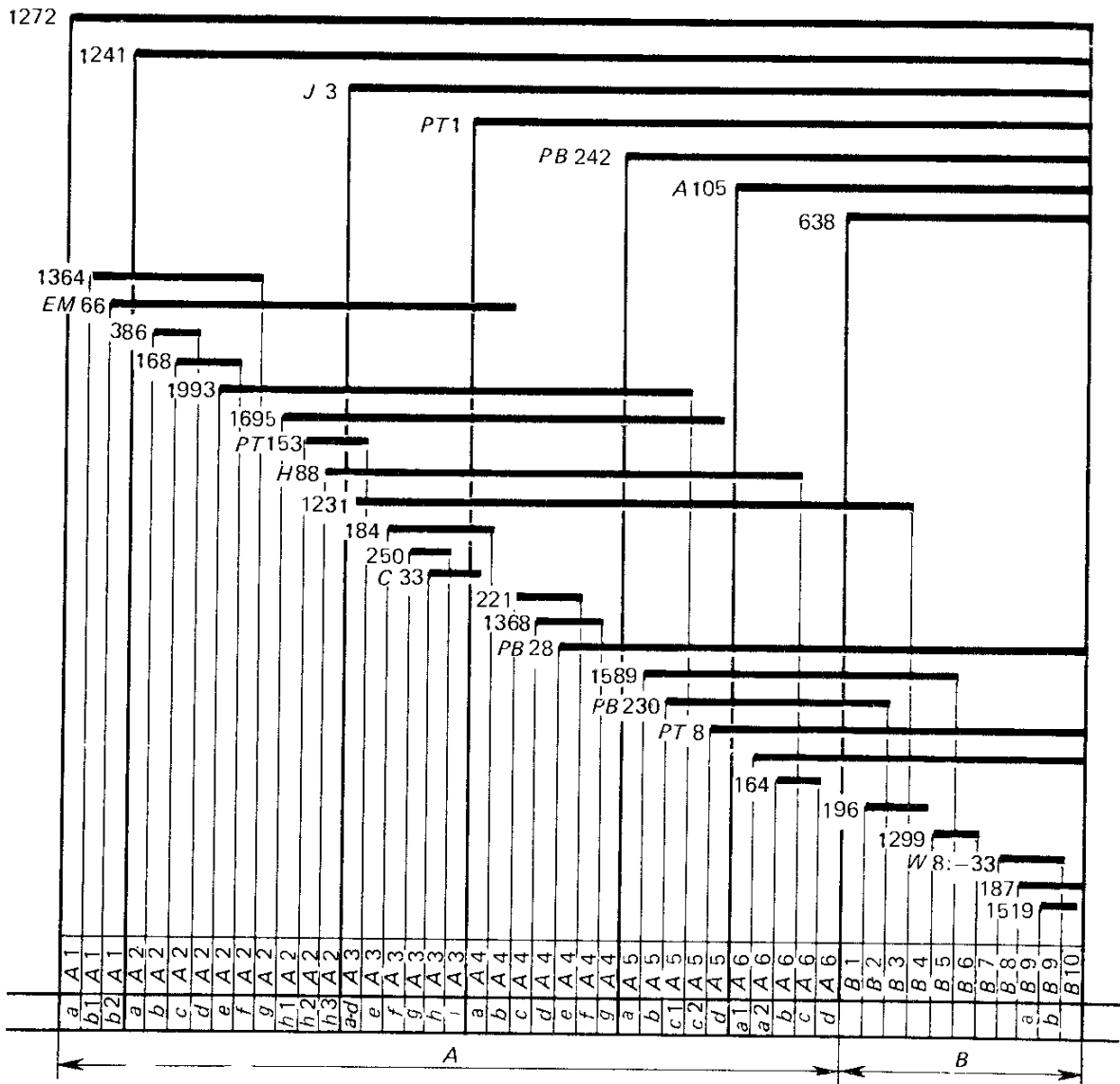


Рис. 15.4. Перекрывающиеся делеции, концы которых картируются в локусе rII (по С. Бензеру, 1960).

Проекции концов этих делеций делят локус rII на 47 участков, которые в свою очередь разбиты на 7 более крупных участков делециями, представленными в верхней части рисунка. Дальнейшие объяснения в тексте

гена, отлично от распределения, характерного для спонтанного мутирования.

В экспериментах С. Бензера была сопоставлена размерность генетической карты бактериофага (частоты рекомбинации) с размерностью молекулярных структур, ответственных за хранение и передачу наследственной информации, т. е. с числом нуклеотидных пар молекулы ДНК. При этом за основу были приняты следующие данные. Как показали А. Херши и М. Чейз (см. гл. 6), при фаговой инфекции в бактериальную клетку проникает почти чистая ДНК. Общее число пар нуклеотидов в ДНК фага Т4 составляет $1,8 \cdot 10^5$. Общая длина рекомбинационной карты Т4 равна 1500 %. Минимальная частота рекомбинации в опытах С. Бензера составляла 0,02 % (при пределе разрешающей способности рекомбинационного анализа 0,0001 %). Это соответствует приблизительно $1,3 \cdot 10^{-5}$ от всего генома Т4 ($0,02:1500 = 1,3 \times$

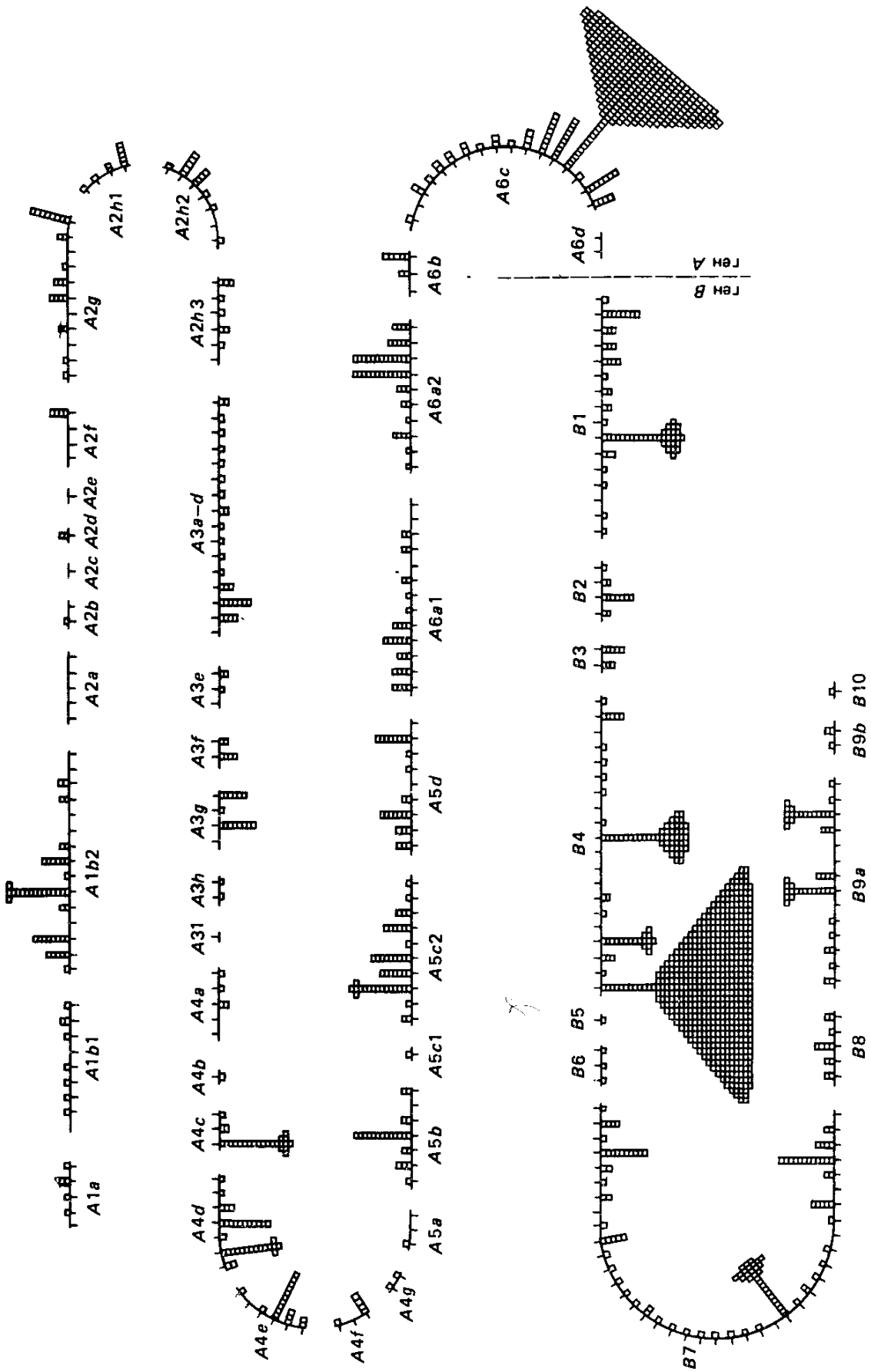


Рис. 15.5., Карта локуса λ II фага Т4, построенная С. Бензером. Каждый квадрат соответствует одной спонтанной мутации

$\times 10^{-5}$). Таким образом, можно показать, что с минимальной частотой рекомбинация происходила на расстоянии около двух нуклеотидных пар ($1,8 \cdot 10^5 \text{ п.н.} \cdot 1,3 \cdot 10^{-5} = 2,34$).

В данном случае важна не столько конкретная цифра, полученная С. Бензером, сколько порядок величины — несколько нуклеотидов. В дальнейшем было показано, что рекомбинация может разделять соседние нуклеотидные пары. Проведя аналогичные расчеты, С. Бензер показал, что и минимальный участок, изменяющийся в результате мутации, измеряется немногими нуклеотидами.

Сейчас очевидно, что рекомбинация может разделять соседние пары нуклеотидов, что наименьший участок ДНК, который изменяется при мутировании, — это пара нуклеотидов. По-видимому, по этой причине термины, введенные С. Бензером для обозначения единицы мутации (*мутон*) и единицы рекомбинации (*рекон*), не получили широкого распространения.

С. Бензер попытался ревизовать и понятие «ген». Для отнесения двух мутаций к одной или разным единицам функции он предложил использовать так называемый *цис-транс-тест*, изобретенный Е. Льюисом. Согласно этому тесту мутации попарно испытывают в гетерозиготе в двух конфигурациях: *цис* — когда обе мутации в гибриде происходят от одного родителя, и *транс* — когда они поступают в гибрид от разных родителей (рис. 15.6). Согласно С. Бензеру, если *цис*- и *транс*-гетерозигота имеют одинаковый (дикий) фенотип, то мутации затрагивают разные единицы функций, а если *цис*- и *транс*-гетерозиготы разного фенотипа (*цис* — дикий, а *транс* — мутантный), то мутации затрагивают одну единицу функции, которую он предложил называть *цистрономом*.

Сравнение рис. 15.1 и 15.6 убеждает в том, что для рецессивных мутаций *цис-транс-тест* сводится к функциональному тесту

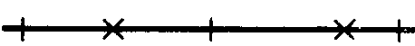



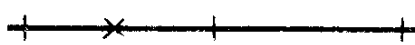
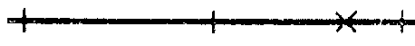


Конфигурация мутаций в гетерозиготе	Разные функциональные единицы	Одна функциональная единица
Цис	  Дилкий тип	  Дилкий тип
Транс	  Дилкий тип	  Мутант

Рис. 15.6. Схема *цис-транс-теста*. Крестики — мутации

на аллелизм Т. Х. Моргана и таким образом понятия цистрон и ген как единица функции совпадают.

Несомненным достижением в работе С. Бензера была разработка *метода перекрывающихся делеций* для внутригенного картирования, благодаря которому стало возможным «насыщать» генетическую карту мутациями. Он впервые перевел величины, измеряемые в генетическом анализе, в молекулярную размерность: сопоставил их с мономерами молекулы ДНК. Итогом этой работы было разрешение кажущихся противоречий между критериями аллелизма. Стала очевидной их относительность, особенно в отношении рекомбинационного критерия аллелизма. Функциональный же критерий аллелизма сохраняет свою ценность с учетом возможности межаллельной комплементации (см. гл. 2), т. е. он также относителен и в строгом смысле должен применяться на достаточно большом статистическом материале. В дальнейшем будет показано, что относительность функционального критерия аллелизма выражается не только в случае комплементарности аллельных мутаций, но и в случае некомплементарности мутаций разных генов в оперонах (см. гл. 16). Таким образом, от моргановских представлений об однозначном соответствии результатов разных тестов (рекомбинационного и функционального) на аллелизм мы приходим к пониманию их относительности и необходимости комплексного применения.

15.4. Матричные процессы и действие гена

Воспроизведение и действие генов непосредственно связаны с матричными процессами, синтезом макромолекул — ДНК, РНК, белков. Уже рассматривалась репликация (в гл. 6) как процесс, ответственный за воспроизведение генетической информации. Обращаясь к действию гена, рассмотрим *транскрипцию* или синтез РНК, и *трансляцию*, или синтез белка.

Именно в этих процессах и реализуется генетическая информация. Поэтому современная теория гена — детище молекулярной генетики — всецело опирается на успехи биохимии, достигнутые в изучении матричных процессов. С другой стороны, метод генетического анализа вносит существенный вклад в изучение матричных процессов, которые, так же, как и ступенчатые процессы, сами находятся под генетическим контролем (рис. 15.7).

Согласно схеме рис. 15.7 гены группы I контролируют через этапы транскрипции и трансляции структуру белков, участвующих в метаболических процессах. Гены группы II — это гены, ответственные за все матричные процессы. Они подразделены на две подгруппы IIa и IIб. Гены подгруппы IIa отвечают за синтез рибосомных и транспортных РНК, которые «обслуживают» процесс трансляции. Гены подгруппы IIб, так же, как и гены группы I, контролируют структуру белков, но эти белки-ферменты и структурные белки «обслуживают» матричные процессы, т. е. процессы

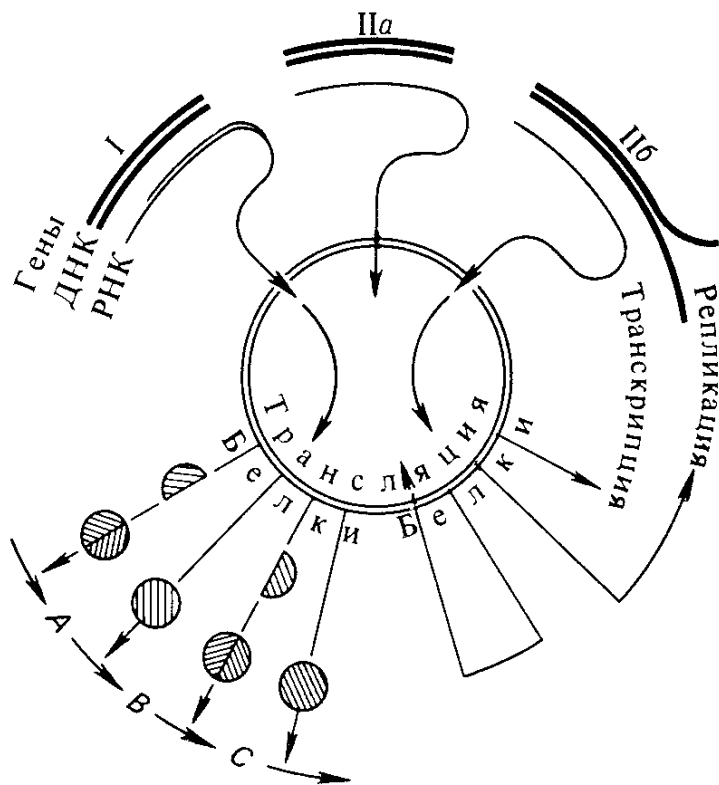


Рис. 15.7. Схема реализации генетической информации в клетке.

А, В, С — промежуточные продукты в метаболической цепи

воспроизведения (репликация) и реализации генетической информации (транскрипция и трансляция).

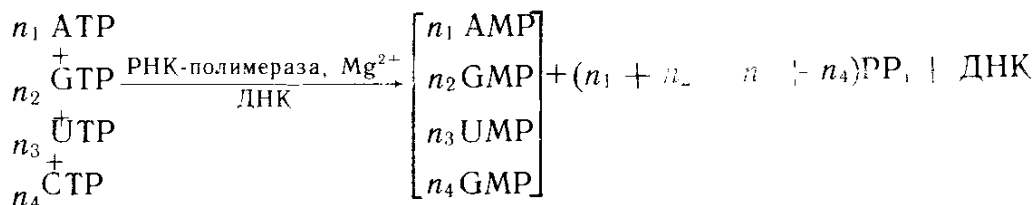
Схема рис. 15.7 иллюстрирует различную роль генов I и II группы. Гены II группы — фактор интеграции генотипа, контролирующий воспроизведение и экспрессию всех генов клетки. С этой их ролью связаны и особенности проявления их мутационных изменений. Мутационное блокирование того или иного этапа в цепи биосинтеза легко компенсируется

добавкой извне недостающего метаболита. Мутационные дефекты генов II группы компенсировать какими-либо метаболитами невозможно. Кроме того, эти мутации должны иметь несравненно более широкий плеiotропный эффект, нежели мутации генов I группы, поскольку они будут сказываться на воспроизведении или действии всех генов клетки. С такой особенностью связаны и специфические подходы к изучению генов II группы. Прежде всего — это получение мутаций с условным проявлением (см. гл. 3): при изменении температуры, pH, осмотического давления и т. д. Кроме того, сама плеiotропия генов группы II позволяет исследовать их как модификаторы генов группы I.

15.5. Транскрипция ДНК

Транскрипцией называется перенос информации с двуцепочечной молекулы ДНК на одноцепочечные молекулы РНК. При этом матрицей для синтеза РНК служит только одна цепь ДНК, называемая смысловой цепью.

В транскрипции, так же, как и в других матричных процессах, различают три стадии: *инициацию, элонгацию и термминацию*. Фермент (или ферменты), осуществляющий этот процесс, называют *ДНК-зависимой РНК-полимеразой* или просто *РНК-полимеразой*, которая проводит следующую реакцию:



При этом полимеризация полирибонуклеотида (РНК) происходит в направлении от 5' к 3'-концу растущей цепи.

Лучше всего изучена РНК-полимераза *E. coli*. Большой вклад в расшифровку субъединичной структуры этого фермента внесла группа советских исследователей под руководством Р. Б. Хесина. РНК-полимераза *E. coli* состоит из четырех субъединиц: двух одинаковых — α , которые объединены в молекуле так называемого минимального фермента еще с двумя различными субъединицами: β и β^1 . Такой *минимальный фермент* ($2\alpha\beta\beta^1$) с молекулярной массой 480 000 Д осуществляет транскрипцию, но не способен «узнавать» на ДНК специфические стартовые позиции начала этого процесса. Для «узнавания» стартовых участков, или промоторов, к минимальному ферменту должна присоединяться еще одна субъединица — σ (*сигма*)-фактор.

Нуклеотидные последовательности промоторов обычно богаты парами АТ. Их называют также *ТАТА-последовательностями* или *последовательностями Прибнова*. Примеры некоторых из них представлены на рис. 15.8. После инициации транскрипции σ -фактор покидает минимальный фермент и дальнейшая элонгация, т. е. наращивание РНК, производится тетрамером РНК-полимеразы (рис. 15.9). Скорость роста цепи РНК у *E. coli* при 37°C составляет около 40—45 нуклеотидов в секунду. (Сравните ее со скоростью репликации — гл. 6.)

Завершается процесс транскрипции после присоединения другого белкового фактора — ρ (*ро*)-фактора, или фактора терминации (рис. 15.9). Терминация транскрипции происходит в специальных участках ДНК — *терминаторах*, содержащих *инвертированные повторы*.

fd	TGCTTCTGAC	TATAATA	GACAGGCTAAAGACCTGATTTTGA
T7 A3	AAGTAAACACGG	TACGATG	TACCACATGAAACGACAGTGAGTCA
T7 A2	AGTAAACATGCAG	TAAGATA	CAAATCCTAGGTAACACTAGCAG
<i>lac UV5</i>	GCTTCCGGCTCG	TATAATG	TGTGGAAATTGTGAGCGGATAACAA
λP_R	ACCTCTGGCGGT	GATAATG	GTTGCATGTACTAAGGAGGTTG
SV 40	TTTATTGCAGCT	TATAATG	GTTACAATAAAGCAATAGCATC
λP_L	ACCACTGGCGGT	GATACTG	AGCACATCAGCAGGACGCACTGAC
<i>E. coli</i> тРНК ^{Тир}	CGTCATTTGA	TATGATG	CGCCCCCTTCCCGATAAGGGAGCAG
<i>lac</i> дикий тип	GCTTCCGGCTCG	TATGTTG	TGTGGAAATTGTGAGCGGATAACAA

Рис. 15.8. Нуклеотидная последовательность нескольких молекул ДНК (F. Ayala, J. Kiger, 1980).

Рамкой обозначены промоторы, к которым присоединяется РНК-полимераза, и начало транскрипции; подчеркнут первый считываемый нуклеотид

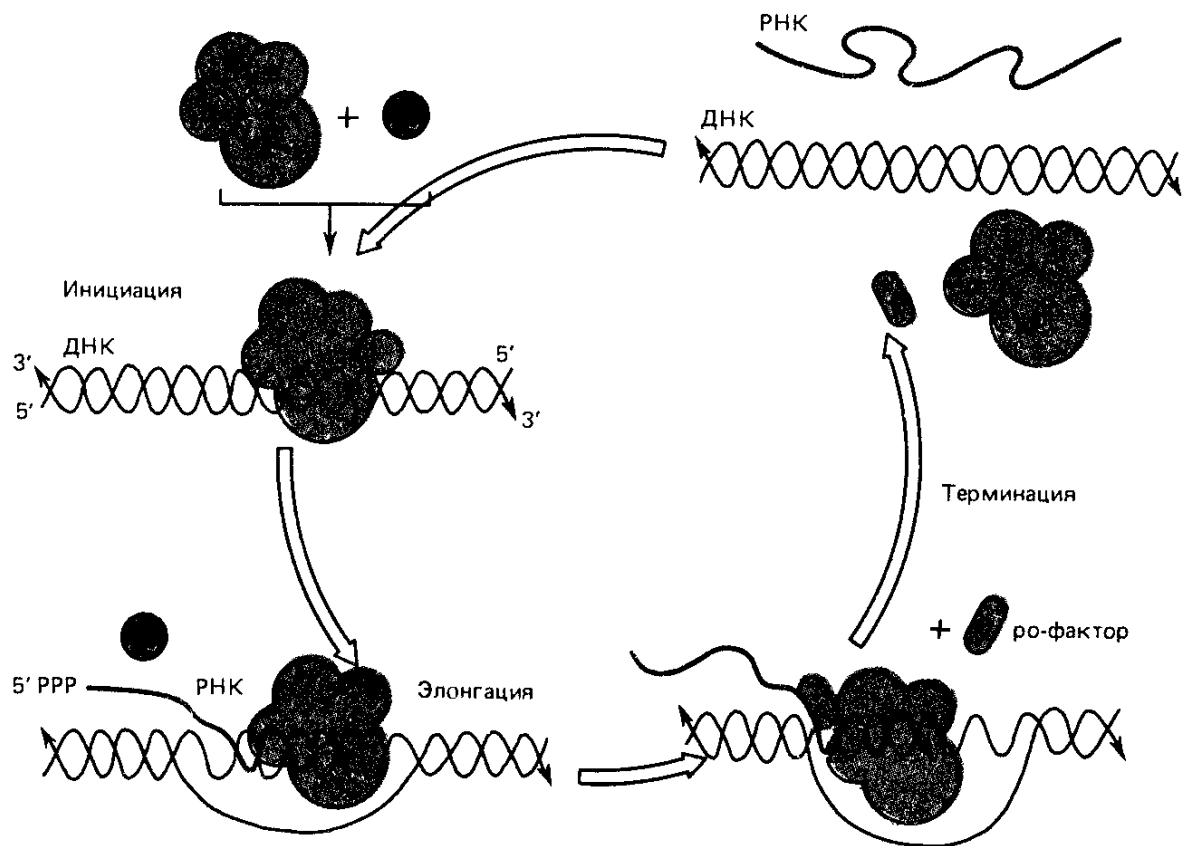


Рис. 15.9. Схема процесса транскрипции.
 $\alpha, \beta, \beta', \sigma, \rho$ — субъединицы РНК-полимеразы

У *E. coli* одна РНК-полимераза синтезирует все три типа молекул клеточной РНК: иРНК, рРНК, тРНК.

Дискретный характер молекул РНК — продуктов транскрипции — хорошо виден на электронных микрофотографиях хромосом типа ламповых щеток (см. гл. 4). На рис 15.10 показан фрагмент транскрибируемой петли такой хромосомы. Видно, что транскрипты образуют градиент с постепенным удлинением и компактизацией РНК в пределах единицы транскрипции.

У эукариот известны три типа РНК-полимераз: I — ответственная за синтез рРНК, II — ответственная за синтез иРНК, III — ответственная за синтез тРНК и низкомолекулярной рРНК — 5S РНК.

Поскольку РНК — продукт транскрипции — синтезируется на матрице ДНК, следует ожидать высокой степени корреляции нуклеотидного состава этих двух типов полимеров. Однако исследования, предпринятые в конце 50-х годов А. Н. Белозерским и А. С. Спириным, показали лишь небольшую корреляцию нуклеотидного состава РНК и ДНК из различных источников. Это указывало на то, что только небольшая фракция клеточной РНК в каждый данный момент отражает состав ее ДНК. Э. Волкин и Ф. Астрахан, изучая синтез РНК в бактериях *E. coli*, зараженных фагом Т2, выявили в клетках новую фракцию РНК, состав которой подобен составу ДНК фага. Эта РНК была очень нестабильной. Так была открыта иРНК, переносящая информацию от ДНК к рибосомам, на которых синтезируется белок. Поскольку

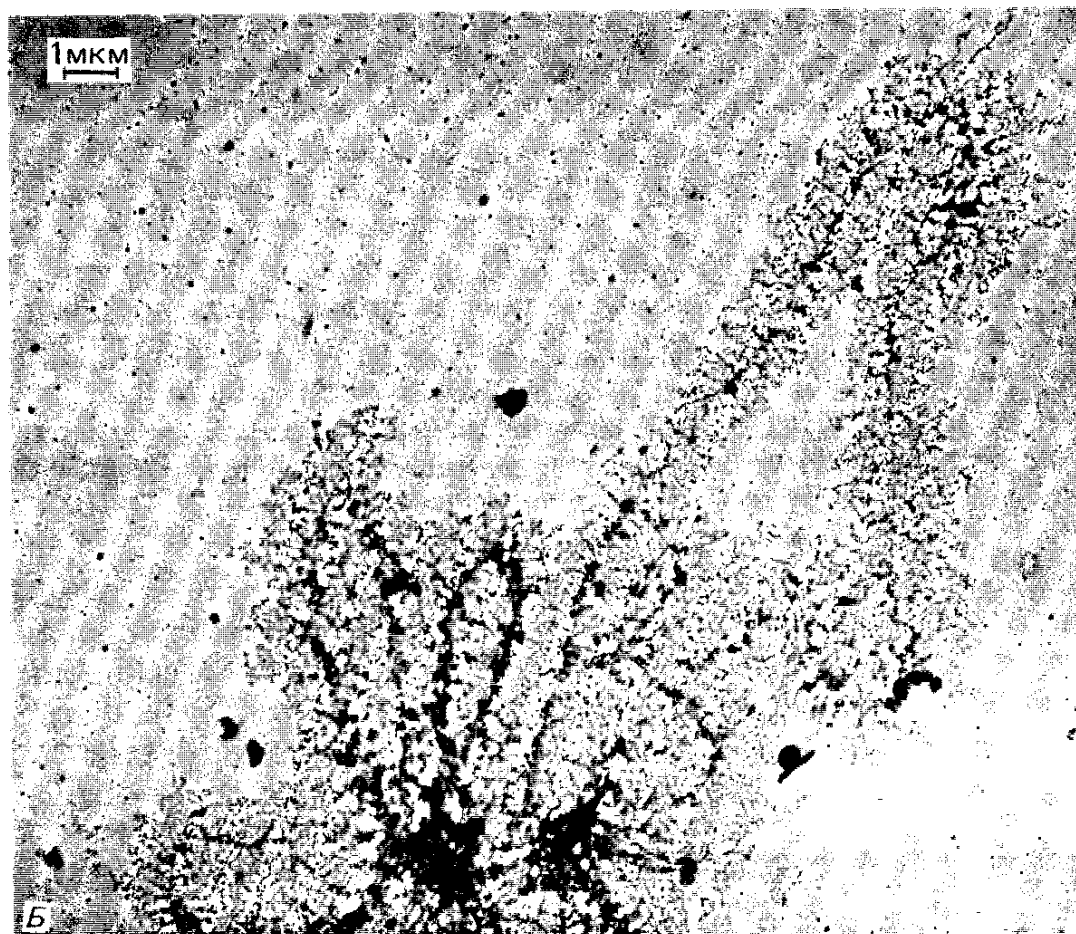
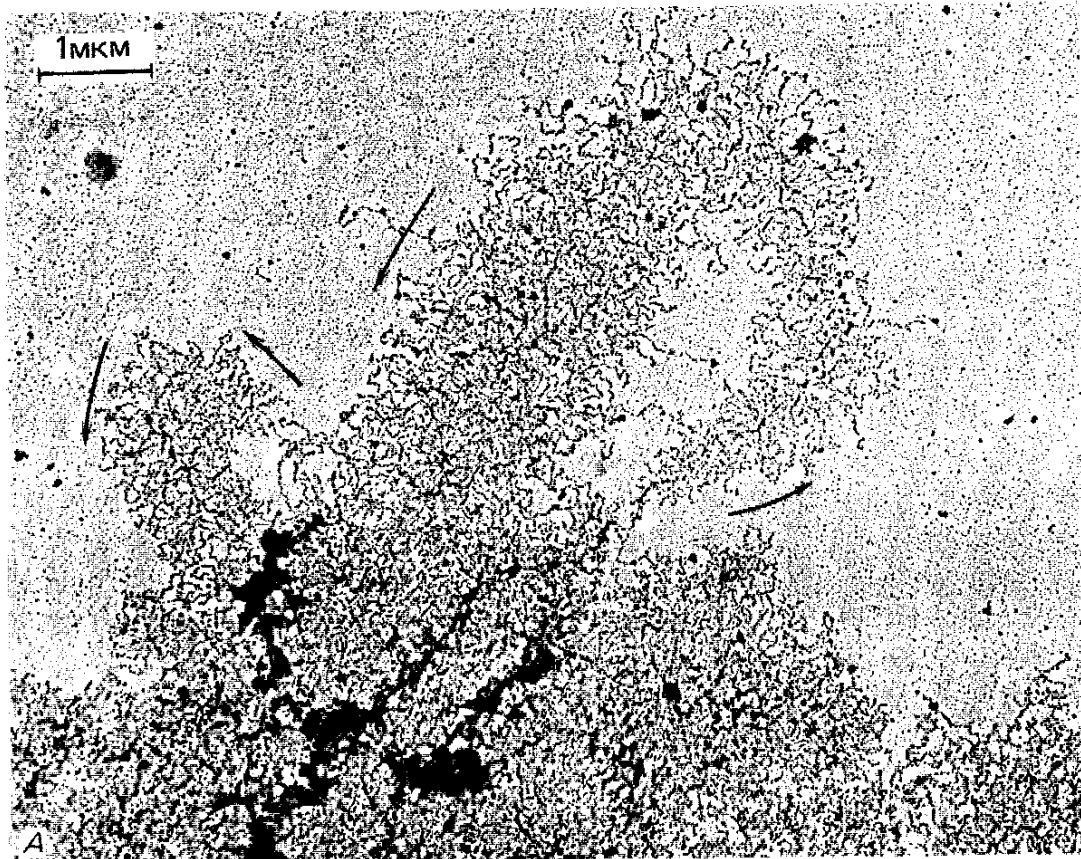


Рис. 15.10. Активно транскрибируемый на хромосомах ламповых щеток из ооцитов курицы (фото Е. Р. Гагинской и А. Г. Цветкова, 1986). А — хорошо выражена асимметрия боковых петель, транскрипционные единицы имеют характерный вид «елочек», длина боковых фибрилл рибонуклеопротеида увеличивается в направлении транскрипции. Отчетливо виден градиент размеров транскрипта, увеличивающегося по мере продвижения (стрелки) РНК-полимеразы. Б — петли со слабо выраженной поляризацией

подавляющую часть клеточной РНК представляют стабильные рРНК и тРНК, общая корреляция состава ДНК и РНК оказывается незначительной. В дальнейшем у эукариот были открыты особые типы стабильной иРНК, например иРНК глобинов, присутствующая в безъядерных эритроцитах млекопитающих.

15.6. Трансляция иРНК

Трансляцией называется синтез белка на рибосомах, направляемый матрицей иРНК. При этом информация переводится с четырехбуквенного алфавита нуклеиновых кислот на двадцатибуквенный алфавит аминокислотных последовательностей полипептидных цепей.

В этом процессе различают три стадии.

1. Стадия *активации аминокислот* — образование *аминоациладенилатов* в результате взаимодействия аминокислот с АТФ под контролем фермента, специфического для каждой аминокислоты. Эти ферменты — *аминоацил-тРНК-синтетазы* — участвуют и в следующей стадии.

2. Стадия *аминоацилирования тРНК* — присоединение аминокислотных остатков к тРНК вследствие взаимодействия тРНК и комплекса *аминоацил-тРНК-синтетаза* с *аминоациладенилатами*. Каждый аминокислотный остаток присоединяется к своему специфическому классу тРНК.

3. *Собственно трансляция*, или полимеризация, аминокислотных остатков с образованием пептидных связей и таким образом полимеризация полипептидных цепей. Эта стадия осуществляется на рибосомах под контролем матрицы иРНК в соответствии с правилами генетического кода (см. следующий раздел).

Таким образом, *основными участками процесса трансляции являются иРНК, рибосомы, тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы.*

Роль транспортным РНК в синтезе белка была отведена еще до их открытия. В 1955 г. Ф. Крик в неопубликованной статье постулировал существование олигонуклеотида — *адаптора*, который может нести аминокислоту и образовывать водородные связи с кодирующей полинуклеотидной матрицей. Изобретение адаптора было необходимо в связи с невозможностью обнаружить между аминокислотами и нуклеиновыми кислотами стереохимическое соответствие, достаточное для того, чтобы обеспечить считывание генетического кода. В 1957 г. в лаборатории М. Хогланда было показано, что в ходе белкового синтеза активированные аминокислоты переносятся на особый тип РНК, получивший тогда наименование растворимой РНК и называемой теперь *транспортной*.

Адапторная гипотеза была доказана в начале 60-х годов в экспериментах Ф. Шапвиля, Г. фон Эренштейна и др. В одном из экспериментов цистеиновую тРНК нагружали цистеином. Затем цистеиновый остаток при помощи никеля Ренея превращали в аланиновый. Таким образом получали комплекс Ала-тРНК^{Цис},

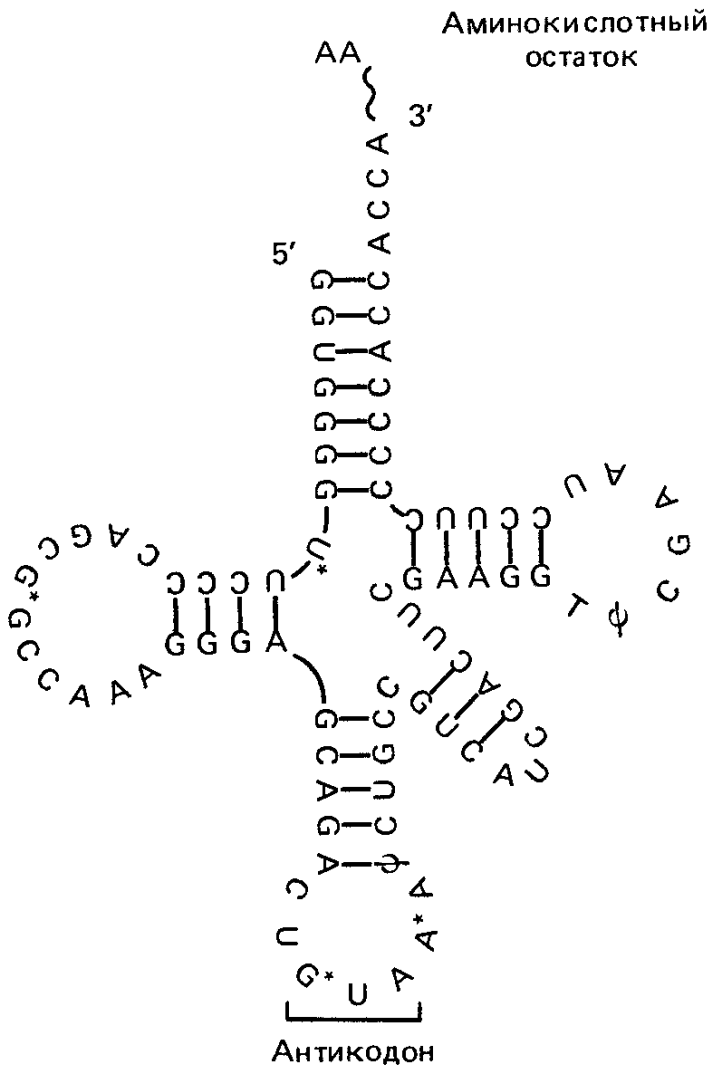


Рис. 15.11. Вторичная структура тРНК^{Тир}, представленная в конфигурации клеверного листа.

Звездочкой помечены модифицированные основания. ψ — псевдоуридин, модифицированное основание, производное урацила

структуру тРНК принято изображать в форме «клеверного листа» в соответствии с возможностью образования водородных связей между основаниями (рис. 15.11). Пространственная конфигурация молекулы тРНК, выясненная на основе рентгеноструктурного анализа, показана на рис. 15.12.

Главным участником процесса трансляции, его организующим центром является *рибосома*. Этот сложный молекулярный агрегат, состоящий из белков и рибонуклеиновых кислот, в ходе всей трансляции выполняет множество функций. Наиболее подробно исследованы структура и функция рибосом у бактерий, особенно у *E. coli*.

В состав каждой рибосомы с коэффициентом седиментации 70S, состоящей из двух субчастиц 50S и 30S, входят две молекулы рРНК, ассоциированные с белками. Субчастица 50S включает молекулу рРНК с коэффициентом седиментации 23S ($1,1 \cdot 10^6$ Д) и 34 различных белка. Субчастица 30S содержит молекулу рРНК

который далее использовали в бесклеточной системе из ретикулоцитов кролика для синтеза гемоглобина. В результате в синтезируемых молекулах аланин замещал цистеин. Следовательно, судьба аминокислотного остатка в составе аминоксил-тРНК всецело определяется специфичностью тРНК, выполняющей функции адаптора.

В соответствии с адапторной гипотезой каждая тРНК должна обладать участком — *антикодоном*, комплементарным *кодону* иРНК, который определяет включение в растущую полипептидную цепь одного аминокислотного остатка.

Все тРНК как про-, так и эукариот имеют сходную структуру. Они содержат около 80 оснований, различаются по составу оснований, часть которых модифицирована. Модификация оснований происходит уже после синтеза тРНК в ее определенных положениях. Схематически

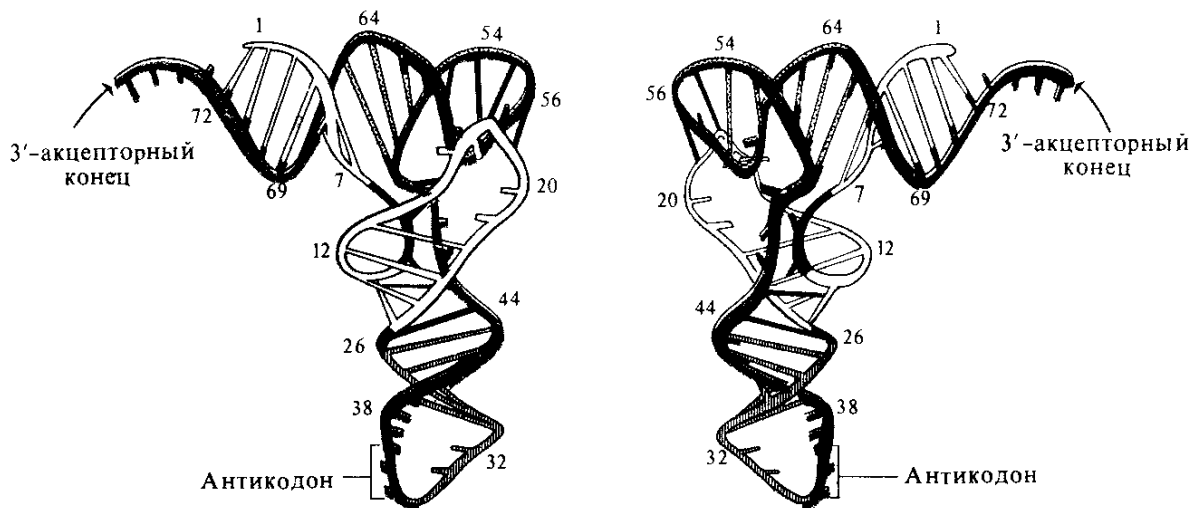


Рис. 15.12. Схема пространственной структуры фенилаланиновой тРНК дрожжей (вид слева и справа) (G. S. Quigley et. al., 1975).

Цифры — номера нуклеотидов, составляющих первичную структуру, поперечные линии в спиральных участках — замкнутые водородные связи между основаниями

с коэффициентом седиментации 16S ($0,55 \cdot 10^6$ Д) и 21 белок. Набор белков в субчастицах 30S и 50S не перекрывается. С субчастицей 50S у *E. coli* связана низкомолекулярная 5S РНК ($4 \cdot 10^4$ Д), а у эукариот еще и 5,8S РНК.

Изучение рибосом физико-химическими методами осложняется тем, что на разных стадиях трансляции, кроме постоянных структурных компонентов, присутствующих в каждой из двух ее субъединиц, рибосома содержит ряд белковых факторов трансляции, которые необходимы для инициации, элонгации и терминации полипептидов.

Таблица 15.2. Структура рибосом различных объектов (С. Г. Ииге-Вечтомов, М. Д. Тер-Аванесян, 1986)

Объект	Большая субчастица			Малая субчастица		
	коэффициент седиментации	белки (число)	РНК (коэффициент седиментации)	коэффициент седиментации	белки (число)	РНК (коэффициент седиментации)
Прокариоты (<i>E. coli</i>)	50S	34	23S 5S	30S	21	16S
Эукариоты (цитоплазма)	60S	45—50	28S 5,8S 5S	40S	30	18S
Хлоропласты	50S	30—35	23S 5S	30S	20—25	16S
Митохондрии**	40S—60S	32—52	4S — 7S* 12S—21S 5S***	30S—55S	24—30	12S—15S

Примечание. * — большая субъединица рибосом хлоропластов, помимо 23S и 5S рРНК, содержит дополнительную рРНК, размер которой варьирует у разных видов; ** — структура рибосом митохондрий у разных организмов характеризуется сильной изменчивостью; *** — 5S рРНК входит в состав большой субъединицы митохондриальных рибосом только у высших растений.

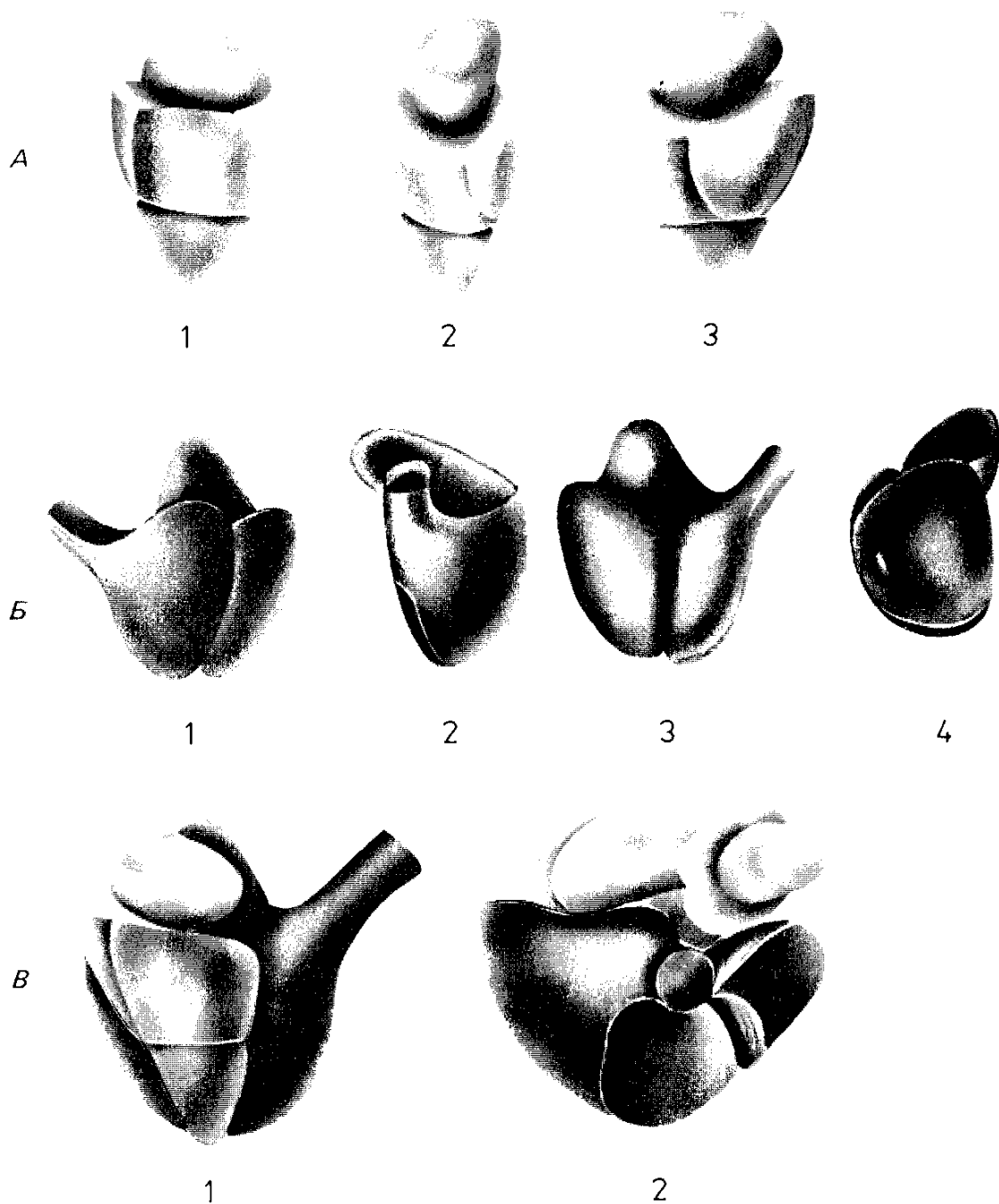


Рис. 15.13. Модель рибосомы *E. coli*, построенная на основании данных электронной микроскопии (по А. С. Спирину, 1984). А, 1—3 — три различные проекции 30S субчастицы; Б, 1—4 — четыре проекции 50S субчастицы; В, 1—2 — две проекции 70S рибосомы, состоящей из 30S и 50S субчастиц

Структура рибосом разных организмов представляет собой пример вариаций на заданную тему (табл. 15.2). Судя по данным электронной микроскопии, форма рибосом и рибосомных субчастиц из разных источников очень сходна. Модель рибосомы, построенная в Институте белка АН СССР на основе исследований под руководством А. С. Спирина, представлена на рис. 15.13.

Трансляция на рибосомах, как и все матричные процессы, состоит из трех этапов: инициации, элонгации и терминации. Все эти этапы осуществляются в соответствии с сигналами, закодированными в иРНК в виде последовательностей нуклеотидов — кодонов, составляющих словарь генетического кода.

15.7. Генетический код

Колинеарность гена и кодируемой им полипептидной цепи

Представление о том, что в гене закодирована информация о первичной структуре белка, было конкретизировано Ф. Криком в его *гипотезе последовательности*, согласно которой последовательность элементов гена определяет последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Это положение было экспериментально доказано уже после расшифровки генетического кода, тем не менее логично рассмотреть полученное доказательство именно сейчас.

Справедливость гипотезы последовательности доказывает *колинеарность* структур гена и кодируемого им полипептида. Это было показано в 1964 г. с использованием гена *trp A E. coli* и кодируемой им α -субъединицы фермента *триптофансинтетазы*, а в дальнейшем ряда других моделей.

Ч. Яновский с сотрудниками определили последовательность 75 аминокислотных остатков из 267 составляющих α -субъединицу триптофансинтетазы *E. coli*. На этом участке вследствие мутаций в гене *trp A* были зарегистрированы замены семи аминокислотных остатков. Семь аминокислотных остатков заменялись на девять новых вследствие мутирования в девяти точках (рис. 15.14).

Все девять мутаций были картированы на основе количественного критерия в попарных скрещиваниях с использованием трансдукции при помощи фага P1, а также путем качественного теста с применением метода перекрывающихся делеций. Расположение мутаций на карте гена и соответствующих им аминокислотных замен в полипептиде оказалось одинаковым, т. е. колинеарным (рис. 15.14).

Генетический анализ кода

Теоретические работы, в которых рассматривались возможные варианты структуры *генетического кода*, начались вскоре после опубликования в 1953 г. статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика, посвященной описанию структуры ДНК.

Наиболее существенным достижением этого периода было ⁸⁷соображение о том, что код скорее всего триплетен. Четыре пары оснований ДНК: А — Т, Т — А, G — C, C — G — могут закодировать лишь четыре аминокислоты, если каждая пара соответствует одной аминокислоте. Как известно, в белки входят 20 основных аминокислот. Если предположить, что каждой аминокислоте соответствуют две пары оснований, то можно закодировать 16 аминокислот (4×4). Этого опять недостаточно. Если же код триплетен, то из четырех пар оснований можно составить 64 кодона ($4 \times 4 \times 4$), чего с избытком хватает для кодирования двадцати аминокислот.

Экспериментальные доказательства того, что код триплетен

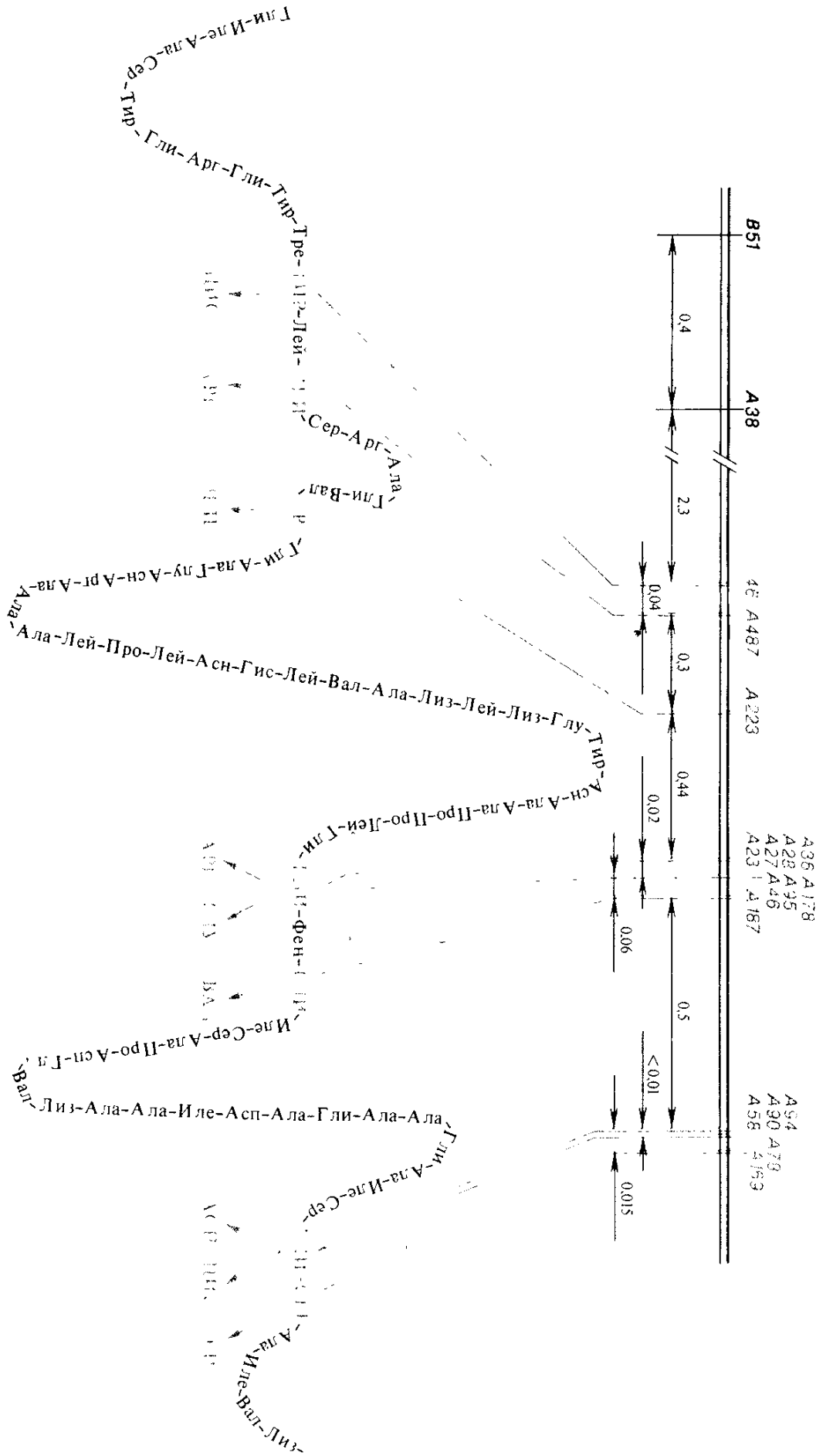


Рис. 15.14. Коллинеарность расположения мутаций в гене *trp E. coli* и аминокислотных замен в α -субъединице триптофансин-гетазы (по Ch. Yanofsky et al., 1967).
 В верхней части рисунка — генетическая карта, в нижней — участок полипептидной цепи, в котором показаны мутационные замены аминокислотных остатков

или по крайней мере кодовое число кратно трем, были опубликованы в 1961 г. в статье Ф. Крика, Л. Барнетта, С. Бреннера и Р. Уоттс-Тобина «Общая природа генетического кода для белков». В своих экспериментах эти авторы использовали разработанную С. Бензером систему *rII* фага Т4. Вся работа была построена на использовании в качестве мутагена одного из производных акридина — профлавина (рис. 15.15, А). В то время уже существовали данные о том, что акридиновые красители, взаимодействуя с ДНК, по-видимому, приводят к вставке или выпадению пар оснований. Основной довод в пользу такого механизма акридинового мутагенеза авторы видели в том, что мутации бактериофага, индуцированные этим агентом, обычно не ревертируют под действием аналогов оснований (см. гл. 12), и почти всегда проявляются четко, приводя к полной утрате функции гена, в то время как среди мутаций, индуцированных аналогами оснований, примерно половина имеет нечеткое проявление. В дальнейшем упомянутый мутагенный эффект акридинов был доказан более строго.

Выяснилось, что акридин внедряется между основаниями ДНК (рис. 15.15, Б), увеличивая расстояние между соседними основаниями в 2 раза: с 0,34 до 0,7 нм. Согласно одной из гипотез далее такая искусственно удлиненная молекула ДНК вступает в неравный кроссинговер с интактной молекулой, в результате чего образуются молекулы с лишней парой оснований или с делецией пары оснований.

Приступая к своим экспериментам, Ф. Крик с сотрудниками исходили из предположения, что код триплетен (или кодовое число кратно трем), что между кодонами нет «запятых», т. е. разделяющих знаков, что считывание кода в пределах гена происходит с фиксированной точки в одном направлении.

В качестве исходного материала в экспериментах Ф. Крика с сотрудниками был использован мутант *FCO*, индуцированный профлавином и несущий изменение в левой части гена *rIIB* фага Т4. В результате спонтанного ревертирования мутанта *FCO* были получены ревертанты, способные образовывать негативные колонии на штамме *E. coli* К12. Большинство этих ревертантов имели промежуточный фенотип между диким (r^+) и мутантным (r^-). Генетический анализ показал, что ревертанты возникли за счет *внутригенных*

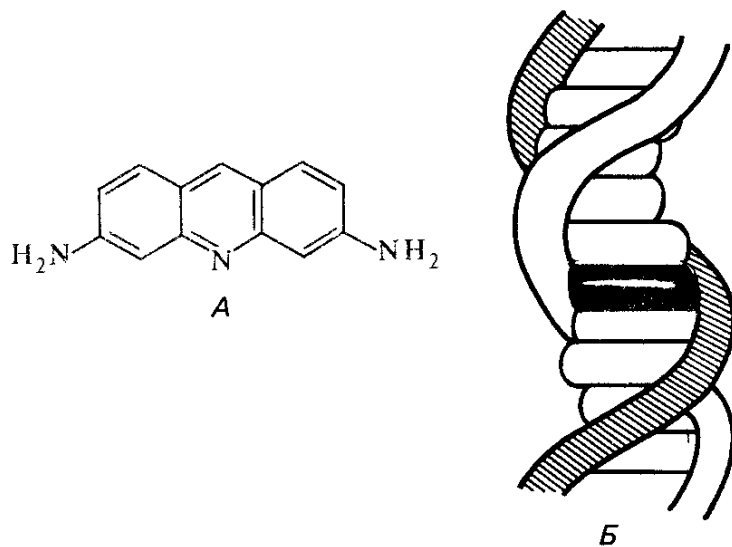


Рис. 15.15. Профлавин (А) и схема интеркаляции акридиновых красителей в ДНК (Б) (по Г. Стенту, 1974)

супрессорных мутаций, т. е. повторных мутаций того же гена (*r II B*). При скрещивании с фагом дикого типа каждый псевдодикый ревертант выщеплял два класса рекомбинантов типа *r III*. Один нес исходную мутацию *FCO*, другой — мутации, которые супрессировали мутацию *FCO*, но сами по себе тоже приводили к появлению фенотипа *r III*.

Далее у этих рекомбинантов, несущих только супрессорные мутации, вновь получили ревертанты псевдодикого типа, которые также оказались супрессорными. Новые внутригенные супрессоры второго порядка путем рекомбинации отделили от супрессоров первого порядка, убедились в том, что они тоже приводят к возникновению мутантного фенотипа, и с двумя из них повторили всю процедуру еще раз. В результате возникло 80 независимых мутаций *r II*, которые являлись супрессорами мутации *FCO*, или супрессорами супрессоров этой мутации, или супрессорами супрессоров мутации *FCO*.

Авторы не знали, была ли исходная мутация результатом вставки или выпадения пары оснований. Условно ей приписали знак «+», супрессорам первого порядка — знак «-», супрессорам второго порядка — «+» и супрессорам третьего порядка — «-». Теперь путем рекомбинации стали объединять их в одном гене. Оказалось, что при объединении трех мутаций одинакового знака были получены фаги, имеющие псевдодикый фенотип. Полученные результаты подтвердили исходные предположения. Так, если представить, что последовательность пар оснований

... ABC ABC ABC ABC ABC ABC ABC ...

считываемая слева направо, является участком гена *r II*, то вставка лишней пары оснований исказит записанную информацию вследствие сдвига рамки гипотетического читающего устройства:

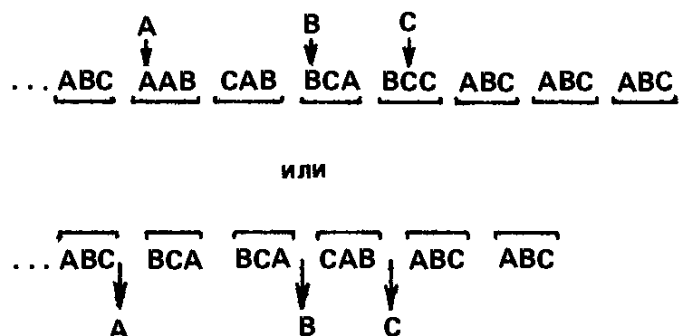
$$\begin{array}{cccccccc} & & \text{A} & & & & & & \\ & & \downarrow & & & & & & \\ \dots & \underline{\text{ABC}} & \underline{\text{AAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{C}} \dots \end{array}$$

Если выпадет пара оснований вблизи вставки (слева или справа), то за пределами участка, ограниченного вставкой и выпадением (прямой мутацией и супрессором) нуклеотидных пар, исходная информация будет восстановлена благодаря сдвигу рамки (сдвигу считывания) в обратном направлении:

$$\begin{array}{cccccccc} & & \text{A} & & & \text{B} & & & \\ & & \downarrow & & & \uparrow & & & \\ \dots & \underline{\text{ABC}} & \underline{\text{AAB}} & \underline{\text{CAB}} & \underline{\text{CAC}} & \underline{\text{ABC}} & \underline{\text{ABC}} & \underline{\text{ABC}} & \dots \end{array}$$

Очевидно, такое восстановление прежней записи невозможно при двух последовательных вставках или двух последовательных

выпадениях. В то же время три вставки и три выпадения должны нормализовать запись за пределами участка, ограниченного крайними мутациями:



Все подобные рассуждения основывались на предположении, что ген *rIII* кодирует белок, что было доказано позже.

Кроме того, все рассмотренные взаимодействия между мутациями могли разыгрываться только при условии, что левая часть гена может изменяться без особого нарушения функции генного продукта. Действительно, сейчас известно, что в генах и соответственно в белках существуют участки, допускающие вариации по составу.

Итак, если генетический код триплетен (предположение о том, что кодовое число кратно трем, Ф. Крик считал менее вероятным), то возникают два вопроса:

1. Является ли код перекрывающимся или *неперекрывающимся*, т. е. принадлежит ли каждая пара оснований только одному кодону или трем кодонам?

Если бы кодоны перекрывались, то замена одной пары оснований должна была бы приводить к замене сразу двух или трех аминокислот в белках. Такое предположение противоречит всем данным о мутационных заменах аминокислот, которые были получены к тому времени. Обычно одна мутация приводит к замене одного аминокислотного остатка (см., например, рис. 15.14). Следовательно, код *неперекрывающийся*.

2. Вырожден ли код? Для кодирования 20 аминокислот достаточно 20 триплетных кодонов. Существуют ли кодоны-синонимы или остальные 44 кодона просто не имеют смысла?

Некоторые аргументы в пользу вырожденности кода содержатся в работе Ф. Крика с сотрудниками. Взаимная супрессия мутаций типа «сдвиг считывания», т. е. вставок и выпадений, происходила на участке гена *rII*, соответствующем приблизительно $1/10$ всего гена. Ген *rIII* кодирует белок, состоящий приблизительно из 200 аминокислотных остатков, и, следовательно, мутации взаимодействовали на расстоянии, достаточном для кодирования около 20 аминокислотных остатков. Если бы код не был вырожденным, между вставкой и выпадением с большой вероятностью должны были возникать бессмысленные триплеты, и тогда нормальное считывание было бы невозможным.

Прямые данные в пользу вырожденности кода были получены в экспериментах Х. Виттмана, работавшего с вирусом табачной мозаики (ВТМ), а также при расшифровке кодонов химическим путем.

Расшифровка кодонов: эксперименты *in vitro*

Статья Ф. Крика с сотрудниками, посвященная природе генетического кода, была опубликована в первом номере журнала «Nature» за 1961 г., а летом того же года на одном из заседаний V Международного биохимического конгресса в Москве М. Ниренберг и Дж. Маттей сообщили о расшифровке первого кодона и, что еще более важно, предложили метод установления состава кодонов в бесклеточной системе белкового синтеза. Эксперименты по изучению бесклеточного синтеза белка уже в течение ряда лет велись несколькими группами биохимиков.

К началу 60-х годов в этой области исследований сложилась следующая ситуация. При добавлении меченых аминокислот к бесклеточным гомогенатам наблюдалось включение радиоактивной метки в белки. Добавление к таким гомогенатам ДНКазы снижало, а добавление ДНК стимулировало включение метки в белки. Это не противоречило представлениям о роли иРНК, переносящей информацию от ДНК к рибосомам, на которых синтезируется белок. Синтез белка в таких системах происходил очень недолго. М. Ниренберг и Дж. Маттей усовершенствовали бесклеточную систему, сделав ее более стабильной, а главное, показали, что она может работать под контролем экзогенной РНК, естественной или искусственной. Добавив синтетическую полиуридиловую рибонуклеиновую кислоту (полиU) в бесклеточную систему, приготовленную из *E. coli*, они обнаружили, что поли-U стимулирует включение в полипептид только одного типа аминокислотных остатков — фенилаланина. Таким образом, учитывая триплетность генетического кода, кодон для фенилаланина был расшифрован как UUU в иРНК.

В течение последующих трех-четырёх лет проблему генетического кода усиленно исследовали с использованием бесклеточных систем белкового синтеза, программируемого так называемыми *статистическими сополимерами*, содержащими рибонуклеотиды А, U, G, и C в разных соотношениях. За это время в лабораториях М. Ниренберга и С. Очоа был выяснен состав большинства кодонов. Однако определить последовательность нуклеотидов в кодонах этим способом было невозможно.

Последовательность нуклеотидов в кодонах удалось определить при помощи двух методов. Г. Корана с сотрудниками разработал метод химического синтеза ДНК-подобных полимеров с заданной последовательностью нуклеотидов. Применяя такие полидезоксирибонуклеотиды в качестве матрицы для синтеза РНК при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы, можно было получить РНК с заранее известной последовательностью и использовать ее в бесклеточной системе белкового синтеза.

Второй изящный метод выяснения последовательности нуклеотидов в кодонах предложили М. Ниренберг и П. Ледер. Он был основан на том, что промежуточными продуктами в синтезе белка являются аминокислоты, связанные с тРНК. Молекулы тРНК выполняют роль адапторов, которые подставляют аминокислотные остатки в растущую полипептидную цепь в соответствии с кодонами иРНК, находящейся на рибосоме. М. Ниренберг и П. Ледер убедились в том, что одного тринуклеотида на рибосоме достаточно для связывания и с рибосомой и с тРНК. Тринуклеотидные матрицы с определенным чередованием оснований были использованы для изучения связывания с рибосомами тРНК, заряженных аминокислотами.

В результате применения подходов, разработанных Г. Кораной, М. Ниренбергом, П. Ледером в 1965 г., был составлен кодовый словарь в его современном виде (табл. 15.3). Исследование мутаций, приводящих к сдвигу считывания в ряде генов, кодирующих первичную структуру белков (их называют *структурные гены*), в дальнейшем блестяще подтвердило справедливость кодовой таблицы и выводов, сделанных Ф. Криком на основе генетического анализа кода.

Итак, *генетический код является триплетным, неперекрывающимся, вырожденным, не имеет «запятых», т. е. кодоны ни чем не отделены друг от друга. Он считывается с фиксированной точки в пределах гена в одном направлении.*

Таблица 15.3. Генетический код

Первая буква (5')	Вторая буква				Третья буква (3')
	U	C	A	G	
U	Фен Фен Лей Лей	Сер Сер Сер Сер	Тир Тир — —	Цис Цис — Трп	U C A G
C	Лей Лей Лей Лей	Про Про Про Про	Гис Гис Глн Глн	Арг Арг Арг Арг	U C A G
A	Иле Иле Иле Мет	Тре Тре Тре Тре	Асн Асн Лиз Лиз	Сер Сер Арг Арг	U C A G
G	Вал Вал Вал Вал	Ала Ала Ала Ала	Асп Асп Глу Глу	Гли Гли Гли Гли	U C A G

Примечание. Трнплеты UAA, UAG, UGA не кодируют аминокислот.

15.8. Как рибосома считывает генетический код?

Сведения о генетическом коде, представленные в табл. 15.3, нуждаются в дополнительных пояснениях. Прежде всего во многих случаях для кодирования аминокислоты существенны две первые позиции кодона. Более наглядно это представлено в кодовой таблице в виде круга (рис. 15.16). Оказывается, что для восьми аминокислот замена основания в третьем положении кодона будет нейтральной: не приведет к замене аминокислотного остатка в белке. А в тех случаях, когда это все же произойдет, такая замена не изменит свойства полярности аминокислоты. Эти особенности кода, по-видимому, отражают его эволюцию.

Все кодоны, представленные в табл. 15.3 и на рис. 15.16, опознаются антикодонами тРНК, за исключением трех так называемых *нонсенсов* или *бессмысленных кодонов*. На самом деле они представляют собой знаки *терминации трансляции*. Взаимодей-

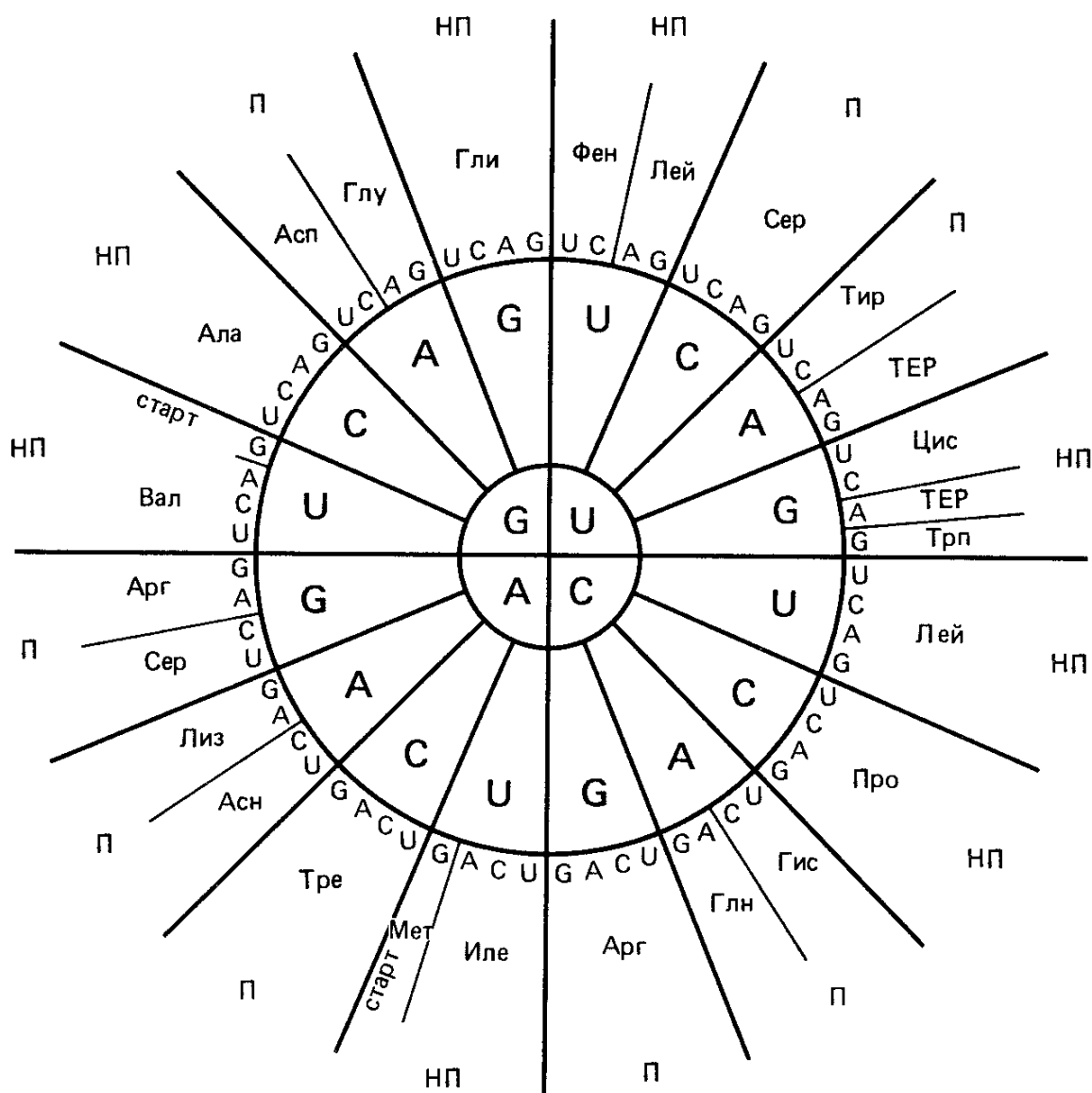


Рис. 15.16. Таблица кода в круговой форме.

Буквы во внутреннем круге — I позиция кодонов, буквы во втором круге — II позиция и буквы снаружи второго круга — III позиция кодонов. Тер — терминаторы; старт — кодон-инициатор. П — полярные, НП — неполярные аминокислотные остатки

ствие кодонов иРНК и антикодонов тРНК подчиняется правилам *неоднозначного соответствия*, сформулированным Ф. Криком. Согласно этим правилам, некоторые антикодоны могут «узнавать» более одного кодона в зависимости от того, какое основание находится в 1-м положении антикодона, соответствующем 3-му положению кодона с учетом их антипараллельного взаимодействия.

Таблица 15.4. Правила неоднозначного соответствия кодонов и антикодонов

I положение антикодона	U	C	A	G	I*	ψ*
III положение кодона	A G	G	U	U C	U C A G	G A

*I — инозин, ψ — псевдоурдин, обнаруженные в некоторых антикодонах как результат посттранскрипционной модификации.

Взаимодействия одного класса тРНК с несколькими кодонами обнаружены в бесклеточных системах, а также путем генетических экспериментов. Сопоставление данных табл. 15.3 и рис. 15.16 с данными табл. 15.4 показывает, что такое неоднозначное соответствие опять же не искажает смысла кодонов.

У прокариот в начале иРНК располагается последовательность: 5'-AGGAGGU-3', названная *последовательностью Шайн — Далгарно* — по имени открывших ее исследователей. Она необходима для нормального начала трансляции. Однако инициация трансляции происходит обычно на несколько нуклеотидов (4—7) «ниже по течению». По-видимому, малая субчастица рибосомы «узнает» последовательность Шайн — Далгарно при помощи 3'-конца 16S рРНК с комплементарной последовательностью оснований. Делеции или изменения последовательности Шайн — Далгарно резко снижают эффективность трансляции соответствующих иРНК у бактерий.

Сигналом *инициации трансляции* у про- и эукариот служит кодон для метионина AUG, если он находится в начале иРНК. В этом случае его «узнает» специальная иницирующая формилметиониновая (у бактерий) или метиониновая (у эукариот) тРНК. (В остальных случаях кодон AUG «читается» как метиониновый.) Сигналами инициации служат также кодоны GUG и UUG. Это взаимодействие происходит на рибосоме в ее аминокцильном центре (или А-центре), располагающемся преимущественно на малой субчастице рибосомы.

Взаимодействие иРНК (кодон AUG), малой частицы рибосомы и формилметионил-тРНК^{Ф_{Мет}} образует *комплекс инициации* (рис. 15.17), который задает фазу трансляции иРНК триплетами. Далее

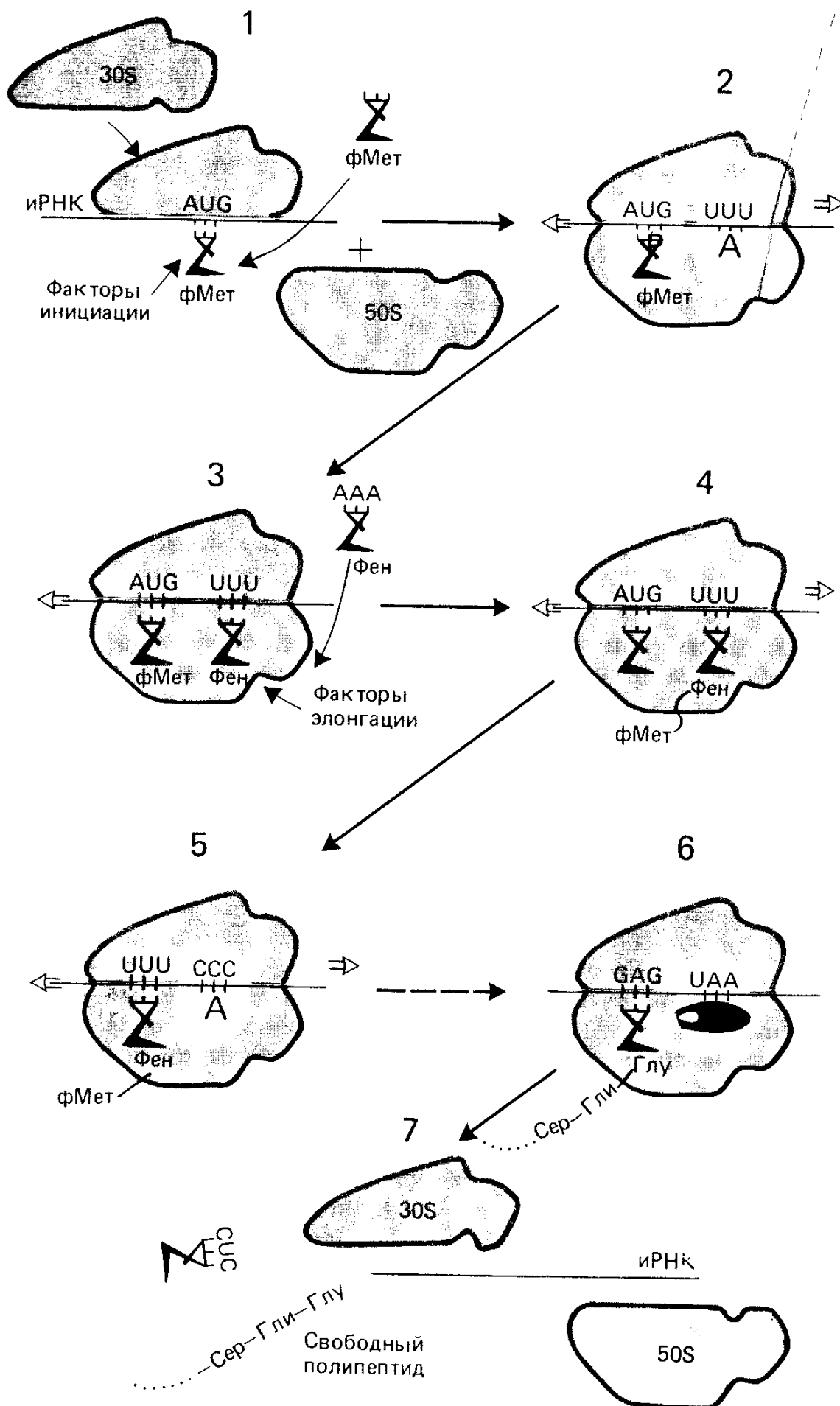


Рис. 15.17. Обобщенная схема трансляции иРНК у *E. coli*.
 1, 2, — инициация, 3, 4, 5 — элонгация, 6, 7 — терминация

к нему присоединяется бóльшая субчастица рибосомы, и формил-метионил-тРНК^{ф^{Мет}} перемещается в *пептидильный центр* (или Р-центр) рибосомы, расположенный преимущественно на бóльшей субчастице. При этом рибосома сдвигается на один триплет вдоль иРНК и ее свободный А-центр связывает следующую аминоацил-тРНК в соответствии с кодоном иРНК. Рибосома движется вдоль матрицы (от ее 5' к 3'-концу), последовательно считывая кодоны. При этом происходит *элонгация полипептида* путем образования пептидных связей между аминокислотными остатками (рис. 15.17). Полипептидная цепь нарастает от N-конца к С-концу. Процесс продолжается до тех пор, пока рибосома не встретит на иРНК один из трех кодонов — терминаторов, который считывается в ее А-центре.

Терминация полипептида заключается в диссоциации пептидил-тРНК на полипептид и тРНК, освобождении иРНК и субчастиц рибосомы, которые тем самым становятся способными к новому акту инициации трансляции.

Белок синтезируется на молекулах иРНК, «покрытых» рибосомами — так называемых *полирибосомах* или *полисомах*. Весь процесс трансляции сопровождается расщеплением молекул GTP, причем требуется участие дополнительных белковых факторов, специфичных для процессов инициации (факторы инициации), элонгации (факторы элонгации) и терминации (факторы терминации). Эти белки не являются интегральной частью рибосомы, а присоединяются к ней на определенных этапах трансляции. В общих чертах процесс трансляции одинаков у всех организмов.

Здесь необходимо упомянуть еще одно *свойство кода* — его *квазиуниверсальность*. Как показали эксперименты с бесклеточными системами, а также клонирование и расшифровка первичной структуры генов в сопоставлении с первичной структурой соответствующих белков, большинство кодонов у разных объектов читается одинаково. В то же время существуют и некоторые варианты значения кодонов, которые впервые были обнаружены при исследовании *белкового синтеза в митохондриях*. Так, кодон UGA, обычно служащий терминатором (см. табл. 15.3), в митохондриях дрожжей, человека, быка кодирует триптофан. AUA в митохондриях читается как Мет, а не Иле (табл. 15.3), CUG — как Тре, а не Лей. В то же время кодоны AGA и AGG в некоторых митохондриях используются как терминаторы, а не как кодоны для аргинина (см. табл. 15.3). Эти отличия в составе кодового словаря митохондрий связывают с их возможным симбиогенетическим происхождением (см. гл. 10), с сохранением некоего примитивного варианта кода. Правда, такая «простота» может быть и вторичным следствием малой информационной емкости ДНК митохондрий. Известно, что их генетический материал кодирует небольшую часть белков митохондрий, хотя они и имеют собственные тРНК и рРНК. Отклонения от универсальности кода обнаружены и у *Paramecium primaurelia*: UAA в цитоплазме читается как Глн.

Несмотря на все эти отклонения от правила универсальности

генетического кода, на основе знания механизма белкового синтеза и его пунктуации на уровне иРНК, очевидно, что кодоны инициаторы и терминаторы обуславливают проявление *генной дискретности генетической информации*. Как будет показано в следующей главе, сами иРНК могут быть и полигенными у бактерий, однако кодируют синтез дискретных белковых молекул, что обусловлено именно считыванием кодонов — инициаторов и терминаторов.

15.9. Генетический анализ трансляции. Супрессия

Большое значение в изучении процесса трансляции имеет метод генетического анализа. В частности, структура нонсенс-кодонов UAG и UAA была выяснена к 1965 г. еще до полной расшифровки генетического кода, когда был известен только состав кодонов для большинства аминокислот, но не чередование нуклеотидов в кодонах.

В 1962 г. С. Бензер и С. Чеймп описали так называемые *амбер-мутации* в локусе *rII* фага T4. Они могли ревертировать к дикому типу за счет дополнительных (супрессорных) мутаций в геноме бактерии-хозяина. Аналогичные амбер-мутации, подавляемые теми же *генами-супрессорами*, были обнаружены во многих генах бактериофага T4 и бактерии *E. coli*. При использовании систем ген — фермент было показано, что амбер-мутации приводят к преждевременному прекращению роста полипептидной цепи и в клетках синтезируются только N-терминальные фрагменты соответствующих белков. В результате *амбер-супрессии* синтез полипептидов восстанавливается.

А. Гарен, изучавший генетический контроль синтеза *щелочной фосфатазы* у *E. coli*, сравнил аминокислотные остатки, находившиеся в молекуле фермента дикого типа и у внутригенных ревертантов по локусу, кодирующему щелочную фосфатазу. Полученный результат представлен на рис. 15.18. Показаны только те кодоны соответствующих аминокислот, которые связаны со структурой *амбер-кодона* заменой одного нуклеотида. На основе этих данных амбер-кодон был идентифицирован как UAG. Аналогичным образом другие исследователи (С. Бреннер, Ф. Крик) расшифровали структуру еще двух нонсенс-кодонов: *охра-UAA* и *опал-UGA*.

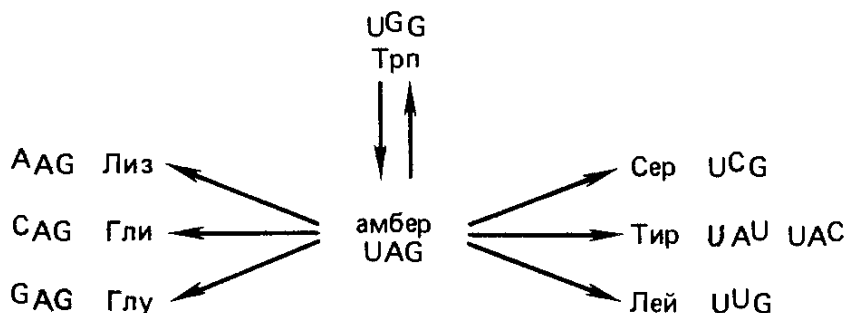


Рис. 15.18. Замены аминокислот, наблюдавшиеся при реверсиях амбер-мутантов по структурному гену щелочной фосфатазы *E. coli* (по А. Гарену, 1968)

Эти цветные наименования кодонов никак не соответствуют их характеристикам, а просто отражают романтизм, свойственный и молекулярным генетикам.

Существование всех трех типов мутантных кодонов-терминаторов и их супрессия были показаны и для эукариотических микроорганизмов — дрожжей *Sacch. cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*.

Знание генетического кода позволило решить и обратную задачу: расшифровать некоторые гемоглинопатии у человека (болезни, связанные с появлением аномальных форм гемоглобина) как результат мутаций, превращающих нормальные сигналы терминации глобинов в значащие кодоны (см. гл. 20).

Обнаружение генов-супрессоров, «осмысливающих» нонсенс-аллели разных генов, указывает на то, что трансляция генетического кода может меняться. Характер специфичности нонсенс-супрессоров *E. coli* по отношению к нонсенс-кодонам, представленный в табл. 15.5, подчиняется правилам неоднозначного соответствия кодонов иРНК и антикодонов тРНК, как если бы *охра-супрессоры* — супрессоры нонсенса UAA — кодировали тРНК с антикодоном AUU (см. табл. 15.4), который может считывать UAA и UAG.

В то же время строгие супрессоры для кодонов UAG и UGA транслируют только эти кодоны. Действительно, изучение трансляции в бесклеточных системах показало, что за считывание нонсенсов отвечают мутантные тРНК. Если в качестве иРНК взять геном РНК-содержащего фага R17 с *охра-мутацией* в самом начале гена, кодирующего белок оболочки фага, и добавить его в бесклеточную систему, полученную из штамма *E. coli*, не имеющего *охра-супрессора*, то синтез белка оболочки фага не происходит. Если в такую же систему добавить тРНК из штамма *E. coli*, несущего *охра-супрессор*, то белок оболочки синтезируется, т. е. нонсенс-кодон уже более не прекращает трансляцию в гене, кодирующем этот белок. В таком эксперименте была идентифицирована индивидуальная тРНК, ответственная за *нонсенс-супрессию*. Ею оказалась тирозиновая тРНК с антикодоном AUU, отличающимся от стандартного антикодона AUG (см. рис. 15.11), необходимого для считывания тирозинового кодона UAC одной заменой: G на U. Таким образом, мутации, затрагивающие антикодон тРНК, меняют их кодоновую специфичность и тем самым создают возможность для супрессии мутаций (мутантных кодонов) на уровне трансляции. Как правило, нонсенс-супрессорными оказываются те тРНК, антикодоны которых могут быть превращены заменой одного нуклеотида в антикодоны, комплементарные кодонам-терминаторам. Такие нонсенс-супрессоры, кодирующие тРНК, обычно доминантны.

Таким же путем могут воз-

Таблица 15.5. Кодоновая специфичность нонсенс-супрессоров у *E. coli*.

Супрессор	Способность супрессировать нонсенсы		
	UAG	UAA	UGA
SUP (UAG)	+	—	—
SUP (UAA)	+	+	—
SUP (UGA)	—	—	+

никать и *миссенс-супрессоры*, т. е. мутации, приводящие к такому изменению тРНК, при котором она начинает транслировать «не свой» кодон.

Наиболее подробно исследованы миссенс-супрессорные глициновые тРНК *E. coli*. Например, тРНК₁^{Гли} с антикодоном ССС обычно транслирует кодон GGG (Гли). Мутационная замена в ее антикодоне ССС на СUC приводит к тому, что теперь тРНК₁^{Гли} «узнает» кодон GAG для глутаминовой кислоты. Таким образом, если в результате прямой мутации в каком-либо гене из кодона GGG (Гли) будет получен кодон GAG (Глу) — миссенс-мутация, то супрессия такой мутации может быть осуществлена мутантной тРНК₁^{Гли} с антикодоном СUC, которая будет подставлять глицин на место глутаминовой кислоты. Произойдет супрессия *миссенс-мутации*.

Мутации, затрагивающие антикодоны тРНК, могут приводить и к *супрессии мутаций типа «сдвиг считывания»*. Например, для тРНК₁^{Гли} *Salmonella typhimurium* получена мутантная форма с четырьмя основаниями в антикодоне. СССС. Такая тРНК считывает четыре основания GGGG в случае возникновения этой последовательности в результате прямой мутации — вставки лишнего G в кодон для глицина — и благодаря этому восстанавливает фазу (рамку) считывания кода.

Все эти изменения генов, кодирующих тРНК, не приводят к полной дезорганизации аппарата трансляции благодаря тому, что большинство их для тРНК дублированы: так, у бактерий — 40—80 генов для тРНК, у *Sacch. cerevisiae* — 320—400, у *Dr. melanogaster* — 750, в клетках HeLa (человек) — 1300. Наличие нескольких генов для изоакцепторных (заряжаемых одной аминокислотой) тРНК, при этом имеющих одинаковый антикодон, создает потенциальные возможности для «отвлечения» одной из них для супрессии. Оставшиеся немутантными тРНК того же семейства продолжают обслуживать «свой» кодон.

Супрессия на уровне трансляции может происходить также вследствие мутаций в генах, кодирующих некоторые белки рибосом. В результате этих мутаций рибосома «ошибается», например в считывании нонсенс-кодонов и «осмысливает» их за счет некоторых обычных, немутантных тРНК. Мутации, затрагивающие аппарат трансляции, описаны не только у *E. coli* но и у эукариотических микроорганизмов — грибов: *Sacch. cerevisiae* и *Schiz. pombe*, *N. crassa*, *Podospora anserina*.

Наряду с *генотипической супрессией*, действующей на уровне трансляции, возможна и *фенотипическая супрессия* по отношению к аллелям: при понижении температуры, замене глюкозы на несферментированные источники углерода, а также при действии на клетки *аминогликозидных антибиотиков*, связывающихся с рибосомой — например *стрептомицина* (для *E. coli*) и *паромомицина* (для *Sacch. cerevisiae*).

Таким образом, модель *трансляционной (или информационной) супрессии* очень удобна для генетического подхода к изуче-

нию действия гена. В этих исследованиях родилась интригующая проблема оптимального уровня точности трансляции, определяемая взаимодействиями иРНК, тРНК, рибосом и других компонентов аппарата трансляции.

15.10. Молекулярная биология гена

Исследования тонкой структуры генов аналогичные тем, которые осуществил С. Бензер для фага Т4, были проведены у вирусов, бактерий, грибов, водорослей, дрозофилы и высших растений. Несмотря на различную детализацию внутригенных карт, выявилась общая закономерность: рекомбинационная делимость гена у всех объектов, огромное число возможных *гетероаллельных мутаций*, т. е. мутаций, по-разному локализованных в одном и том же гене и дающих таким образом начало *гетероаллелям*.

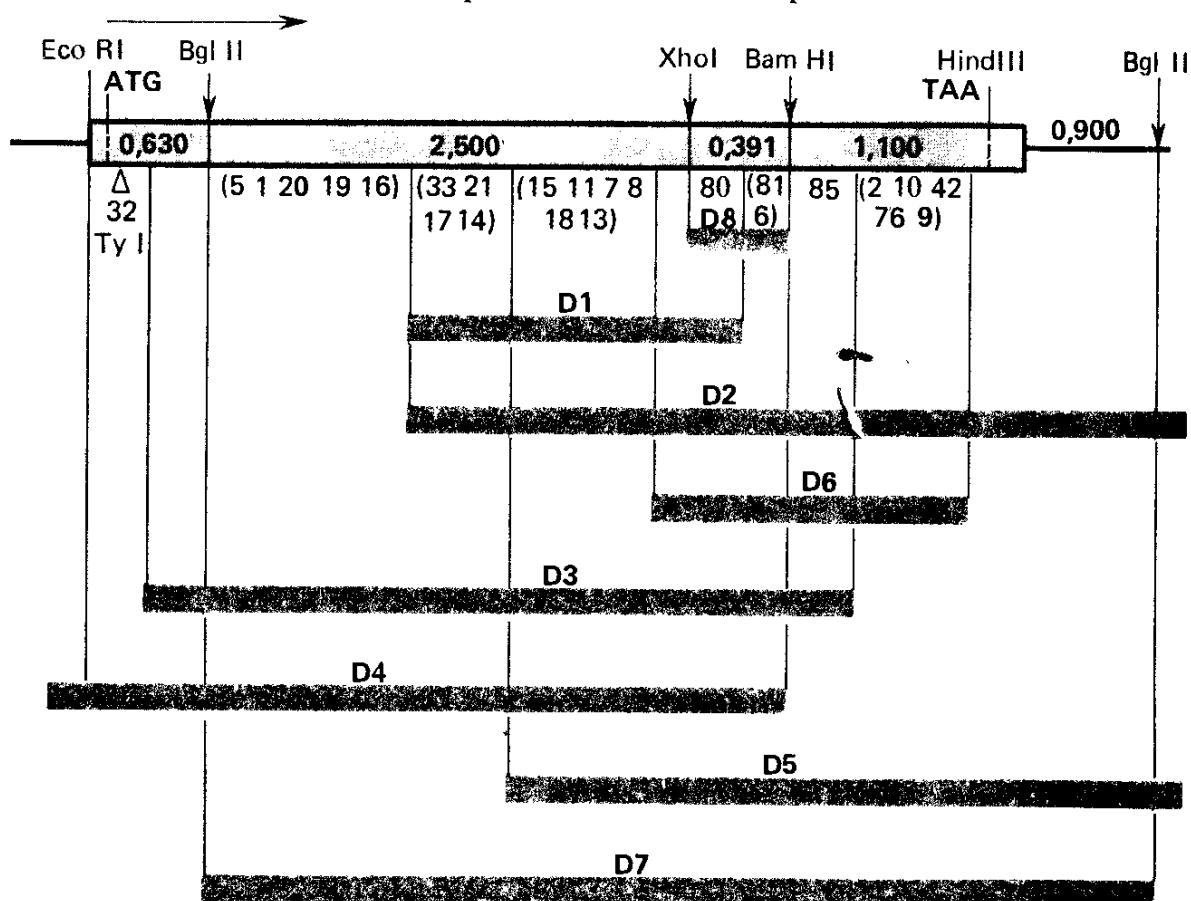


Рис. 15.19. Физическая и генетическая карта локуса *LYS2* дрожжей *Sacch. cerevisiae* (Д. А. Горденин и др., 1986).

Светлая полоса, продолженная линией, — ген *LYS2* и прилегающая к нему некодирующая область. EcoRI, BglII, XhoI, BamHI, HindIII — сайты рестрикции, между которыми указаны расстояния в тысячах пар нуклеотидов. Цифры снизу — точковые мутации, картированные с помощью метода перекрывающихся делеций. Треугольник слева — мутация 32 — результат инсерции транспозона Tu1. Красные полосы ниже карты гена — делеции, полученные *in vitro* в гене *LYS2*, клонированном в составе векторной плазмиды. Делеции D7 и D8 получены в результате вырезания фрагмента ДНК соответствующими рестриктазами и последующего лигирования концов. Остальные делеции (D1 — D6) получены в результате разрезания гена *LYS2* по уникальному сайту XhoI, переваривания образовавшихся концов нуклеазой Bal31 в течение различного времени и последующего лигирования. В этих случаях точное положение концов делеций неизвестно. Стрелки — направление транскрипции и трансляции. Показаны положения кодона инициатора ATG и терминатора TAA трансляции

Современная теория гена опирается на ряд крупных достижений: на установление сложной структуры гена, на соотнесение генетических и физических единиц измерения, на расшифровку генетического кода, выяснение способа его реализации через этапы транскрипции и трансляции и, наконец, на генную инженерию. На основе этих достижений сформировалась область исследований, которую Дж. Уотсон назвал «молекулярной биологией гена».

Выделение и клонирование генов позволяют строить *физические карты генов* при использовании различных рестриктаз. Рестрикционную карту (физическую) можно соотнести с генетической (рекомбинационной) картой гена. Манипулирование с рекомбинантными ДНК, полученными *in vitro*, позволило распространить методы быстрого картирования мутаций, основанные на использовании перекрывающихся делеций, на многие объекты. Дело в том, что внутригенные делеции сравнительно часто возникают у фагов и бактерий, но очень редки у эукариот. Такие делеции стали получать *in vitro* и применять для картирования, соотнося рекомбинационные расстояния и расстояния, выражаемые в числе нуклеотидов. Стало возможным определять молекулярную природу мутаций прямыми методами секвенирования. Как пример на рис. 15.19 представлена физическая и генетическая карта гена *LYS2 Sacch. cerevisiae*.

Перекрывающиеся гены вирусов

Последовательное применение генетического анализа и расшифровка первичной структуры генов вскрыли неожиданный факт *перекрывания генов* у некоторых вирусов. Так, у ряда РНК-содержащих бактериофагов *E. coli* (R17, f2, MS2, Q β) были известны всего три гена: репликазы, белка оболочки и созревания вирусной частицы. Мутации каждого гена, например у фага MS2, некомплементарны между собой, но комплементарны мутациям остальных двух генов. После расшифровки полной нуклеотидной последовательности РНК этих фагов на ней были локализованы все три гена. Однако обнаружена и четвертая группа мутаций, блокирующих лизис зараженной клетки. Эти мутации образовали самостоятельную группу комплементации, т. е. на основе функционального критерия аллелизма они были отнесены к самостоятельному гену, для которого уже не оставалось места на РНК бактериофага. Тем не менее путем исследования белкового синтеза *in vitro* с использованием РНК фага в качестве иРНК было выявлено реальное существование белка L размером в 75 аминокислотных остатков, кодируемого этим новым геном. Локализовать его удалось благодаря тому, что один из мутантов по гену лизиса нес нонсенс UGA, идентифицированный по взаимодействию с соответствующими супрессорными тРНК. У этого мутанта была расшифрована первичная структура РНК. Оказалось, что UGA возник в результате замены С на U в кодоне CGA (Arg). Таким образом была установлена фаза считывания триплетов в гене ли-

зиса: слева нашли кодон-инициатор (AUG), а справа — терминатор (UAA). Между AUG и UAA как раз располагаются 75 триплетов.

Оказалось, что идентифицированный таким образом ген локализован частью в гене белка оболочки (47 оснований), частью в межгенном интервале (36 оснований) и частью в гене РНК-репликазы (142 основания).

Аналогичная ситуация обнаружена для некоторых генов одноцепочечных ДНК-содержащих фагов *E. coli* ΦX174, G4 и др., о чем уже упоминалось в гл. 9 (см. рис. 9.11), а также для вируса млекопитающих SV40.

Перекрытие генов — нередкое явление у вирусов и транспозонов, но оно вовсе не означает, что код может быть перекрывающимся. В каждом из перекрывающихся генов триплеты все так же считываются с фиксированной точки и каждый нуклеотид принадлежит одному кодону.

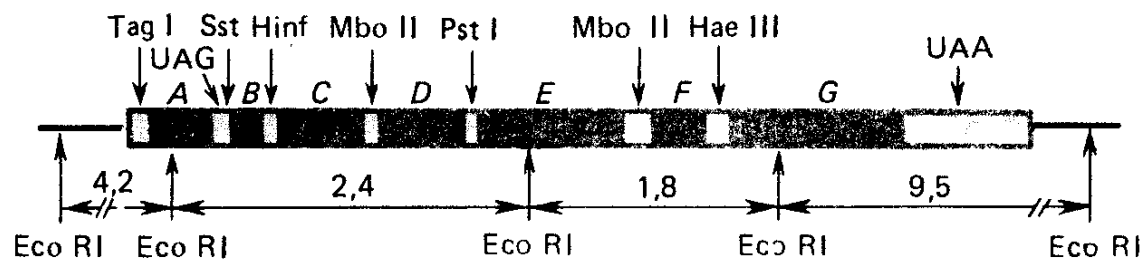
Мозаичные гены эукариот

Благодаря успехам молекулярной генетики, казалось бы, устанавливались «правила игры» в молекулярной биологии гена. Коллинеарность гена и кодируемого им полипептида определяет соответствие первичной структуры белка тому, что записано в виде чередования нуклеотидов в гене. Однако в конце 70-х годов выяснилось, что у эукариот нередко встречаются гены, содержащие «лишнюю» ДНК, — целые участки, не представленные в молекуле иРНК и, таким образом, не считываемые на рибосоме.

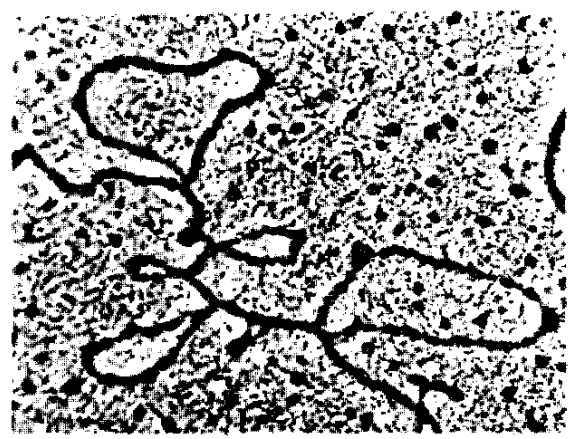
Благодаря клонированию выделенного из хромосомы гена, его можно получить в препаративных количествах. При помощи обратной транскриптазы можно синтезировать кДНК, комплементарную иРНК, направляющей синтез данного белка на рибосомах. иРНК выделяют из полисом, осаждаемых антителами к исследуемому белку. Далее такую кДНК (или непосредственно иРНК) можно *in vitro* гибридизовать (предварительно расплавив водородные связи нагреванием) с ДНК гена. Когда такая работа была проделана, например, с геном, кодирующим куриный *овальбумин*, оказалось, что гетеродуплекс образует лишь часть хромосомной ДНК. Вместе с тем гибридная молекула содержала несколько одноцепочечных петель, образуемых участками хромосомной ДНК, не представленными в молекуле иРНК (см. рис. 15.20). Эти последовательности получили название вставок или *интронов*. Последовательности гена, представленные в молекуле иРНК, называли *экзонами* (от англ. expression).

Такая *интрон-экзонная*, или *мозаичная*, структура гена часто встречается у млекопитающих, реже — у высших растений и дрожжей. Интроны обнаружены в генах митохондрий. У эубактерий интроны вообще отсутствуют или чрезвычайно редки.

Благодаря использованию в качестве зонда радиоактивной кДНК куриного овальбумина и некоторых других мозаичных генов удалось показать, что в ядрах существуют молекулы РНК —



А



Б

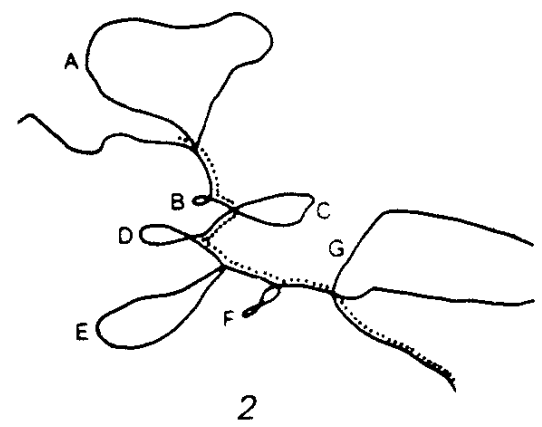


Рис. 15.20. Физическая карта гена куриного овальбумина (F. Ayala, I. Kiger, 1980). А — чередование интронов (темные участки) и экзонов (светлые участки). Показаны сайты рестрикции. Внизу — расстояния в тысячах пар нуклеотидов между сайтами *Eco RI*. Б — результат гибридизации иРНК и ДНК гена: 1 — электронная микрофотография, 2 — графическая реконструкция

так называемые про-иРНК, содержащие как экзоны, так и интроны. Следовательно, первичный транскрипт мозаичного гена содержит всю нуклеотидную последовательность, соответствующую гену. В дальнейшем удаление интронов происходит при созревании про-иРНК, в ходе которого экзоны ковалентно соединяются молекулу иРНК. Этот процесс получил название *сплайсинг*. (от англ. морского термина to splice - сращивать канавы без узлов).

Созревание иРНК у эукариот включает не только сплайсинг, но и некоторые дополнительные ее модификации: присоединение к 5'-концу 7-метилгуанозина или «кэпа» — процесс *кэпирования*, а также добавление к 3'-концу от нескольких десятков до нескольких сотен остатков адениловой кислоты — *полиаденилирование*. Эти модификации необходимы для нормального функционирования эукариотических иРНК. Итак, рассмотрены историческое развитие теории гена и ее современное состояние. Ген рассматривается как участок молекулы ДНК, кодирующий синтез полипептидной цепи, или функционирующей молекулы РНК (тРНК, рРНК).

Пути переноса информации, закодированной в ДНК, с помощью Ф. Криком в виде *центральной догмы молекулярной биологии*

(рис. 15.21). Схема, представленная на этом рисунке, означает, что информация может воспроизводиться при репликации ДНК, что она может переноситься от ДНК к РНК и далее к белкам. Возможны и особые случаи переноса информации от РНК к РНК при ее репликации, от РНК к ДНК в результате обратной транскрипции и от ДНК непосредственно к белкам, что было показано при действии некоторых антибиотиков, в присутствии которых рибосомы могут связываться с односторонними кольцевыми ДНК и непосредственно их транслировать.

«Запрещен» перенос информации от белков обратно к нуклеиновым кислотам. Это означает, что модификации белков — генных продуктов — не наследуются.

Все типы переноса информации осуществляются на основе комплементарных межмолекулярных взаимодействий. При репликации, транскрипции и трансляции — это взаимодействия нуклеотидов, образующих пары А — Т (U) и G — C.

Реальность современной теории гена подтверждается нынешними успехами развития биологии, оперирующей не условными, а реальными генетическими единицами, необходимыми для создания организмов с новыми свойствами. В то же время очевидно, что теория гена еще не завершена, и ее развитие будет обусловлено дальнейшим прогрессом генетики и биологии в целом.

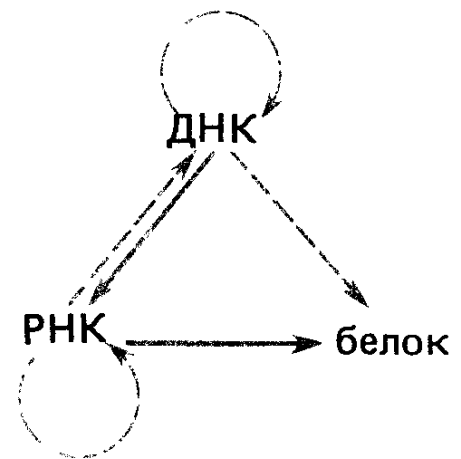


Рис. 15.21. Перенос генетической информации в биологических системах.

Сплошные стрелки — распространенные пути переноса информации, пунктирные — наблюдаемые в особых случаях. Подробности в тексте

Вопросы к главе 15

1. Дайте определения понятиям: аллель, сайт, локус.
2. Ген a может находиться в трех аллельных формах: a^1 , a^2 и a^3 . Напишите генотипы и фенотипы возможных компаундов и результаты скрещивания их между собой, если $a^1 > a^2 > a^3$.
3. Имеются два ауксотрофных мутанта дрожжей с одинаковыми фенотипами. Как узнать, аллельны или неаллельны мутации?
4. Среди мутантов дрожжей, ауксотрофных по лизину, выявлены мутанты по генам $lys 1$, $lys 2$, $lys 7$, $lys 8$. Каков фенотип их гибридов с тремя тестерными штаммами: $lys 2$; $lys 7$; $lys 1 lys 7$?
5. Четыре мутанта дрожжей, ауксотрофные по гистидину, исследованы в тесте на аллелизм:

Тестеры	Мутанты			
	1	2	3	4
$his 2$	—	—	+	+
$his 3$	+	+	+	—
$his 4$	+	—	+	+

Установите, в каких генах произошли исследуемые мутации («+» — рост гибрида на среде без гистидина, «—» — отсутствие роста гибрида на среде без гистидина).

6. Постройте карту гена методом делеционного картирования, если концы делеций расположены:

Д1

Д2

Д3

_____ ,

а результаты рекомбинации точковых мутаций с делециями:

Делеции	Точковые мутации			
	1	2	3	4
Д ₁	—	—	—	—
Д ₂	+	—	+	—
Д ₃	+	—	+	+

7. На карте локализованы точковые мутации: 1—5—8—4—3—7—2—6.

Изобразите на этой карте делеции: Д1, Д2, Д3, если с указанными точковыми мутациями они рекомбинируют следующим образом:

Делеции	Точковые мутации							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Д1	—	+	+	+	—	+	+	—
Д2	+	—	—	—	—	+	—	—
Д3	+	—	—	+	+	—	—	+

(«+» — наличие рекомбинации, «—» — ее отсутствие).

8. Перечислите основные свойства генетического кода.

9. Какие факты указывают на триплетность генетического кода?

10. Сколько аминокислот содержит белок, если кодирующая часть соответствующего ему гена состоит из 3000 нуклеотидов?

11. Последовательность нуклеотидов в иРНК: AAUUACGUCAAUUAC. Какой полипептид синтезируется на этой матрице? Что произойдет, если между 9-м и 10-м нуклеотидами произойдет вставка урацила?

12. Последовательность аминокислот в полипептидной цепи: глн, цис, три, асп, мет. В результате мутации получена новая последовательность: арг, вал, гли, тре, трп. Какая это мутация? Какова последовательность нуклеотидов в иРНК мутанта и дикого типа?

13. Азотистая кислота индуцирует замены пар оснований в ДНК, которые приводят к изменениям иРНК: С → U, А → G. В результате действия азотистой кислоты в одном из участков цепи ДНК происходит замена триплета, кодирующего аргинин, на триплет, кодирующий глутамин. В другом случае заменяется триплет, кодирующий аргинин, на триплет, кодирующий лизин. Какие триплеты содержат мутант и дикый тип?

14. У мутанта с измененным кодоном для 9-й аминокислоты изо-1-цитохрома С дрожжей Ф. Шерман наблюдал появление следующих аминокислотных остатков в положении 9: тир, сер, лей, глу, лиз, глн в результате реверсий. Какой кодон возник у исследованного мутанта и что он кодирует, если у дикого типа 9-я аминокислота — глу.

15. Почему гены эукариот редко экспрессируются в клетках бактерий?

Генетический материал в онтогенезе

Поколения многоклеточных эукариот соединяет одна клетка — зигота, которая развивается в сложный организм с дифференцированными органами и тканями. Часть клеток зародыша на ранних стадиях развития обособляется и дает начало гонадам, продуцирующим половые клетки — гаметы. Именно гаметы содержат всю полноту генетической информации данного вида и составляют непрерывный, потенциально бессмертный зародышевый путь. Смертны соматические клетки индивидуумов, представляющих собой как бы ответвления от зародышевого пути, возникающие после оплодотворения.

Если до сих пор рассматривались в основном проблемы хранения, передачи и изменений генетической информации, то в этой главе будет показано, каким образом генетическая информация реализуется в ходе индивидуального развития и как генетический материал контролирует последовательное возникновение различных органов и тканей организма. Эта проблема составляет содержание *генетики индивидуального развития*, или *онтогенетики*.

16.1. Проблема стабильности генетического материала в онтогенезе

Представляет ли онтогенетическая изменчивость результат дифференциального действия генов, т. е. развертывания генетической программы зиготы в пределах нормы реакции, заданной генотипом, или генетический материал изменяется в онтогенезе? Содержат ли все соматические клетки одинаковый или различающийся набор генов? Собственно так был поставлен этот вопрос еще в конце прошлого века. В 1883 г. В. Ру, один из создателей ядерной гипотезы наследственности, предположил, что ядра, возникающие при дроблении зиготы, разнокачественны. Однако в 1892 г. Г. Дриш показал, что перемещение ядер между клетками эктодермы и мезодермы дробящегося зародыша не нарушает его нормального развития. Зачаток регенерирующего хвоста тритона может быть пересажен в область конечности и превратится в ногу, а не в хвост. Следовательно, дробление и последующая дифференцировка не сопровождаются потерей или необратимыми изменениями ядерного материала.

Возникновение мутации *Bar* у *D. melanogaster* приводит к дупликации в X-хромосоме, которую можно наблюдать и в клетках слюнных желез, и в клетках кишечника, хотя эта мутация выра-

жается в изменении формы глаза. Такие примеры, казалось бы, согласуются с той точкой зрения, что геном одинаков во всех клетках организма. Это положение подтверждает возможность получения целого растения из отдельных клеток флоэмы корнеплода моркови. Целые растения могут регенерировать из клеток каллуса, возникшего на отрезках стебля проростков, семядолей и т. д., что указывает на *тотипотентность* дифференцированных соматических клеток растений, т. е. на их способность обеспечивать полное развитие организма.

Способность к *соматическому эмбриогенезу*, как его назвал Б. П. Токин, и последующей регенерации целых организмов характерна для растений, некоторых животных, губок, кишечнополостных, червей.

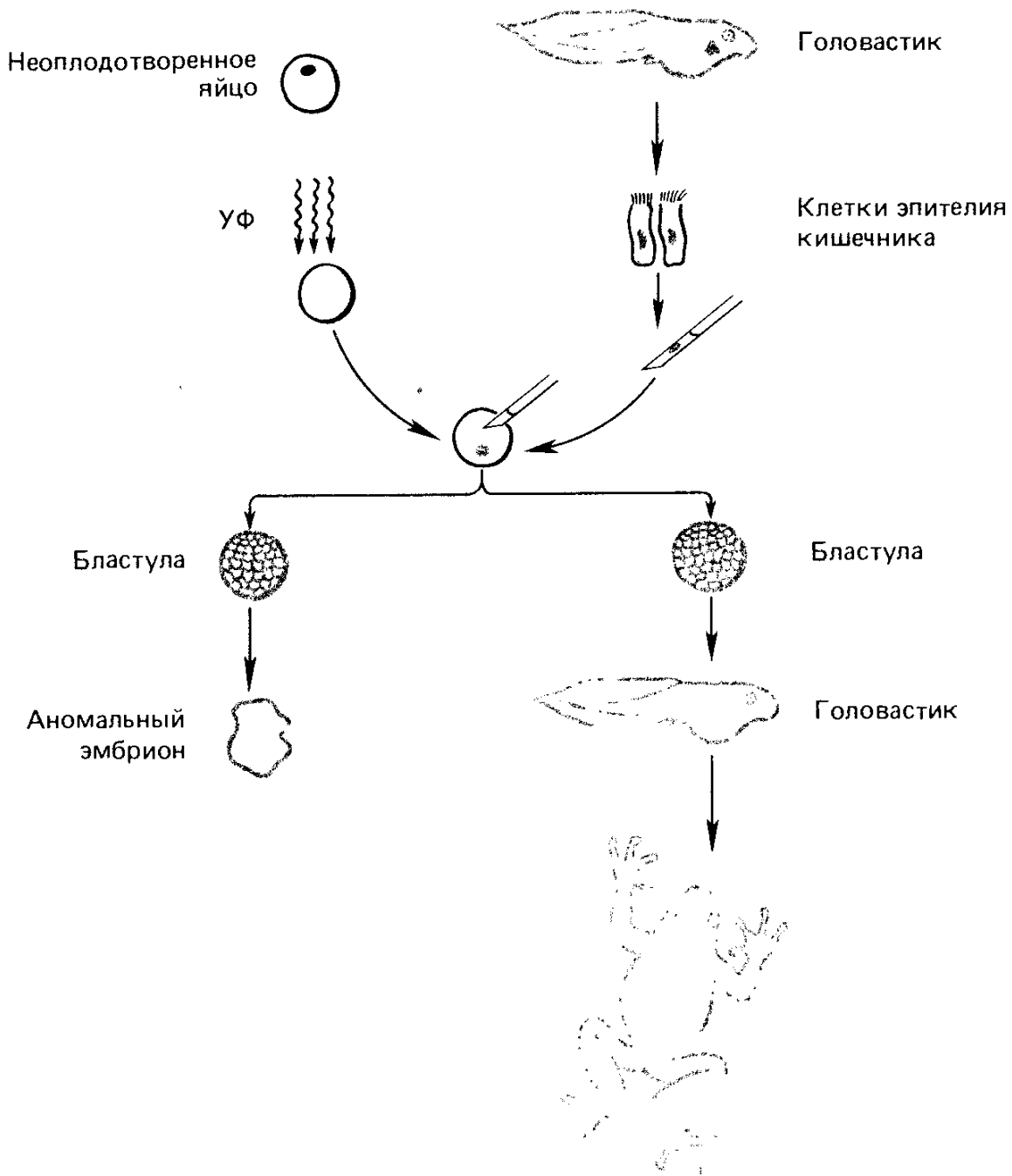


Рис. 16.1. Опыт Дж. Гердона, показывающий тотипотентность ядра соматической клетки *Xenopus laevis* (по Дж. Гердону, 1968)

В то же время известно, что структура хромосом, например тех же слюнных желез и мальпигиевых сосудов двукрылых, претерпевает существенные изменения вследствие эндомитотической политенизации. У некоторых организмов (паразитические черви, циклопы) известно явление диминуции хроматина — потеря значительной части генетического материала (от 20 до 80% ДНК) — при дифференцировке соматического пути в эмбриогенезе.

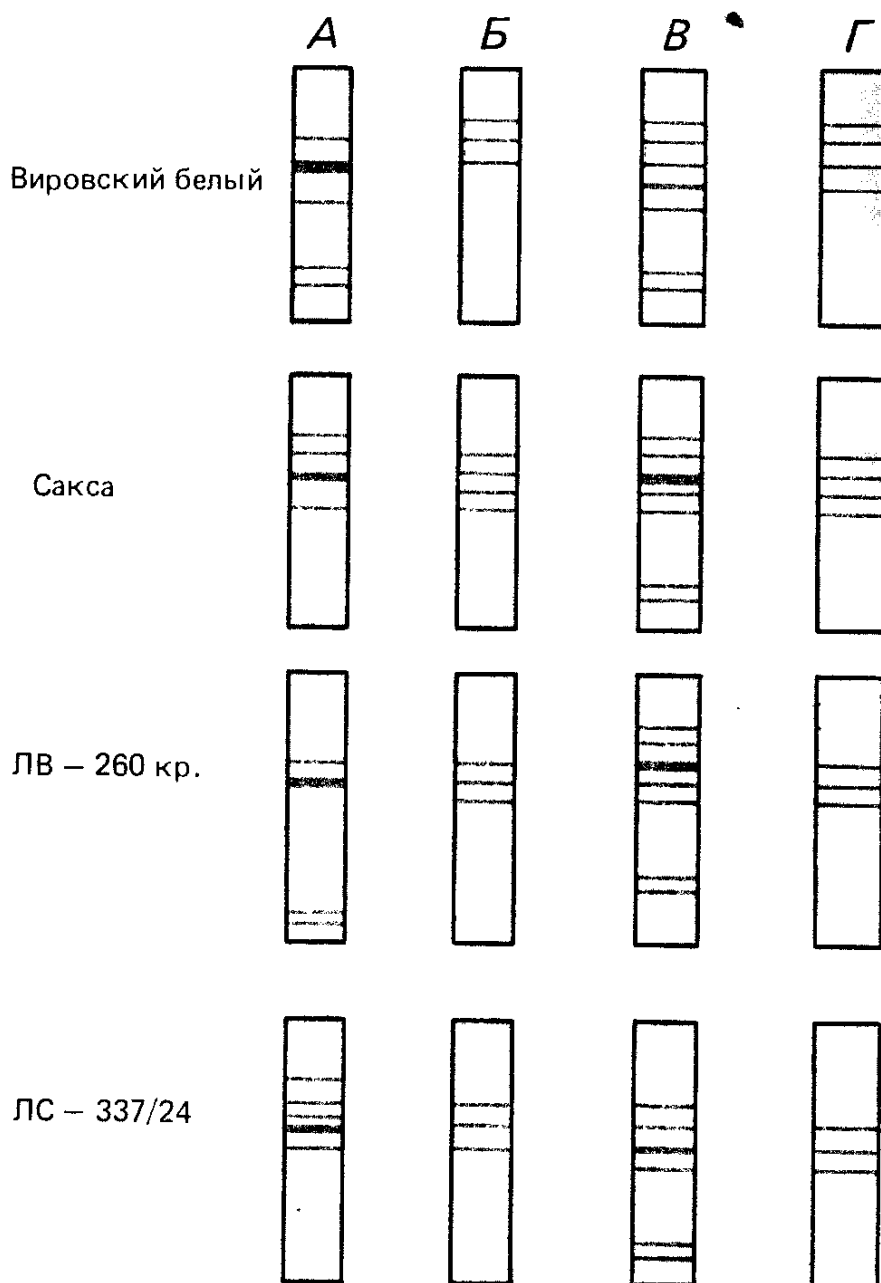


Рис. 16.2. Изозимные спектры пероксидазы редиса (Л. А. Лутова, 1977). А — семядоли; В — корни; В — каллус в культуре; Г — корни, развившиеся в результате вторичной дифференцировки в каллусной культуре.

Слева — наименования сортов и линий редиса. Дедифференцировка (каллус) сопровождается расширением изозимного спектра по сравнению со спектром дифференцированных органов, а вторичная дифференцировка вновь приводит к сужению спектра изозимов

Экспериментальный подход к решению дилеммы «дифференциальная активность генов или изменение состава генетического материала в онтогенезе» наметился в 60-х годах.

16.2. Тотипотентность ядра соматической клетки

Дж. Гердон продемонстрировал возможность полного развития *Xenopus laevis* на основе генетической информации ядра соматической клетки. Неоплодотворенные яйца *X. laevis* облучали большими дозами ультрафиолетового света и таким образом убивали их ядра. Затем в энуклеированное яйцо инъецировали ядро из эпителия кишечника головастика. В ряде случаев из таких яиц развились головастики, а затем взрослые лягушки (рис. 16.1).

В качестве генетического маркера, гарантировавшего чистоту эксперимента, было использовано число ядрышек. Лягушки, от которых брали ядра, образовывали два ядрышка на ядро, т. е. каждый ядрышковый организатор гомологичных хромосом функционировал нормально. В качестве донора соматических ядер использовали *X. laevis*, гетерозиготных по делеции ядрышкового организатора, и потому имевших только одно ядрышко на ядро. Все лягушки, развившиеся в результате пересадки ядер, имели по одному ядрышку.

Таким образом, эти эксперименты показали, что дифференцировка клеток в онтогенезе не обязательно сопровождается необратимой инактивацией генетического материала ядра, а проблема генетического контроля индивидуального развития тесно связана с проблемой *дифференциальной экспрессии генов*.

Тотипотентность соматических клеток растений дает большие возможности для изучения дифференциального действия генов в онтогенезе. Так, сравнивая спектры изозимов, например пероксидазы, в недифференцированной каллусной ткани и в дифференцированных органах (корнях, листьях и т. д.) регенерантов, можно убедиться, что в каллусах образуется максимальный спектр изозимов пероксидазы, а в листьях или корнях целого растения спектр изозимов сужается. При дифференцировке происходит репрессия синтеза некоторых изозимов (рис. 16.2).

Сравнение яйца или гастрюлы с соматическими клетками животных показывает, что в первом случае синтезируется гораздо больше различных типов иРНК, чем во втором. Таким образом, встает вопрос об уровнях и механизмах обеспечения дифференциальной экспрессии генов.

16.3. Дифференциальная активность генов

Дифференциальная экспрессия генов, т. е. регуляция их активности в зависимости от сигналов, поступающих извне, может происходить на уровне любого известного матричного процесса; репликации, транскрипции, трансляции, а также в процессе созревания

иРНК и полипептидных цепей, образующихся в результате трансляции.

Дифференциальная репликация отдельных участков генетического материала известна у прокариот и у эукариот. Индукция и последующая репликация профага λ (см. гл. 9) представляют собой пример дифференциальной репликации у бактерий. Амплификацию экстрахромосомных копий ДНК, кодирующей рРНК, наблюдали в ядрышках ооцитов многих животных, а также при мегаспорогенезе растений. Амплификация рДНК заключается в том, что одна из ее копий, содержащая многократные повторы генов, кодирующих рРНК, покидает хромосому — область ядрышкового организатора и затем многократно реплицируется по механизму катящегося кольца (см. гл. 9). Этим достигается усиленный синтез рибосом в ооците, обеспечивающий ранние этапы развития после оплодотворения. Известно, что сперматозоид вносит в зиготу только ядерный материал и первые стадии дробления вплоть до гастролы обеспечиваются цитоплазмой, а следовательно, и рибосомами яйцеклетки.

В гигантских хромосомах слюнных желез двукрылых наблюдается бóльшая политенизация отдельных участков хромосом. Само образование политенных хромосом указывает на то, что репликация в различных соматических клетках происходит неодинаково. Об этом же свидетельствует и сравнение *репликонов* — единиц репликации различных соматических клеток. Размеры репликонов в ходе дифференцировки тканей изменяются.

Дифференциальная транскрипция генов в онтогенезе хорошо заметна при образовании хромосом типа ламповых щеток (см. гл. 4, рис. 4.10, а также гл. 15, рис. 15.10). Петли ламповых щеток, возникающие на стадии диплотены, активно транскрибируются, что хорошо видно на электронно-микроскопических препаратах ооцитов амфибий и птиц.

Другой яркий пример дифференциальной транскрипции связан с образованием так называемых пуфов или колец Бальбиани в гигантских хромосомах двукрылых. Пуфы — это характерные вздутия определенных дисков политенных хромосом, образующиеся в результате локальной декомпактизации в них ДНК, сопровождающейся активной транскрипцией, на что указывает интенсивное включение ^3H -уридина в районе пуфов на препаратах поли-

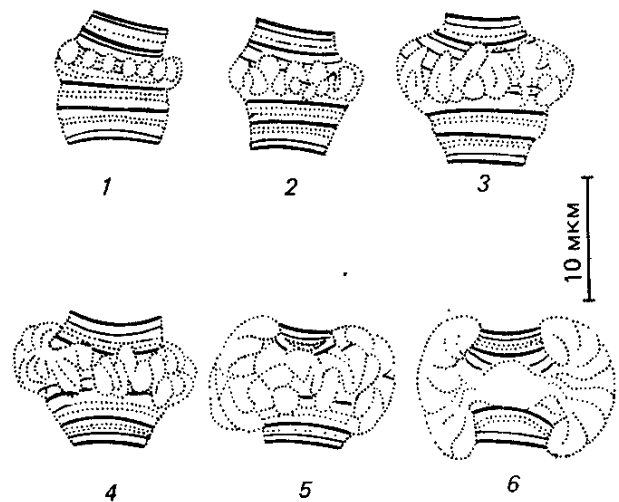


Рис. 16.3. Образование пуфа, или кольца Бальбиани, в политенной хромосоме на последовательных стадиях развития (1—6) личинки хирономуса (по W. Beerman, 1952)

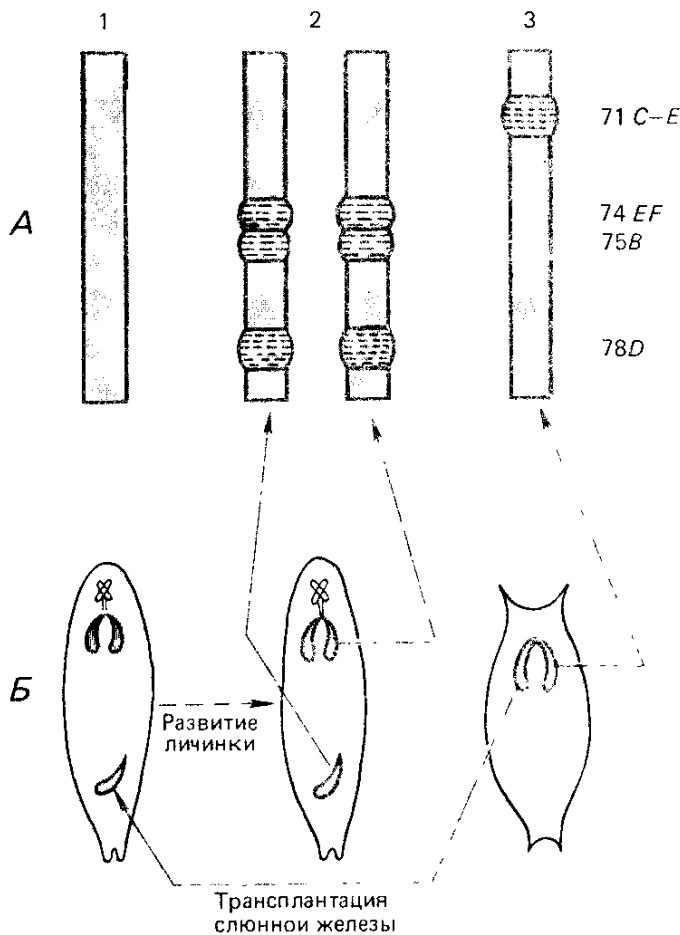


Рис. 16.4. Изменение характера пуфирования в хромосоме *D. melanogaster* в результате пересадок слюнных желез более молодым личинкам (по Н. Becker, 1962, по D. Suzuki et al., 1981). А — пуфы в 3-й хромосоме личинок разных возрастов (1—3). Справа — номера дисков на цитологической карте. Б — трансплантация слюнной железы из более старой в молодую личинку и сравнение характера пуфирования «своих» и «чужих» хромосом при последующем развитии

рипции будут рассмотрены в следующем разделе.

Изменение структуры хроматина, его декомпактизация, наблюдаемая при образовании пуфов, также является одним из условий, обеспечивающих дифференциальную активность генов.

Дифференциальная трансляция, т. е. синтез белка только на определенных иРНК или регуляция синтеза белка на одной и той же иРНК, показана для РНК-содержащих бактериофагов *E. coli*, а также при синтезе глобинов на стабильных иРНК безъядерных ретикулоцитов млекопитающих. В последнем случае показано, что избыток гемина стимулирует синтез глобина. Гемин инактивирует белок, который *репрессирует*, т. е. «запрещает» синтез α - и β -цепей глобина. На этой же модели показано, что некоторые фракции тРНК играют роль *модуляторов*, задающих темп трансляции. тРНК-модуляторы служат лимитирующим фактором в трансляции, «узнавая» какой-либо уникальный кодон иРНК. Гипотеза модулятора была предложена в начале 60-х годов Г. Стентом.

тенных хромосом (рис. 16.3).

Пуфирование тех или иных дисков характерно для стадии развития личинки. Образование и исчезновение пуфов регулирует внутренняя среда организма в соответствии со стадией развития. Если слюнные железы личинки дрозофилы пересаживать более молодым или более старым личинкам, то картина распределения пуфов меняется в соответствии с той, которая характерна для возраста реципиента (рис. 16.4).

Одним из важных регуляторов образования пуфов и, следовательно, дифференциальной транскрипции генов у насекомых являются *стероидные гормоны*, в частности гормон линьки — *экдизон*. Показано также влияние белков, синтезированных более ранними пуфами, на развитие более поздних пуфов. Подробнее механизмы регуляции транскрипции

Возможность дифференциальной трансляции основывается на существовании стабильных иРНК, а также на сохранении иРНК в цитоплазме в виде *информосом* — комплекса иРНК с белками, открытых А. С. Спириным и др. (1966).

Дифференциальное созревание продуктов транскрипции и трансляции. Созревание транскриптов подразумевает модификацию их отдельных оснований и сплайсинг про-иРНК (см. гл. 15). Несколько вариантов сплайсинга одной и той же про-иРНК показаны для обезьяньего вируса SV 40.

Активность многих белков определяется их *пост-трансляционной модификацией* — фосфорилированием, ацетилированием, а в ряде случаев расщеплением исходной полипептидной цепи на более мелкие фрагменты.

Широко распространен механизм регуляции активности ферментов, основанный на присоединении к ним молекул-эффекторов. Чаще всего в роли эффекторов выступают конечные продукты цепей биосинтеза, которые связываются с первым или с одним из первых ферментов данного метаболического пути и подавляют его активность, тем самым выключая всю цепь синтеза. Это *ингибирование конечным продуктом*, благодаря которому регулируются сразу несколько этапов метаболизма. Конечный продукт связывается с ферментом не в его активном центре, а в *аллостерическом центре*, и такое взаимодействие индуцирует изменение (инактивацию) активного центра фермента.

Таким образом, дифференциальная активность генетического материала может обеспечиваться регуляцией разных уровней его экспрессии: от репликации до ферментативной активности белков — генных продуктов.

16.4. Регуляция транскрипции у бактерий. Оперон

Механизм регуляции транскрипции наиболее подробно исследован у прокариот. Ферменты клетки условно делятся на конститутивные, присутствующие постоянно, и адаптивные, появляющиеся в результате изменения среды. К числу адаптивных относятся ферменты утилизации лактозы. В качестве примера конститутивных можно привести ферменты утилизации глюкозы — универсального источника углерода.

Если клетки *E. coli* посеять на среду, содержащую глюкозу как источник углерода, бактерии сразу же начинают его усваивать и активно делиться. Если же поместить их на среду с β -галактозидом — лактозой, то после некоторого периода адаптации к этому сахару бактерии начнут его усваивать и делиться. За этот период происходит индукция сразу трех ферментов: β -галактозидазы, которая расщепляет лактозу на галактозу и глюкозу, *галактозидпермеазы*, транспортирующей галактозиды в клетку, и *транс-ацетилазы*, не участвующей в метаболизме лактозы. Изучение генетического контроля усвоения лактозы позволило Ф. Жакобу и Ж. Моно (1961) сформулировать теорию оперона — основной

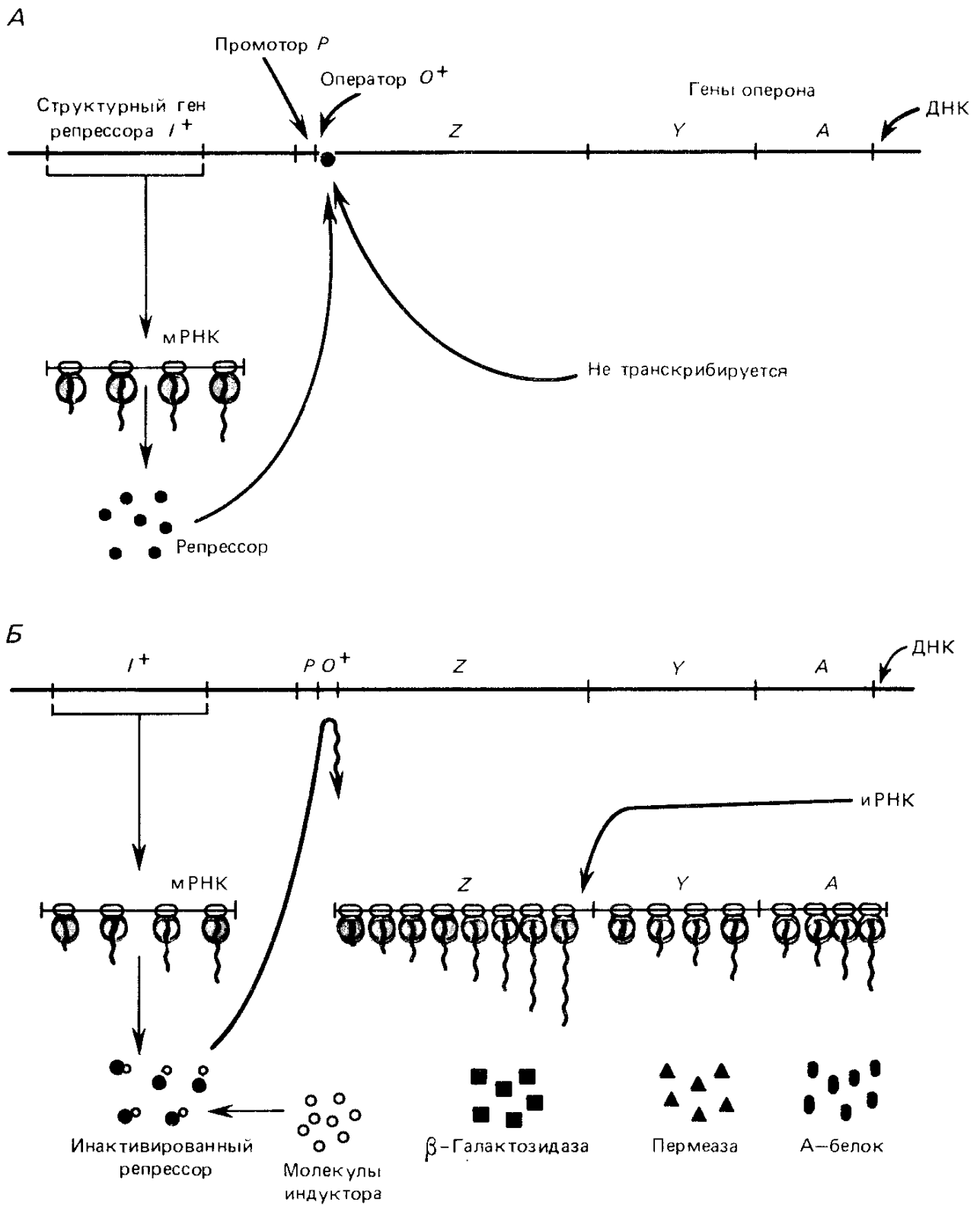


Рис. 16.5. Схема регуляции *lac*-оперона *E. coli* (индуцибельная система негативной регуляции (F. Ayala, J. Kiger, 1980. А — репрессия: репрессор — продукт гена I связывается с оператором и «запрещает» транскрипцию оперона; Б — индукция: молекула индуктора, соединяясь с репрессором, препятствует его связыванию с оператором. Происходит транскрипция оперона

единицы генетического материала, регулируемой на уровне транскрипции у бактерий.

Лактозный оперон *E. coli* (рис. 16.5). Согласно теории Ф. Жакоба и Ж. Моно β -галактозид контролирует синтез трех упомяну-

тых ферментов, которые кодируют три тесно сцепленных гена: *Z* (β -галактозидазу), *Y* (галактозидпермеазу) и *A* (трансацетилазу). Наиболее важными компонентами схемы оперонной регуляции являются: *ген-регулятор* (*I*), кодирующий белок-репрессор, и *оператор* (*O*), к которому имеет сродство *репрессор*.

Оператор и тесно сцепленные с ним структурные гены, находящиеся под его контролем (в данном случае *ZYA*), образуют *оперон*. Ген *I* не входит в состав оперона, хотя и может быть с ним сцеплен.

Свободный репрессор соединяется с оператором и тем самым «запрещает» (репрессирует) транскрипцию оперона. Лактоза, которая в данной системе служит индуктором, взаимодействует с репрессором, в результате чего он уже не может соединиться с оператором. Свободный оператор обеспечивает начало транскрипции всего оперона. РНК-полимераза связывается с промотором (см. гл. 15) и обеспечивает синтез иРНК.

Таким образом осуществляется индукция оперона. Эта схема разработана на основе изучения мутантов с *плейотропным* влиянием сразу на все три фермента, кодируемые *lac*-опероном.

Обычно гены *lac*-оперона очень редко транскрибируются в отсутствие индуктора. Индукция приводит к 1000-кратному повышению активности всех трех белков. Такой же уровень дерепрессии *lac*-оперона наблюдается у так называемых *конститутивных мутантов*, которые делятся на две группы: *i⁻*-мутанты по гену-регулятору и *O^c* — по оператору. Они различаются по проявлению в мерозиготах, которые можно сконструировать, используя *F[']-lac*-эписомы (см. гл. 9). В табл. 16.1 показано, что мутации по регулятору (*i⁻*) рецессивны. Мутации по оператору (*O^c*) обуславливают конститутивное проявление нормального гена *Z* (и других генов оперона) только будучи физически с ним сцепленными, т. е. в *цис*-положении. Такие мутации называют *цис-доминантными*.

Существование этих двух типов мутаций конститутивности хорошо согласуется с предположением о существовании гена-регулятора, продуктом которого является репрессор, способный к диффузии в клетке, и операторного участка, контролирующего считывание (транскрипцию) оперона (рис. 16.5).

С этой схемой согласуется еще один тип *плейотропных мутаций* — так называемые *полярные мутации*. Если такая мутация возникает в гене *Z*, ближе к границе с *O*, то нарушается функция не только ге-

Таблица 16.1. Фенотипы гетерозигот по мутациям (*i⁻* и *O^c*), приводящим к конститутивному выражению генов *lac*-оперона *E. coli* (судя по активности β -галактозидазы)

Генотип	Фенотип
$\frac{i^{-}O^{+}Z^{-}}{I^{+}O^{+}Z^{+}}$	Индуцибельный
$\frac{i^{-}O^{+}Z^{+}}{I^{+}O^{+}Z^{-}}$	»
$\frac{I^{+}O^{c}Z^{-}}{I^{+}O^{+}Z^{+}}$	»
$\frac{I^{+}O^{c}Z^{+}}{I^{+}O^{+}Z^{-}}$	Конститутивный

Примечание. Одна из аллелей гена *Z* несет мутацию, инактивировавшую только β -галактозидазу

на Z, но и Y и A. Если полярная мутация возникает в Y, то функция Z не затронута, а инактивированы будут гены Y и A. Такой полярный эффект указывает на то, что все три гена считываются как единое целое. Полярные мутации идентифицированы как результат возникновения кодона-терминатора. Их эффект объясняется тем, что рибосомы, транслирующие общую молекулу иРНК *lac*-оперона, встречают кодон-терминатор, и это приводит к преждевременной диссоциации транслирующего комплекса.

При использовании ДНК бактериофагов λ , трансдуцирующих *lac*-оперон, было показано, что репрессия и индукция происходят именно на уровне транскрипции. Клетки *E. coli* в состоянии репрессии не содержат ощутимых количеств иРНК, комплементарной *lac*-ДНК. Такая иРНК появляется после индукции.

Репрессор *lac*-оперона, представляющий собой белок-тетрамер, выделен. Субъединица репрессора состоит из 360 аминокислотных остатков. *Lac*-репрессор активно связывается с последовательностью в 24 п. н. (рис. 16.6), имеющей симметричное строение. Симметрия оператора позволяет репрессору «узнавать» его с обоих концов, диффундируя вдоль молекулы ДНК.

Схема регуляции *lac*-оперона, в которой низкомолекулярный эффектор лактоза служит индуктором, носит название *индуцибельной схемы негативной регуляции*. Негативной эта регуляция названа потому, что белок — продукт гена-регулятора, связываясь с оператором, запрещает транскрипцию, т. е. действует негативно на экспрессию генов оперона.

Опероны биосинтеза аминокислот. У *E. coli* и *S. typhimurium* весь путь биосинтеза гистидина контролируют девять тесно сцепленных генов (рис. 16.7), регулируемых по оперонной схеме. При индукции, которая происходит, когда в клетке истощается запас свободного гистидина, все девять генов *His*-оперона транскрибируются на одну молекулу иРНК размером около 10 000 нуклеотидов. Появление избытка гистидина приводит к репрессии *His*-оперона.

Это тоже негативная регуляция, однако в отличие от *lac*-оперона *His*-оперон работает по *репрессибельной схеме*. В данном случае эффектор-гистидин является *корепрессором*. Репрессия биосинтеза гистидина происходит только в его присутствии.

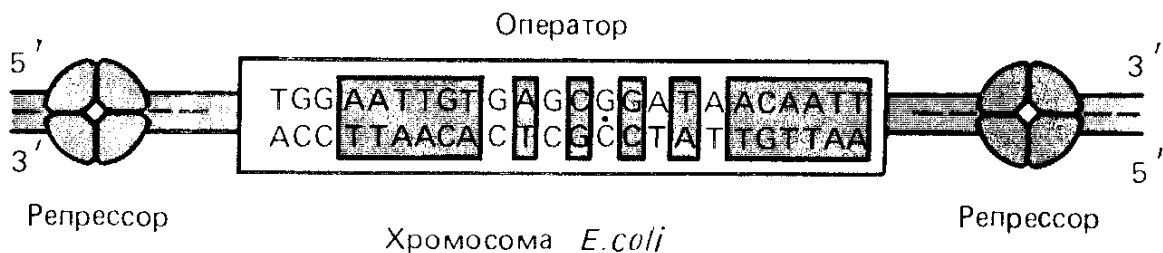


Рис. 16.6. Структура ДНК *lac*-оператора, с которой связывается репрессор (F. Ayala, J. Kiger, 1980).

Молекула — тетрамер белка репрессора узнает оператор, приближаясь к нему с любого конца

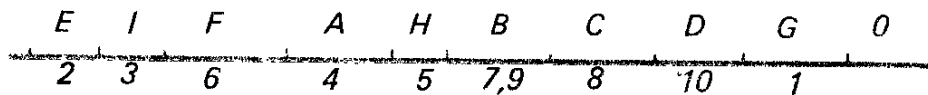


Рис. 16.7. Гены гистидинового оперона (обозначены буквами), контролирующие путь биосинтеза гистидина у *S. typhimurium*. Цифры — этапы биосинтеза гистидина, контролируемые данными генами

Аналогично регулируется *триптофановый оперон E. coli*, включающий пять структурных генов (рис. 16.8). При изучении этого оперона был найден еще один способ регуляции — *аттенюация* (или ослабление). Ч. Яновский, детально исследовавший триптофановый оперон *E. coli*, обнаружил *мутанты-суперпродуценты* ферментов, кодируемых этим опероном. Мутанты несли делеции в самом начале оперона — в так называемом *лидерном участке*, между оператором и иницирующим кодоном первого гена *trpE*. При этом терялась последовательность, содержащая сигнал прекращения транскрипции. Синтез иРНК обычно начинается с лидерной части, но только около 10% молекул иРНК полностью копируют *trp*-оперон. Преждевременное прекращение транскрипции обеспечивает *аттенюатор* — тот участок, который был потерян у делеционных мутантов-суперпродуцентов.

Структура лидерного участка иРНК *trp*-оперона *E. coli* показана на рис. 16.8. Лидер содержит участок связывания рибосомы и кодирует пептид из 14 аминокислот, в котором повторяется (2 раза) остаток триптофана. Кроме того, лидерная иРНК содержит участок вторичной структуры, который, по-видимому, служит сигналом прерывания транскрипции.

Сходные черты строения лидера найдены в фенилаланиновом опероне *E. coli* и гистидиновом опероне *E. coli* и *S. typhimurium*. Лидер *phe*-оперона кодирует пептид из 15 аминокислот, среди которых 7 остатков фенилаланина. Лидер гистидинового оперона кодирует пептид из 16 аминокислот, из них 7 — гистидин. Оба лидера фенилаланинового и гистидинового оперонов образуют такую же характерную вторичную структуру, как и лидер триптофанового оперона.

По-видимому, избыток аминокислоты, синтез которой контролирует оперон, приводит к накоплению соответствующей аминоксил-тРНК, что обеспечивает трансляцию лидерной иРНК, и рибосома, двигаясь вдоль матрицы, разрушает вторичную структуру аттенюатора, делая доступным сигнал терминации транскрипции для ρ -фактора РНК-полимеразы (см. гл. 15). Транскрипция прекращается. Если же аминокислоты не хватает, то трансляция лидера невозможна, и сигнал терминации транскрипции становится недоступным ρ -фактору. Тогда транскрипция продолжается за аттенюатор и образуется целая молекула иРНК оперона. Таким образом, показана тесная связь транскрипции и трансляции в процессе регуляции оперонов биосинтеза аминокислот.

Наряду с негативной регуляцией, или репрессией, показана и позитивная регуляция. В частности, этот механизм продемонстри-

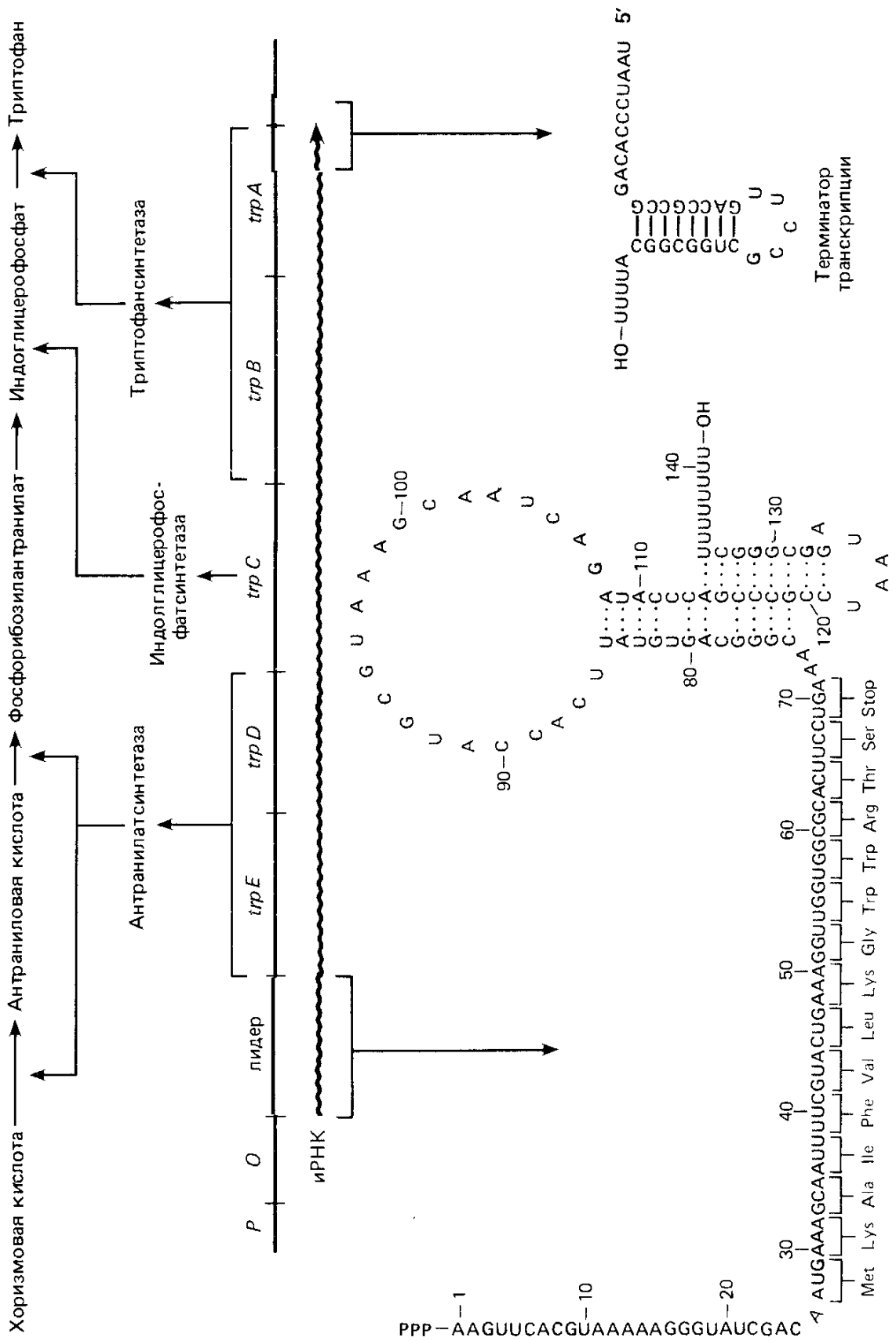


Рис. 16.8. Триптофановый оперон *E. coli*.

Вверху — этапы биосинтеза триптофана, контролируемые генами триптофанового оперона (*trpA* — *trpB*). Внизу слева — вторичная структура участка и РНК; ее конец складывается подобно терминатору транскрипции, который показан справа внизу.

рован для *lac*-оперона *E. coli*. Белок—позитивный регулятор—контролирует различные системы катаболизма, к которым относится и *lac*-оперон. Активность этого белка косвенно регулирует глюкоза, которая блокирует транскрипцию *lac*-оперона даже в присутствии лактозы. Это влияние глюкозы опосредовано циклическим аденозинмонофосфатом цАМФ (рис. 16.9), концентрация которого в присутствии глюкозы снижается.

цАМФ связывается с белком—активатором катаболизма (САР—от англ. catabolite activator protein), его называют также белком-рецептором цАМФ. Комплекс цАМФ-САР связывается с промотором *lac*-оперона и тем самым стимулирует его транскрипцию.

Такой механизм позитивной регуляции показан для оперонов катаболизма, но он неизвестен для оперонов биосинтеза.

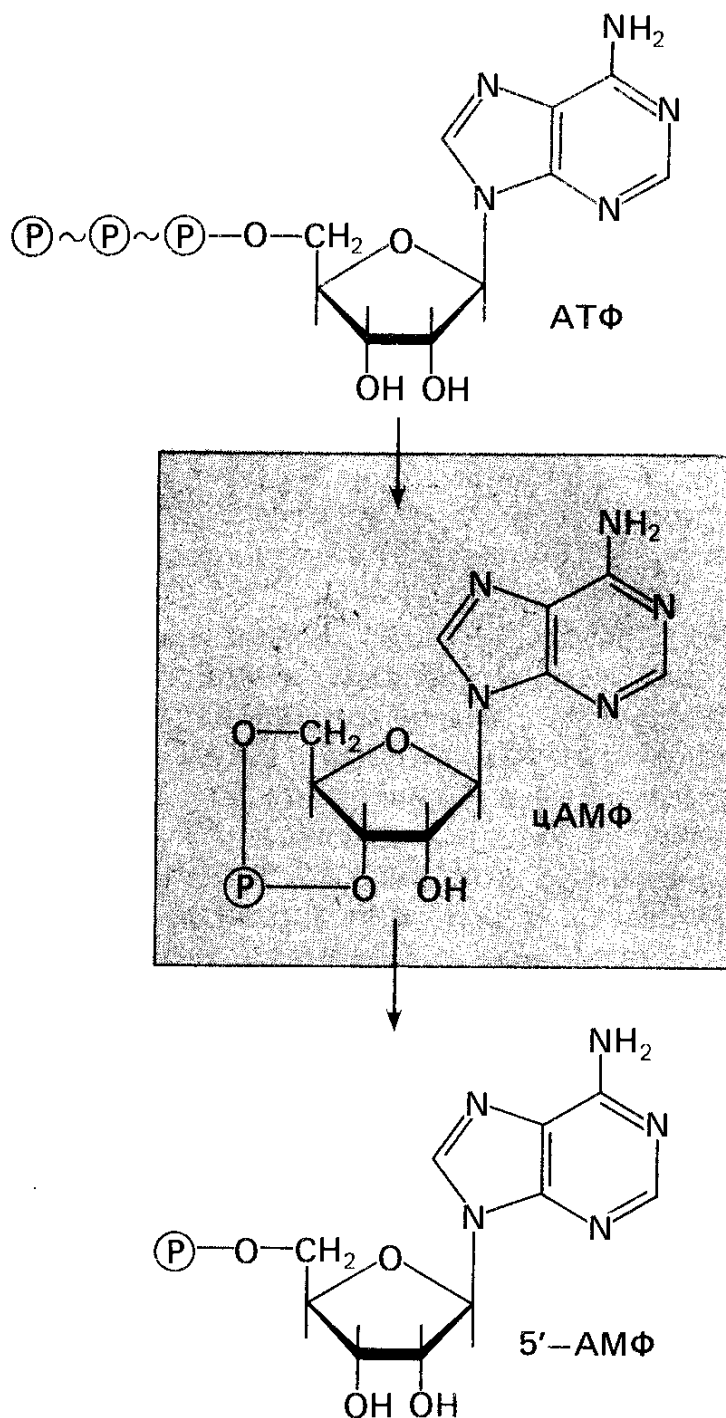


Рис. 16.9. Циклический аденозинмонофосфат, образующийся из АТФ и способный превращаться в 5'-АМФ

16.5. Совсем простые системы. Самосборка

Как уже известно из гл. 6, Х. Френкель-Конрат и Р. Уильямс показали, что инфекционные частицы ВТМ можно собрать из его РНК и субъединиц белка оболочки. Это означает, что возможна правильная самосборка надмолекулярных структур. В отношении ВТМ — это упорядоченная ассоциация молекулы РНК длиной 6400 оснований и 2130 идентичных полипептидов.

Известно, что путем самосборки можно реконструировать та-

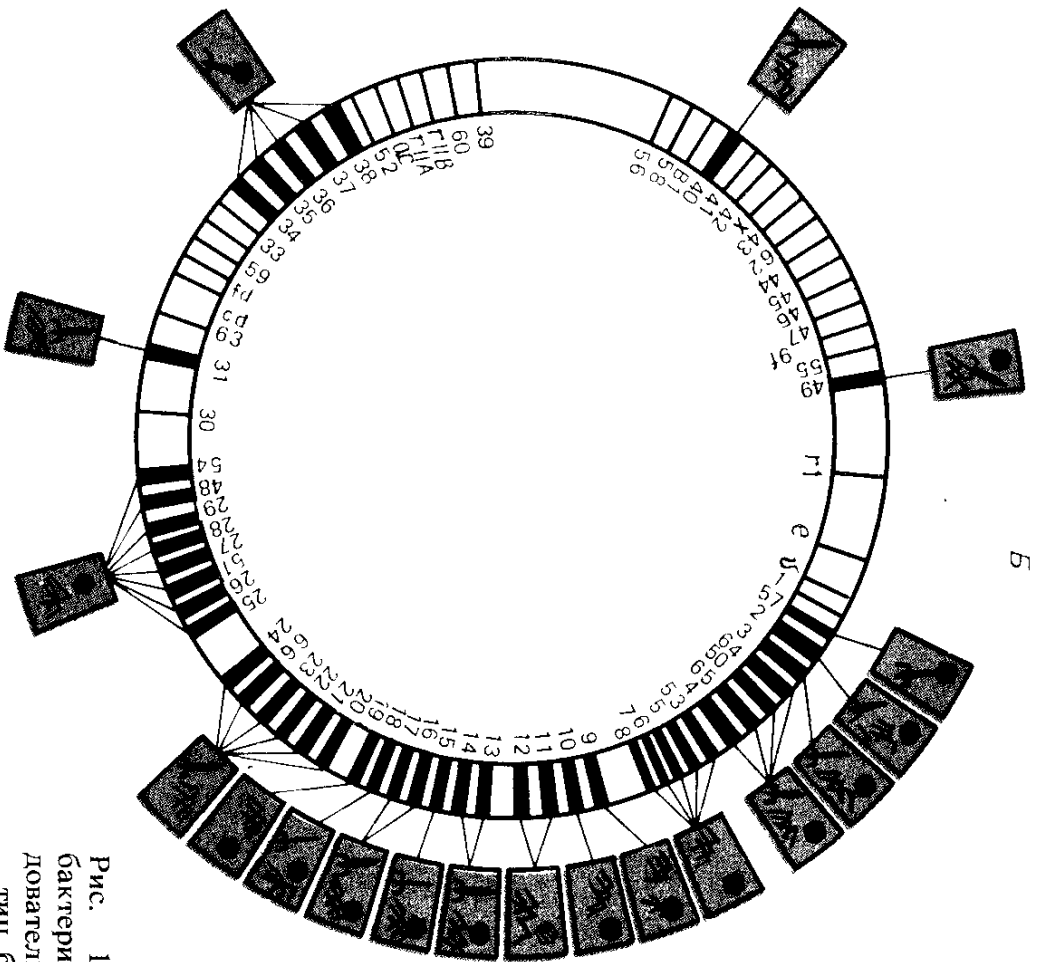
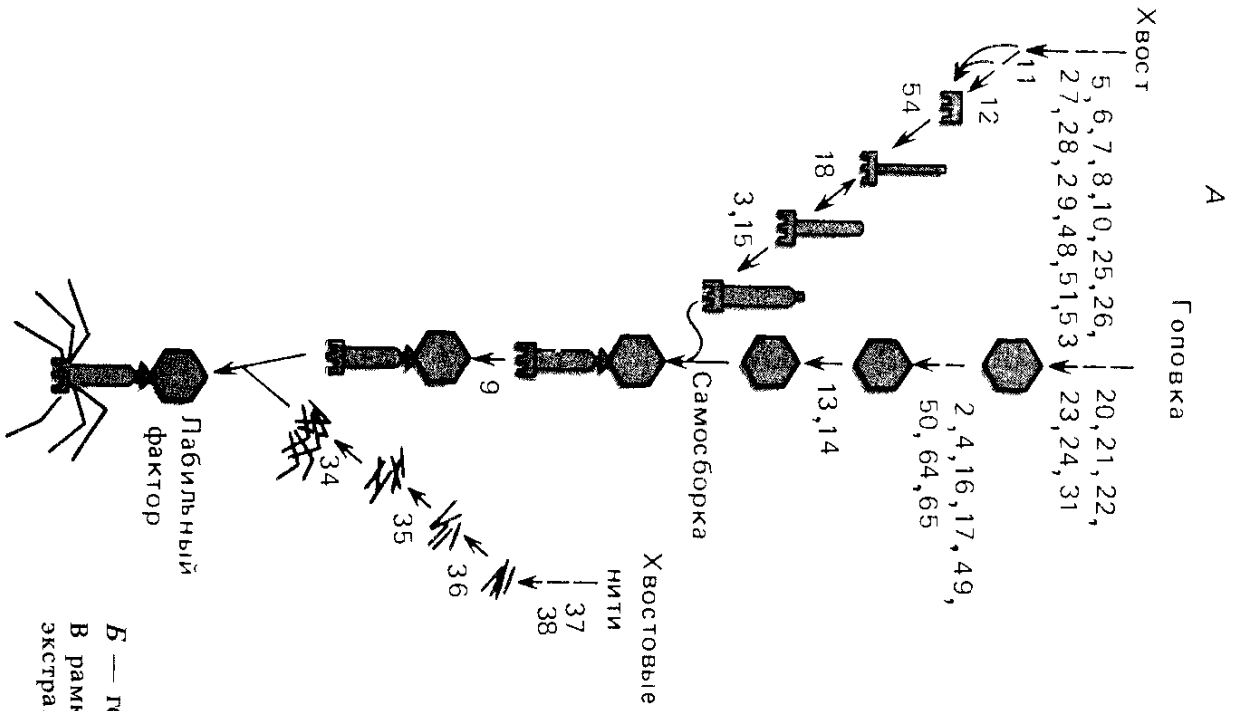


Рис. 16.10. Морфогенез бактериофага. А — последовательность сборки час-тиц бактериофага Т4. Цифры — номера генов, мутации которых прерывают дальнейшее развитие. В рамках показано, какие компоненты фага видны при электронно-микроскопическом исследовании экстрактов клеток, зараженных мутантами по соответствующим генам. Мутации генов 11 и 12 приводят к образованию целой, но нестабильной частицы фага (У. Вуд и Р. Эдгар, 1969)

кие сложные молекулярные агрегаты, как рибосомы, состоящие — даже у бактерий — из трех типов РНК и 55 различных белков (см. гл. 15). Однако этот процесс происходит только в определенной последовательности: сначала одни белки присоединяются к определенным участкам рРНК, затем последующие белки взаимодействуют с образовавшимся комплексом и т. д.

В конце 60-х годов У. Вуд и другие построили временную последовательность сборки частицы бактериофага Т4 на основании исследования генетического контроля этого процесса. Для этого они использовали различные мутанты с дефектами сборки фага. Например, один мутант имеет блок сборки головки, а другой — блок сборки хвоста. Если смешать искусственно полученные лизаты клеток, иницированных такими мутантами, то можно получить целые фаговые частицы, обладающие инфекционной активностью.

Используя такой метод, У. Вуд и другие смогли показать, какие компоненты бактериофага способны к самосборке, а на каких этапах требуется действие генов, управляющих процессом построения частицы бактериофага (рис. 16.10). Многие из этих генов организованы в опероны, которые сгруппированы в нескольких участках генетической карты фага Т4. Казалось бы, уже на уровне биологической организации прокариот и их вирусов выработаны некоторые механизмы регуляции действия гена и генетического контроля морфогенеза. Хотя сборка надмолекулярных структур составляет важный этап внутриклеточного морфогенеза, основные механизмы регуляции действия генов у эукариот работают по-другому.

16.6. Сигналы регуляции транскрипции у эукариот

Регуляция транскрипции по типу оперона характерна для прокариот и их вирусов-бактериофагов. Важной особенностью оперонов бактерий и фагов являются последовательности, состоящие из оператора и следующих за ним структурных генов, транскрибируемых как одно целое. У эукариот такие системы не найдены, хотя у них есть промоторные области. Для генов дрожжей, например, обычна ТАТА — *последовательность Хогнесса*, необходимая для инициации транскрипции. Терминаторы транскрипции — также обязательные элементы эукариотических генов.

Тем не менее координированная регуляция транскрипции даже несцепленных генов известна и у эукариот. Например, в клетках низших эукариот — дрожжей расшифрованы участки ДНК, предшествующие многим генам биосинтеза аминокислот и оснований. Наличие такой последовательности: 5'-TGACTC-3' (или близкой к ней) необходимо для регулирования биосинтеза аминокислот. Как показали эксперименты с локусом HIS4 *Sacch. cerevisiae*, делеции этого участка, локализованного в некодирующей области перед началом транскрипции, делают транскрипцию нерегулируемой.

По-видимому, присутствие повторов такого рода перед несколькими генами — необходимое условие их координированной регуляции, которая наблюдается у многоклеточных при действии многих гормонов. Известно также, что посредником в регуляторном действии гормонов служит цАМФ.

Наряду с обычными нуклеотидными последовательностями промоторной и терминаторной областей транскрипции у эукариот обнаружены такие специфические элементы регуляции, как усилители, или энхансеры (*enhancers*), и глушители (*silencers*). Энхансеры впервые были найдены в геноме вируса SV 40. Это последовательность длиной в 72 п. н., повторенная тандемно. Она повышает эффективность транскрипции с промоторов вируса, находясь на своем обычном месте, вблизи *ori* — начала репликации вирусного генома, а также при искусственном перенесении в другие участки этого генома, имеющего размер 5243 п. н. Аналогичные энхансеры обнаружены в геноме млекопитающих. У них отсутствует видимая протяженная гомология. Они действуют как усилители транскрипции, находясь на расстоянии нескольких сот и даже тысяч пар нуклеотидов от регулируемого гена. Механизм действия энхансеров может быть связан с изменением нуклеосомной структуры хроматина.

Другой тип сигналов регуляции транскрипционной активности у эукариот — *глушители* — обнаружены у *Sacch. cerevisiae*. Это последовательность длиной 262 п. н., которая содержит участок, гомологичный ARS — началу репликации (см. гл. 6). Располагаясь в нескольких сотнях пар нуклеотидов до или после регулируемого гена, она выключает транскрипцию, изменяя структуру хроматина. Показано, что глушитель, функционируя, взаимодействует с продуктами нескольких генов, мутации в которых делают глушитель неактивным и тем самым «разрешают» транскрипцию с промотора регулируемого гена.

Наиболее подробно изучена регуляция генов, контролирующих усвоение галактозы и синтеза изозимов кислых фосфатаз у *Sacch. cerevisiae*. Показано, что эти системы регуляции действуют как на уровне транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне. При этом осуществляется многоступенчатая, или *каскадная, регуляция*, в которой участвуют элементы позитивного и негативного контроля, последовательно регулирующие активность друг друга. Целостная схема регуляции действия гена у эукариот пока не построена ни для одной системы.

16.7. Детерминация и дифференцировка

Различные регуляторные сигналы, обеспечивающие включение и выключение генов, по-видимому, представляют собой важную составную часть механизма дифференцировки клеток. *Дифференцировка клеток*, или их *онтогенетическая дивергенция*, происходит на основе детерминации определенного клеточного типа. *Детерминация* — это *установление функционального состояния,*

ведущего к определенному процессу развития, к дифференцировке в определенном направлении.

Состояние детерминации, наследуемое при митотических делениях клетки, изучено у *D. melanogaster*.

После оплодотворения ядро зиготы у дрозофилы делится несколько раз, и только после 12 делений ядра обособляются на периферии яйца в самостоятельные клетки, формирующие *бластодерму*. Эти клетки уже детерминированы к развитию различными путями, и личинка дрозофилы, появляющаяся из яйца, уже содержит не только личиночные клетки, но и клетки имаго — взрослого насекомого. Эти клетки по мере роста личинки (и последовательных линек) делятся и образуют так называемые *имагинальные диски*. Судьба клеток этих дисков уже predetermined (рис. 16.11).

В том, что состояние детерминации наследуется при митотических делениях, можно убедиться, пересаживая имагинальные диски в брюшко взрослой мухи. При этом дифференцировка имагинальных дисков не происходит. Если после серии таких последовательных трансплантаций имагинальный диск пересадить в полость тела личинки, готовой к окукливанию, то взрослая муха будет иметь дополнительный орган: глаз, крыло, ногу и т. д. в соответствии с тем, какой имагинальный диск был взят исходно.

Состояния детерминации, устанавливаемые еще на стадии бластодермы у дрозофилы, нарушают так называемые *гомеозисные мутации*. К их числу относятся: *antennapedia* — превращение антенн в ноги (рис. 16.12); *ophthalmoptera* — развитие крыла из

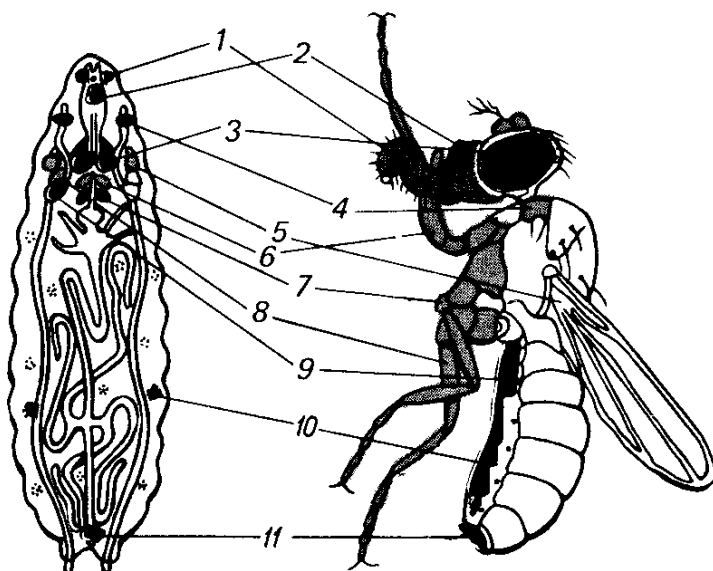


Рис. 16.11. Имагинальные диски личинки *D. melanogaster* и образуемые ими в период окукливания органы взрослого насекомого (имаго). (Nothiger, 1972, по F. Ayala, J. Kiger, 1980):

1 — верхняя губа, 2 — наличник, 3 — глаз и антенна, 4 — плечо, 5 — крыло и грудь, 6 — первая нога, 7 — вторая нога, 8 — третья нога, 9 — жужжальце (гальтер), 10 — брюшко, 11 — гениталии

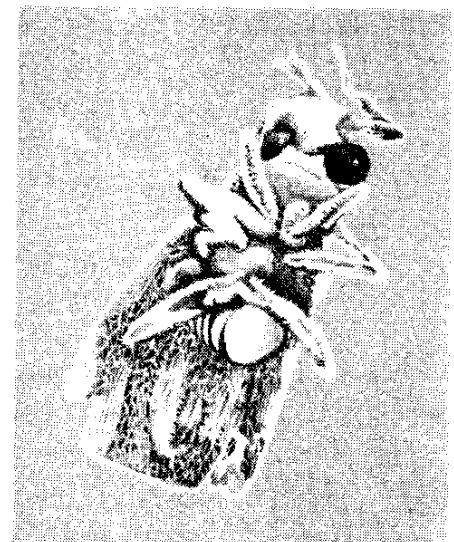


Рис. 16.12. Мутация *Antennapedia* у *D. melanogaster* превращает часть антенны в структуры, характерные для ноги

имагинального диска глаза; proboscipedia — развитие ноги или части антенны (в зависимости от температуры) вместо хоботка; у мутантов tumorous head ткани головы замещаются другими типами тканей, включая структуры, характерные для гениталий, и т. д. У гомеозисных мутантов нарушен сам процесс детерминации дисков, что и приводит в дальнейшем к ошибкам дифференцировки. Гомеозисные мутанты дрозофилы — удобная модель для изучения детерминации.

Благодаря клонированию гомеозисных генов и *гибридизации ДНК-ДНК* из разных источников показано, что все исследованные гомеозисные гены дрозофилы содержат участок одинаковой нуклеотидной последовательности, названной *гомеодоменом*. Гомологичные последовательности найдены в ДНК амфибий, мышей, че-

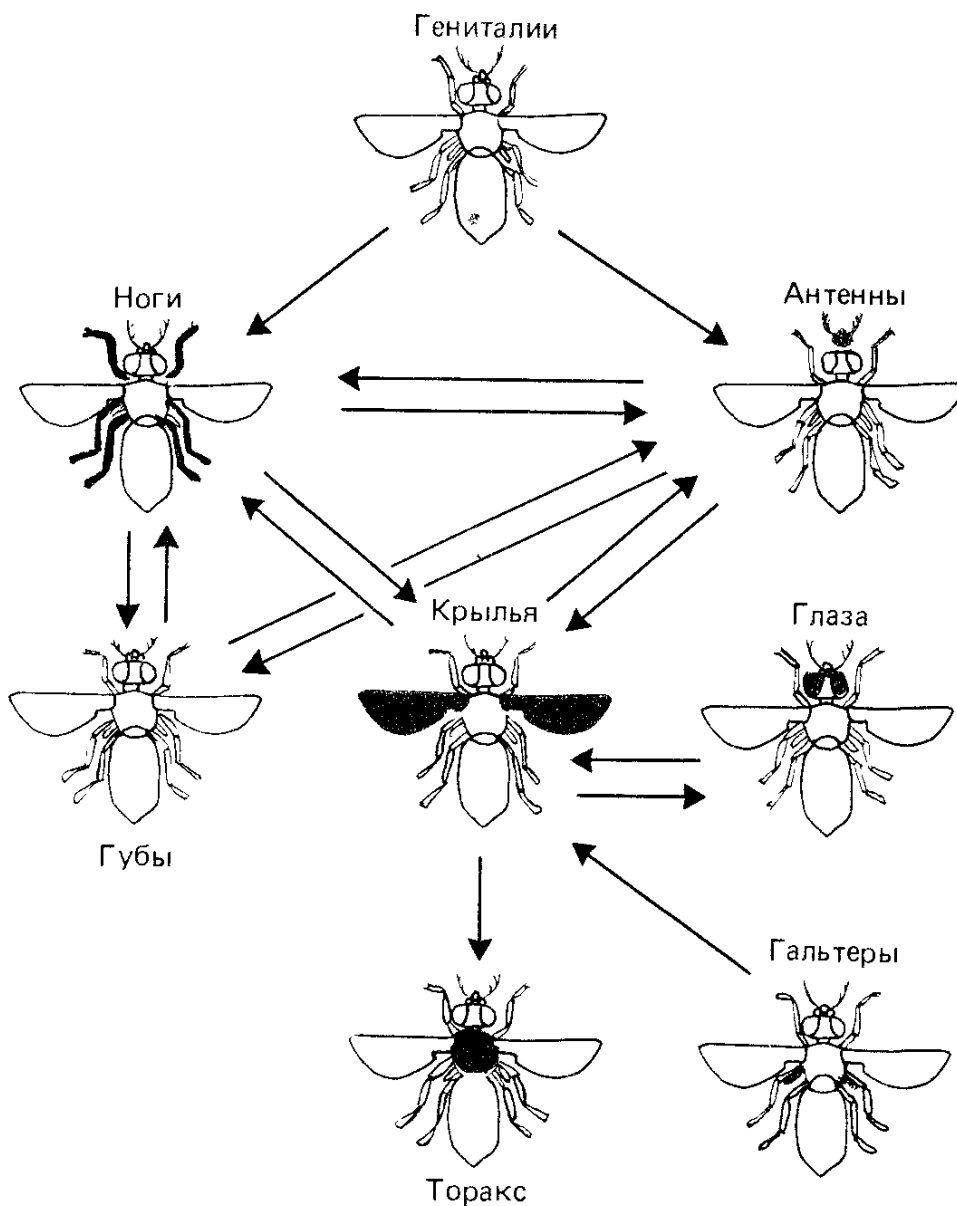


Рис. 16.13. Типы трансдетерминации имагинальных дисков *Drosophila* (из E. Hadorn, 1968, по D. Suzuki et. al, 1981).

Красным цветом показаны структуры, развивающиеся у взрослых мух из трансплантируемого диска. Стрелки — направления трансдетерминации

ловека и в локусе типов спаривания у дрожжей. Продуктом их является белок или пептид, связывающийся с ДНК и выполняющий регуляторные функции.

Другой пример нарушения детерминации, обнаруженный у дрозофилы, заключается в том, что иногда в процессе трансплантации через брюшко взрослых мух клетки имагинального диска трансдетерминируются. *Трансдетерминация* выражается в том, что, например, имагинальный диск гениталий после превращения в окукливающейся личинке дифференцируется не в половой аппарат, а в ногу. Трансдетерминация не происходит случайно, а следует определенным закономерностям. Например, имагинальный диск гениталий может превратиться в диск ноги, но никогда не превращается непосредственно в диск глаза (рис. 16.13). Механизм этого явления еще не выяснен, однако уже показано, что трансдетерминация осуществляется в тех же направлениях, что и гомеозисные мутации, т. е. трансдетерминация — это *фенокопии* гомеозисных мутаций.

16.8. Позиционная информация и картирование бластодермы у дрозофилы

Судьба клеток бластодермы, образующихся в результате первых делений дробления в яйце дрозофилы, т. е. детерминация, зависит от их положения по отношению к длинной оси яйца. В то же время дифференцировка пола у дрозофилы автономна и в каждой клетке определяется соотношением половых хромосом и аутосом (см. гл. 5). Как уже известно (гл. 5), зиготы XX, из которых должны развиваться самки, могут потерять X-хромосому при первом делении ядра, и тогда развиваются билатеральные *гинандроморфы*, у которых одна половина тела женская (XX), а другая — мужская (XO). Если исходная зигота была гетерозиготна по нескольким генам X-хромосомы ($y\ ct\ B/y^+\ ct^+\ B^+$), то две половины тела будут различаться по ряду признаков: окраске тела — у, форме крыльев *ct*, форме глаз — *B* и т. д.

Некоторые мутации или перестройки X-хромосом повышают частоту потерь одно-

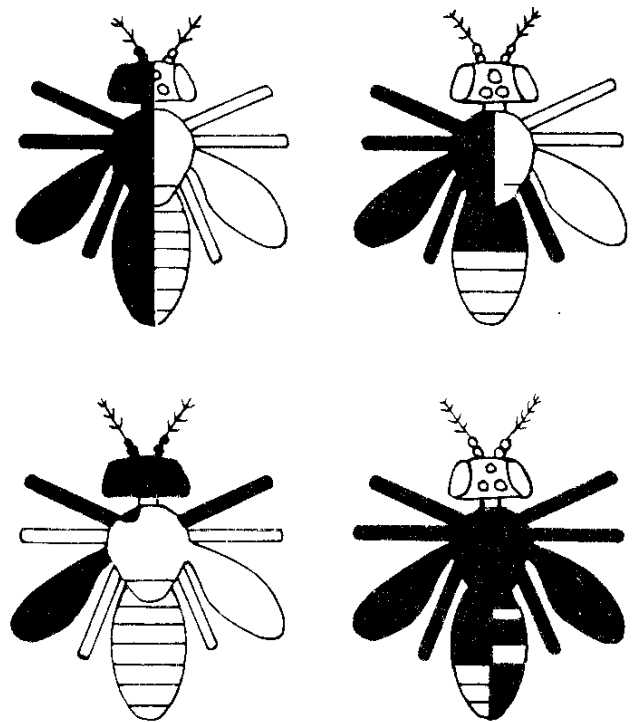


Рис. 16.14. Различные гинандроморфы (мозаики) *D. melanogaster* (по Y. Hotta, S. Benzer 1973).

Женские части тела (окрашенные) образуют клетки XX. Мужские (светлые) — XO (см. текст)

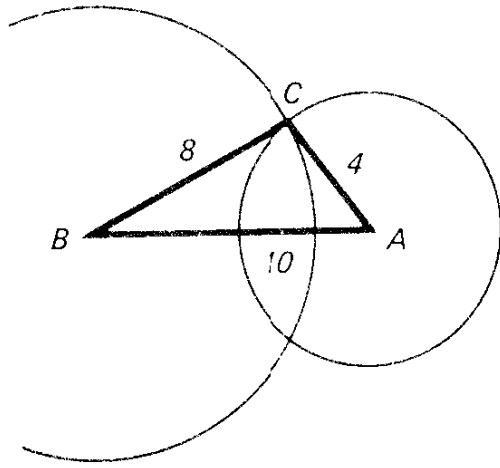


Рис. 16.15. Иллюстрация принципа, используемого при картировании зачатков на бластодерме *D. melanogaster*. Пояснения в тексте

го из гомологов, например, гетерозигота по нормальной и кольцевой X-хромосоме с повышенной частотой теряет кольцевую X-хромосому. Такие потери могут происходить не только при первом делении ядра зиготы, но и на более поздних стадиях. В результате могут появиться мозаики, тело которых различным образом четко разделяется на женские и мужские участки (рис. 16.14).

В 1929 г. А. Стертевант предложил метод *картирования зачатков клеток бластодермы*, которые в дальнейшем дают начало тем или иным структурам взрослого насекомого. В качестве меры при

таком картировании А. Стертевант предложил использовать частоту, с которой граница мужских (ХО) и женских (ХХ) тканей разделяет исследуемые органы имаго. В 1969 г. А. Гарсиа-Беллидо и Дж. Мерриам этот метод применили для построения карты бластодермы дрозофилы, показав расположение на ней клеток-предшественников различных органов мушки.

Подходы к картированию зачатков (клеток бластодермы) и к картированию генов (последний тоже был предложен А. Стертевантом) сходны. Разница только в том, что гены картируют на линии, а зачатки — на плоскости, которая символизирует развернутую поверхность бластодермы. Если у трех органов А, В и С частота разделения А и В границей тканей ХО и ХХ у мозаик составляет 10%; В и С — 8%, а А и С — 4%, то относительное расположение зачатков А, В и С определяется вершинами треугольника со сторонами 10, 8 и 4 стёрта. *Стёрт* — это единица картирования, соответствующая 1% частоты разделения исследуемых органов у мозаиков границей между тканями ХО и ХХ. Очевидно, что на основе данных, полученных только для трех органов, точки А, В и С нельзя расположить однозначно. Каждая вершина треугольника может занимать два симметричных положения, как это показано для точки С на рис. 16.15. Правильное положение выбирается на основе привлечения большего числа картируемых структур.

Построенная карта бластодермы дрозофилы показана на рис. 16.16. Конструирование такой карты было возможно только потому, что положение того или иного ядра в общей структуре бластодермы определяет его дальнейшую судьбу. Говоря иначе, в яйце содержится *позиционная информация*, которая играет решающую роль в детерминации ядер, а затем и клеток бластодермы.

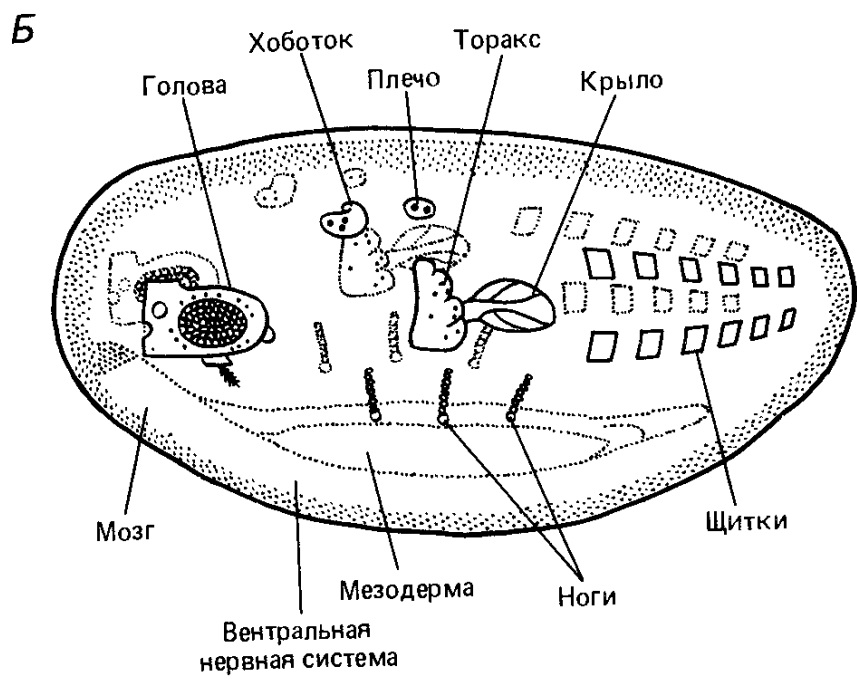
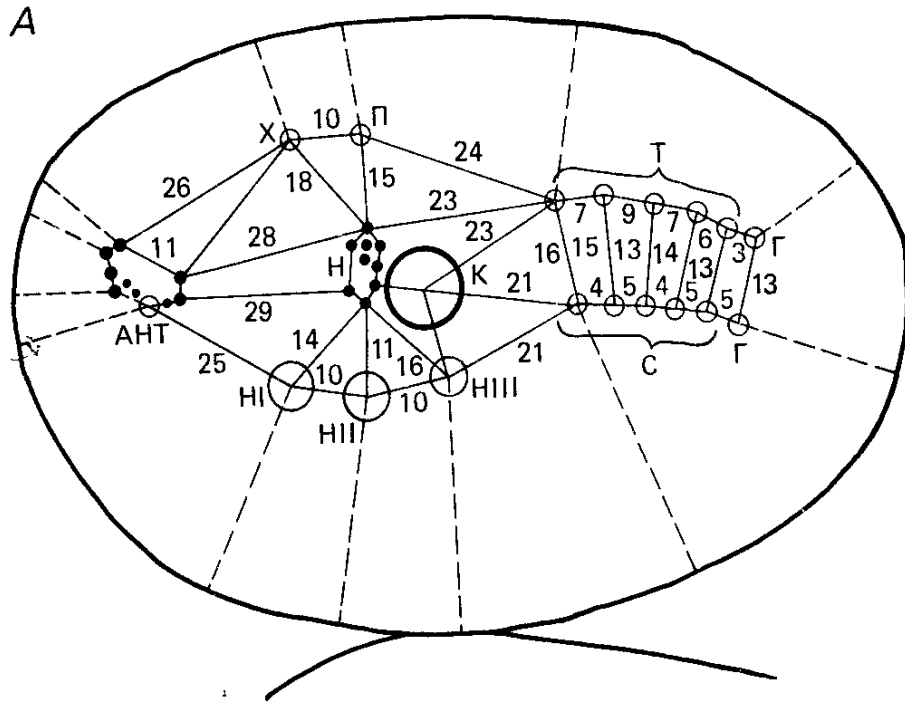


Рис. 16.16. Карта зачатков бластодермы *D. melanogaster* (по Y. Notta, S. Benzer, 1973). А — показано расположение клеток, которые затем разовьются в органы взрослого насекомого. Расстояния выражены в стертах. Пунктир — расстояние до ближайшей средней линии. Карта показана как бы изнутри бластодермы. Сокращения: АНТ — антенны, X — хоботок, НI, НII, НIII — первая, вторая и третья ноги, К — крыло, П — плечо, Н — нотум; Т — тергиты, С — стерниты — брюшные щитки, Г — гонады,

Б — та же карта, изображенная в более «реалистической манере»

16.9. Значение цитоплазмы

По-видимому, главная роль в детерминации ядер бластодермы принадлежит *периплазме* — кортикальному слою яйца. Это подтверждают эксперименты по влиянию УФ-излучения на кортикальный слой заднего полюса яйца. Если облучение проводить на стадии 2—20 мин (возраст эмбриона), когда в соответствующем участке яйца еще нет ядер и бластодерма еще не образовалась, то итогом будут стерильность взрослых особей и нарушение гаметогенеза. Если в облученное таким образом яйцо дрозофилы впрыснуть полярную плазму из необлученного яйца, то детерминация гонад восстанавливается и мухи будут фертильными.

Роль цитоплазмы яйца в детерминации зачатков имагинальных структур демонстрирует изучение мутации *bicaudal*, летальной на поздней стадии куколки у *D. melanogaster*. У мутанта образуются два симметрично расположенных брюшка: одно — назад, другое — вперед. Наследование этой ядерной мутации обнаруживает *материнский эффект* (см. гл. 10).

Показана роль цитоплазмы в проявлении у дрозофилы плейотропной мутации *rudimentary (r)*, которая приводит к нарушению развития крыльев и стерильности самок. Яйца, отложенные гомозиготными самками (*r/r*), погибают в позднем эмбриогенезе. Если же в такие яйца до стадии бластодермы впрыснуть цитоплазму из нормальных, неоплодотворенных яиц, то развитие идет нормально и мухи достигают стадии имаго. Аналогично можно восстановить развитие стерильных яиц, откладываемых мутантом *deep orange (dor)*.

Аналогичный эффект показан и для мутации *o* (*ova deficient* — дефектные яйца) у мексиканского аксолотля. Гомозиготные самки *o/o* откладывают яйца, не способные к нормальному развитию. Гибель эмбрионов наступает до стадии гастролы. Ядра таких эмбрионов не приступают к синтезу РНК. Развитие нормализуется, если в яйца, откладываемые самками *o/o*, ввести цитоплазму из яиц или нуклеоплазму из овоцитов нормального типа.

Некоторые мутации, обнаруживающие материнский эффект в наследовании, блокируют сам процесс миграции ядер при образовании бластодермы. Например, мутация *grandchildless* — отсутствие внуков, блокирует миграцию ядер в задний конец яйца, где в полярной плазме происходит детерминация гонад. В результате полярные клетки, дающие начало имагинальным дискам гонад, не образуются и мухи оказываются стерильными. Таким образом, гомозиготная по этой мутации исходная самка фертильна, а ее потомство — стерильно. Отсюда и название мутации — отсутствие внуков (у гомозиготной мутантной самки).

Таким образом, роль цитоплазмы в детерминации ядер и клеток несомненна. В некоторых случаях даже удастся выяснить, какое конкретное соединение требуется для восстановления нормальной активности цитоплазмы, дефектной в отношении детерминации. Например, в упомянутом случае гомозигот по мутации

rudimentary (*r*) такими соединениями являются пиримидиннуклеозиды. Локус *r* контролирует синтез уреидосукцината — одного из предшественников пиримидинов. Мутации, описанные в этом разделе, маркируют гены, контролирующие формирование структуры цитоплазмы яйца, которая и несет позиционную информацию о дальнейшей детерминации ядер.

16.10. Перестройки генетического материала при детерминации клеточных типов у дрожжей

Один из немногих (если не единственный) примеров детерминации, механизм которой исследован достаточно подробно, касается определения клеточного типа (*типа спаривания*) у дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Это один из примеров, доказывающий возможность перестройки генетического материала в онтогенезе.

Как уже упоминалось, у гомоталлических дрожжей гаплоидные аскоспоры — продукты мейоза — дают начало диплоидным культурам (см. гл. 8). Это осуществляется благодаря *переключению типов спаривания* $a \rightleftharpoons \alpha$ с вероятностью, близкой к единице при первых делениях прорастающей аскоспоры. Переключение происходит согласно так называемому *кассетному механизму*, предложенному в конце 70-х годов А. Херсковичем, Дж. Хиксом и Дж. Стразерном. Наряду с локусом типов спаривания (MAT) вблизи центромеры III хромосомы у дрожжей есть две молчащие «кассеты», содержащие неэкспрессируемые аллели в левом плече (HML _{α} — для α -типа спаривания) и в правом плече (HMR _{α} — для a -типа спаривания) той же хромосомы.

При первых делениях аскоспоры тип спаривания переключается на противоположный под контролем гена *HO* (от англ. homothallism). Ген *HO* кодирует эндонуклеазу, которая производит двунитевой сайт-специфический разрез ДНК в локусе MAT _{α} или MAT _{a} в зависимости от того, какая аллель присутствует в этом локусе. Двунитевой разрез инициирует *направленную конверсию*, при которой генетическая информация кассеты HML _{α} замещает информацию, содержащуюся в локусе MAT _{a} (или HMR _{α} замещает информацию MAT _{α}). При этом кассеты сохраняют содержащийся в них генетический материал, а генетический материал, находившийся в локусе MAT, теряется. Такое переключение происходит только в двух клетках на стадии микроколонии, состоящей из четырех клеток. После этого клетки типа спаривания *a* копулируют с клетками типа спаривания α . Образуются диплоидные клетки, гетерозиготные по MAT _{a} /MAT _{α} , и ген *HO* выключается. Далее гетерозиготный диплоид стабильно размножается до нового мейоза и споруляции, после чего при изоляции аскоспор весь процесс в ходе их прорастания повторяется.

Как показали эксперименты по клонированию и гибридизации ДНК-ДНК (см. рис. 16.17), локус MAT и кассеты HML _{α} и HMR _{α} содержат как одинаковые, так и различающиеся нуклеотидные последовательности. Как MAT _{a} , так и MAT _{α} образуют

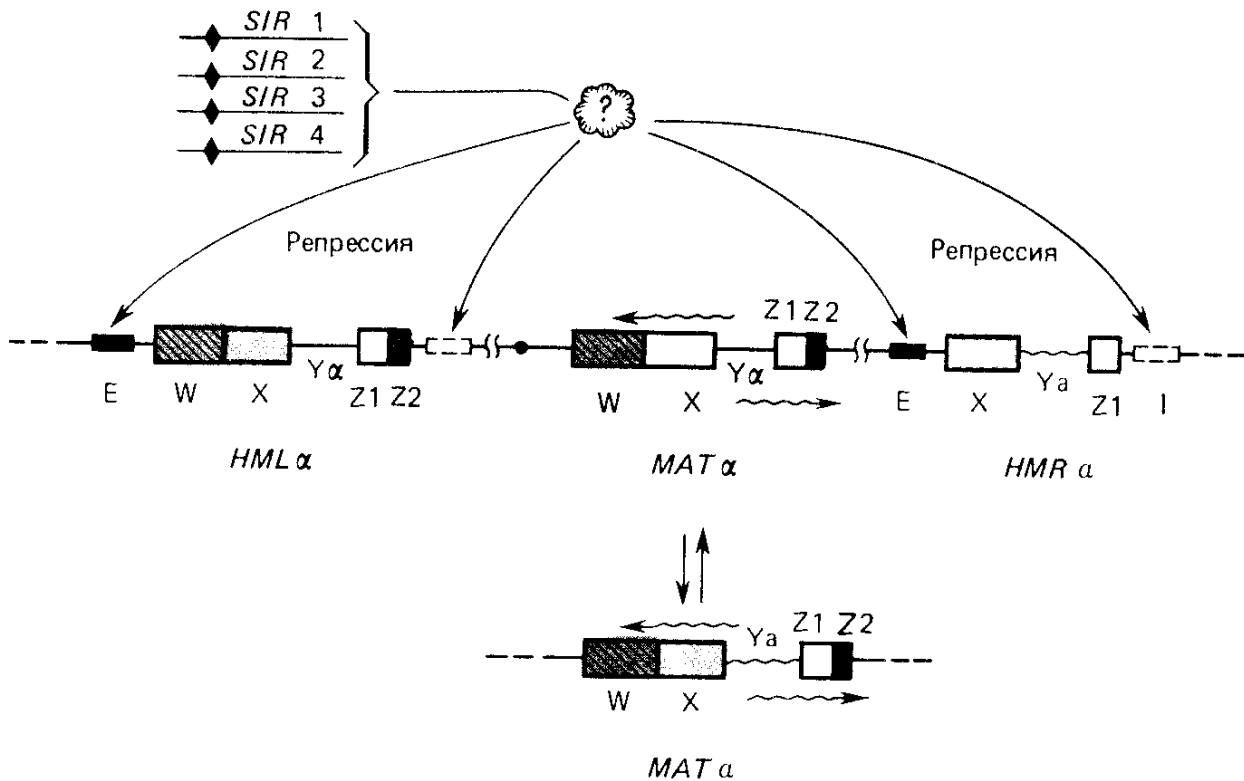


Рис. 16.17. Структура кассет и локуса MAT у дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Одинаковые последовательности (X, Y, Z) даны одинаковым цветом. E и I — глушители. Волнистые линии — транскрипты. Гены *SIR* контролируют репрессию кассет. Остальные пояснения в тексте

по два противоположно направленных транскрипта, при этом установлено, что по крайней мере в случае MAT_{α} транскрипция правого ($\alpha 1$) и левого ($\alpha 2$) участков происходит с общего промотора размером в 10 п. н., расположенного между ними:



Информация, заключенная в кассетах, не экспрессируется вследствие того, что каждая из них фланкирована последовательностями — «глушителями», влияющими на характер компактизации хроматина в кассетах. Глушители функционируют под контролем нескольких генов, названных *SIR* (silent information regulators — регуляторы молчащей информации), локализованными в других хромосомах. Около локуса MAT глушителей нет.

Собственно, переключение информации локуса типа спаривания, т. е. перемещение кассеты, и представляет собой акт детерминации клеточного типа. Последующая дифференцировка типа спаривания заключается в специфической регуляции целых серий генов: α -специфических или α -специфических. По мнению авторов кассетной модели, подобные многоступенчатые взаимодействия регуляторных и структурных генов могут обеспечивать достаточно сложные акты детерминации у многоклеточных организмов.

Сходный механизм кассетной регуляции типов спаривания найден у другого рода дрожжей — *Schiz. pombe*. Кассетный меха-

низм участвует в переключении *поверхностных антигенов трипаносом* и гонококков. Жизненный цикл гомоталлических сахаромикетов весьма сходен с жизненным циклом мхов и лишайников. Таким образом, кассетный механизм регуляции онтогенетических изменений, по-видимому, широко распространен в природе.

Конечно, в данном случае дрожжи-сахаромикеты следует рассматривать только как удачную модель для изучения онтогенетических изменений на клеточном уровне. Возможно, сходство между низшими и высшими эукариотами гораздо глубже, чем это представляется. Так, *гомеодомен*, обнаруженный в ДНК гомеозисных генов дрозофилы, гомологичен именно концевым участкам транскриптов $\alpha 1$ и $\alpha 2$ локуса $MA T_{\alpha}$.

16.11. Перестройки генетического материала при дифференцировке лимфоцитов

Еще один пример перестройки генетического материала в онтогенезе — *дифференцировка лимфоцитов* при развитии системы иммунитета у позвоночных животных и человека.

Антитела, вырабатываемые иммунной системой, связывают попадающие в организм чужеродные белки, полисахариды и ряд других соединений, которые называются *антигенами*. Млекопитающие могут продуцировать до 10^6 различных антител. «Узнавание» антигенов обеспечивают два основных класса *лимфоцитов* — клеток, образующихся в костном мозге: *T-лимфоциты*, локализованные в зубной железе (тимусе), и *B-лимфоциты*, дифференцирующиеся в селезенке и лимфоидных органах.

Биосинтез антител осуществляют B-лимфоциты, взаимодействующие с T-лимфоцитами. Антиген связывается с рецепторами на поверхности как B-, так и T-лимфоцитов, после чего T-лимфоцит «разрешает» B-клеткам синтез иммуноглобулинов, т. е. антител. Поражает воображение способность лимфоцитов реагировать на огромное число антигенов и «запоминать» каждый из них так, что при повторном их попадании в организм эффективно образующиеся иммуноглобулины связывают именно этот антиген. Генетический контроль иммунного ответа изучает область генетики, названная *иммуногенетикой*.

Каждая молекула иммуноглобулина — это димер, состоящий из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей (рис. 16.18). Известно злокачественное образование иммунной системы — *миелома*, при которой происходит размножение клеток, продуцирующих антитела только одного типа. Сравнение иммуноглобулинов из разных миелом мышей и человека показало, что как H- так и L-цепи имеют константные и переменные участки (рис. 16.18). Центр связывания антигена образуют переменные участки H- и L-цепей.

Загадка сосуществования константных и переменных участков в одной и той же полипептидной цепи была разрешена в

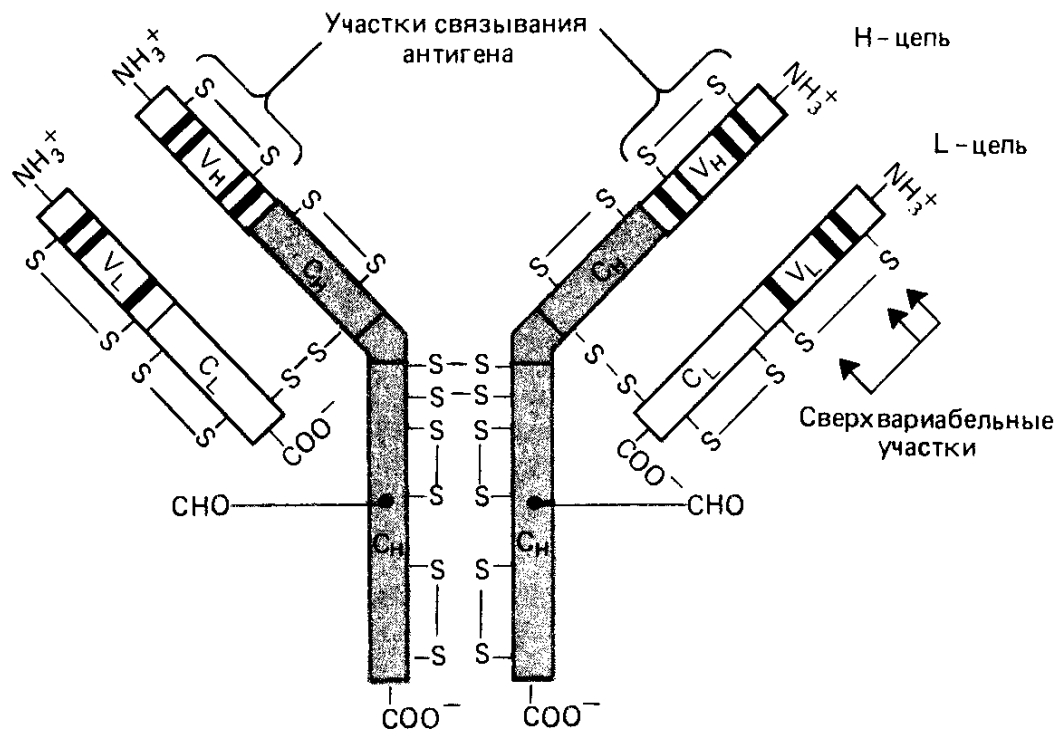


Рис. 16.18. Схема строения молекулы человеческого иммуноглобулина. V и C — переменные и константные участки полипептидных цепей. H и L — тяжелые и легкие цепи

конце 70-х годов С. Тонегавой. Он показал, что фрагменты ДНК, кодирующие V- и C-участки, расположенные в виде непрерывных последовательностей в геноме мышинной миеломы, пространственно разделены у эмбрионов или в сперматозоидах мыши. Отсюда

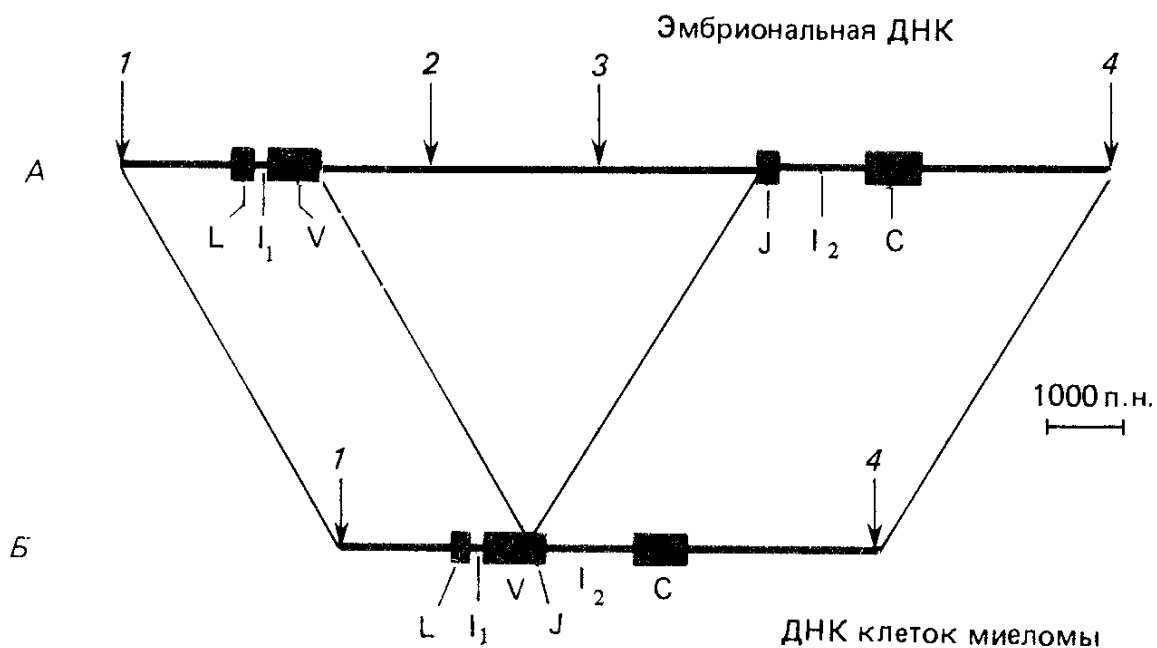


Рис. 16.19. Расположение участков ДНК, кодирующих λ -легкие цепи иммуноглобулинов в эмбрионе (А) и миеломе (Б) мыши:

1 — 4 — сайты рестрикции *EcoRI*, иРНК легкой цепи содержат лидер (L), участок, кодирующий переменную цепь (V и T.), и участок, кодирующий константную цепь (C), ДНК миеломы сохраняет только сайты рестрикции 1 и 4 и включает два интрона I₁ и I₂

следовало, что в ходе дифференцировки лимфоцитов гены, кодирующие V- и С-участки, перестраиваются таким образом, что в итоге они оказываются частями одного и того же гена, транскрибируемого как целое.

Доказательство перестройки генов, кодирующих V- и С-участки иммуноглобулинов, получено благодаря технике рекомбинантной ДНК. иРНК для легкой цепи выделили из полисом миеломы и получили кДНК при помощи обратной транскриптазы. Препаративное количество этой кДНК было «наработано» путем клонирования в составе вектора в бактериальных клетках. Очищенную от вектора кДНК, кодирующую L-цепь иммуноглобулина, разделили рестриктазой на фрагменты, соответствующие V- и С-участкам. Препараты ДНК поместили радиоактивным фосфором и использовали в качестве зондов для гибридизации с ДНК миеломы и с ДНК эмбриона мыши. Оказалось, что в одном фрагменте, полученном из ДНК миеломы рестриктазой EcoRI, содержатся последовательности, кодирующие как переменную, так и константную части L-цепи. В то же время в эмбриональной ДНК они входят в состав разных EcoRI-фрагментов. Следовательно, в онтогенезе генетический материал перестраивался, что привело к исчезновению рестрикционного сайта EcoRI и сближению ранее разделенных участков ДНК (рис. 16.19).

16.12. Пол как генетическая модель индивидуального развития

Изучение дифференцировки *первичных и вторичных половых признаков* показывает ряд примеров генетического контроля индивидуального развития. При этом мы сталкиваемся с универсальными явлениями и механизмами, значение которых еще не совсем понятно. Так, Л. Синг и др. (1976) нашли в W-хромосоме, определяющей женский пол (ZW) змей (полосатый крайт — *Bungarus fosciaus*), фракцию повторяющейся ДНК, которая оказалась гомологичной ДНК половых хромосом птиц, амфибий, рептилий, млекопитающих (включая человека) и насекомых (*D. melanogaster*) как в случае X-, так и Y-хромосомы.

Всем млекопитающим мужского пола, включая человека, свойствен так называемый H—Y-антиген, находящийся на поверхности клеток, несущих Y-хромосому. У мышей он обнаруживается уже у эмбрионов на стадии восьми клеток. У изогенных особей женского пола H—Y-антиген не обнаружен. В инбредной линии мышей кожный лоскут хорошо приживается при пересадках от самок самцам, но не наоборот: лоскут самца при пересадке самкам отторгается. По-видимому, несколько генов Y-хромосомы определяют появление H—Y-антигена, единственной функцией которого считается индукция развития семенников, т. е. дифференцировка гонад.

Вторичные половые признаки развиваются под влиянием стероидных гормонов, вырабатываемых гонадами. Развитие мужских

вторичных половых признаков контролирует *тестостерон*, воздействующий на все клетки организма, включая клетки гонад. Мутация (*Tfm*) всего одного гена X-хромосомы, кодирующего белок-рецептор тестостерона у разных млекопитающих, приводит к синдрому *тестикулярной феминизации* особей XY. Клетки мутанта не чувствительны к действию тестостерона, в результате чего взрослый организм приобретает черты, характерные для женского пола. При этом внутренние половые органы оказываются недоразвитыми и такие особи полностью стерильны. Таким образом, в определении и дифференцировке пола млекопитающих взаимодействуют хромосомный и генный механизмы.

Несмотря на то что женские особи млекопитающих имеют две X-хромосомы, а мужские — только одну, экспрессия генов X-хромосомы происходит на одном и том же уровне у обоих полов. Это объясняется тем, что у женщин в каждой клетке полностью инактивирована одна X-хромосома. Эту хромосому можно видеть в интерфазе в форме гетерохроматинового тельца, названного *тельцем Барра* (см. гл. 20). X-хромосома инактивируется на ранней стадии эмбрионального развития, соответствующей времени имплантации. При этом в разных клетках отцовская и материнская X-хромосомы выключаются случайно.

Состояние инактивации данной X-хромосомы наследуется в ряду клеточных делений. Таким образом, женские особи, гетерозиготные по генам половых хромосом, представляют собой мозаики. Широко известный пример проявления такой мозаичности — *черепаховые кошки*, имеющие черные и желтые пятна. Эти кошки гетерозиготны по гену C^Y/C^B (C^Y — желтый мех, C^B — черный мех). Желтые и черные пятна у них развиваются в результате случайной инактивации в раннем эмбриогенезе X-хромосомы с аллелью C^B или C^Y . Черепаховую окраску почти всегда имеют кошки, если же изредка обнаруживаются коты такой окраски, то они имеют хромосомную конституцию XXУ.

В генетически сходной ситуации хромосомного определения пола по типу XX—XY у дрозофилы выработался иной механизм *компенсации дозы* генов X-хромосомы, которая различается у самцов и самок. Активность ферментов, кодируемых генами X-хромосомы, у них одинакова в пересчете на клетку или организм, но она в два раза выше у самцов в пересчете на одну X-хромосому, чем у самок. При этом у дрозофилы X-хромосома не инактивируется. Если ген из X-хромосомы транслоцировать на аутосому, то эффект дозовой компенсации сохраняется. При переносе генов с аутосом на X-хромосому аутосомные гены по типу компенсации дозы не регулируются. Следовательно, регулируется не активность всей X-хромосомы, а активность каждого ее гена.

Явление дозовой компенсации объясняется двояко. Одно объяснение связывает наблюдаемые эффекты с наличием гипотетического гена-компенсатора в X-хромосоме, не подверженного дозовой компенсации и синтезирующего некий ингибитор транскрипции генов X-хромосомы. Чем больше X-хромосом, тем больше

ингибитора транскрипции и, следовательно, тем ниже активность регулируемых генов. Другое объяснение предполагает существование аутосомного компенсатора, который обеспечивает образование активатора транскрипции X-хромосомы. Тогда уровень экспрессии (транскрипции) генов, сцепленных с полом, будет зависеть от их дозы и доступности активатора. Механизм дозовой компенсации у дрозофилы еще не расшифрован.

Итак, индивидуальное развитие многоклеточных организмов представляет собой сложную цепь изменений, контролируемых генами. При этом осуществляется дифференциальная экспрессия генов, регулируемых на разных уровнях от репликации до посттрансляционной модификации белков и сборки надмолекулярных структур. Во многом эти регуляторные процессы у эукариот еще не расшифрованы. Очевидно, для понимания генетических закономерностей онтогенеза представлений о дифференциальной экспрессии генов недостаточно. Происходят изменения самого генетического материала, например при дифференцировке лимфоцитов, детерминации клеточных типов у дрожжей и в других случаях. Все еще не до конца понятна роль цитоплазмы в детерминации клеток, так же как во многом не ясно соподчинение генетических механизмов детерминации и дифференцировки.

Прогресс в расшифровке генетических механизмов, контролирующих индивидуальное развитие, зависит от возможности использования удобных генетических моделей. Это означает, что процесс индивидуального развития необходимо разложить на элементарные признаки — фены, наследующиеся по альтернативной схеме. В этой главе было приведено несколько примеров таких моделей. Большие надежды вселяет применение новейших методов исследования, связанных с клонированием клеток и генов, возможность получения целых организмов из отдельных соматических клеток.

Область онтогенетики представляет собой поле активных и плодотворных исследований, особенно в настоящее время.

Вопросы к главе 16

1. Приведите примеры онтогенетической изменчивости.
2. Что такое гомеозисные мутации?
3. На каких уровнях осуществляется регуляция действия гена?
4. Что такое амплификация, каково ее значение в регуляции генной активности?
5. Что такое оперон? Изобразите схему оперона, поясните ее.
6. Какие схемы негативной регуляции вы знаете? Чем они различаются?
7. В чем состоит различие между негативной и позитивной регуляцией? Приведите примеры.
8. Получена мутация по промоторному участку лактозного оперона. Каков фенотип такого мутанта? Как отличить его от мутанта по гену-регулятору?

9. Приведите пример плейотропного действия гена. Каковы механизмы этого явления?

10. Как возникают гинандроморфы и мозаики? Дайте схему.

11. Какие вы можете привести доказательства тотипотентности соматических клеток эукариот?

12. В каких единицах выражаются расстояния при картировании бластодермы дрозофилы? Чему они соответствуют?

Глава 17

Модификации

Среди различных типов изменчивости, рассмотренных в гл. 12 (см. рис. 12.1), была выделена ненаследственная изменчивость, которую называют также модификационной. Общие закономерности изменчивости известны значительно хуже, чем законы наследования. Особенно слабы знания в области модификационной изменчивости, или модификаций.

17.1. Модификации — ненаследуемые изменения

Внешние воздействия могут вызывать у особи или группы особей изменения, которые бывают для них вредными, безразличными или полезными, т. е. приспособительными.

Как известно, эволюционная теория, разработанная Ж. Б. Ламарком (1744—1829), основывалась на ошибочном постулате о наследовании изменений, приобретаемых в течение жизни, т. е. о наследовании модификации. Само по себе представление Ж. Б. Ламарка об эволюции органических форм было, несомненно, прогрессивным для своего времени, но его объяснение механизма эволюционного процесса было неверным и отражало распространенное заблуждение, характерное для биологов XVIII столетия. С этим заблуждением можно встретиться среди специалистов, небиологов и в наши дни.

Ч. Дарвин (1809—1882) в своем «Происхождении видов...» разделил изменчивость на *определенную* и *неопределенную*. Эта классификация в общем соответствует нынешнему делению изменчивости на ненаследственную и наследственную. Ч. Дарвин, сформулировавший научный принцип эволюционных преобразований, основанный на механизме естественного отбора наиболее приспособленных форм, тем не менее допускал наследование приобретенных свойств, т. е. наследование модификаций.

Одним из первых исследователей, изучавших модификационную изменчивость, был К. Нэгели (1865), который сообщил, что если альпийские формы растений, например ястребинки, перенес-

ти на богатую почву Мюнхенского ботанического сада, то у них обнаруживается увеличение мощности, обильное цветение, а некоторые растения изменяются до неузнаваемости. Если эти же формы вновь перенести на бедные каменистые почвы, то они возвращаются к исходной форме. Несмотря на полученные результаты, К. Нэгели оставался сторонником наследования приобретенных свойств.

Впервые строгий количественный подход к исследованию модификационной изменчивости с позиций генетики применил В. Иоганнсен. Он изучал наследование массы и размера семян фасоли — признаков, в значительной степени меняющихся как под влиянием генетических факторов, так и условий выращивания растений.

Масса семян одного сорта фасоли варьировала в пределах от 150 до 750 мг (рис. 17.1) при средней массе около 500 мг. Семена массой от 250 до 350 мг были высеяны отдельно от семян массой от 550 до 650 мг, и с выросших растений путем самоопыления вновь были получены семена. Средняя масса семян, собранных с растений, выросших из легких семян, составила 443,4 мг, а с растений, выросших из тяжелых семян, — 518,7 мг. При этом в обоих случаях наблюдалось варьирование массы семян, что хорошо соответствовало нормальному распределению (рис. 17.1).

Последующее самоопыление и отбор самых тяжелых и самых легких семян в пределах самоопыляющихся линий в течение шести поколений не привели к успеху.

Таким образом, было показано, что исследованный сорт фасоли (самоопыляющееся растение) не был генотипически однородным и при самоопылении был разложен на чистые линии, т. е. полностью гомозиготные линии, в пределах которых дальнейший отбор не эффективен. Очевидно, в последнем случае варьирование массы семян было связано с модификационной изменчивостью.

Убеденным противником идеи наследования

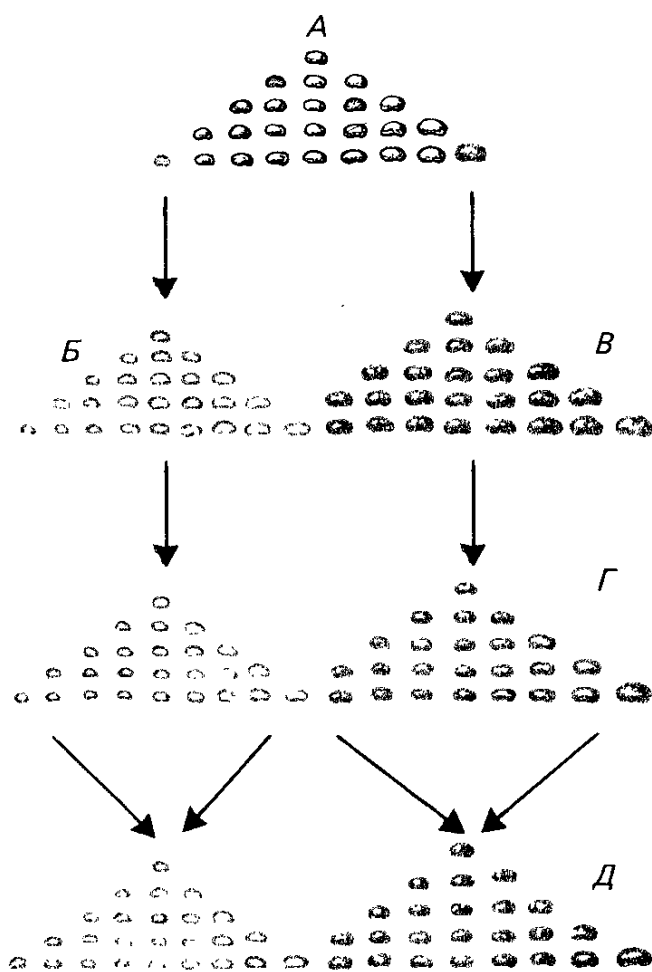


Рис. 17.1. Варьирование массы семян фасоли в пределах одного сорта (А) и в чистых линиях, полученных путем отбора (В и V). Дальнейший отбор в чистых линиях (Г), как показал В. Иоганнсен, неэффективен (Д)

свойств, приобретенных в онтогенезе, был А. Вейсман (1833—1914). Последовательно отстаивая дарвиновский принцип естественного отбора как движущую силу эволюции, он предложил разделить понятия *соматогенных* и *бластогенных изменений*, т. е. изменения свойств соматических клеток и органов, с одной стороны, и изменения свойств генеративных клеток — с другой. А. Вейсман указал на невозможность существования механизма, который передавал бы изменения соматических клеток половым таким образом, чтобы в следующем поколении организмы изменялись адекватно тем модификациям, которые претерпели родители во время своего онтогенеза.

Иллюстрируя это положение, А. Вейсман поставил следующий эксперимент, доказывавший ненаследование приобретенных признаков. На протяжении 22 поколений он отрубал белым мышам хвосты и скрещивал их между собой. В общей сложности он обследовал 1592 особи и ни разу не обнаружил укорочения хвоста у новорожденных мышат. В подобном эксперименте, результаты которого были опубликованы в 1913 г., в сущности не было необходимости. «Результаты преднамеренных повреждений у человека, сделанные из ритуальных или «эстетических» соображений, — обрезание, протыкание ушей, губ, носовой перегородки, удаление зубов, уродование ступней, черепа и т. д., как известно, не наследуются»¹.

В итоге дискуссий и экспериментов в области проблемы наследования приобретенных признаков в начале XX в. была сформулирована точка зрения, своего рода *закон ненаследования изменений, приобретенных в ходе онтогенеза*. В наше время этот закон нашел подтверждение в виде *центральной догмы* молекулярной биологии (см. гл. 15), согласно которой перенос информации возможен только от генетического материала (нуклеиновых кислот) к белкам — генным продуктам, но не в обратном направлении.

17.2. Модификации — изменения организма в пределах нормы реакции

Существует множество примеров модификаций, вызываемых различными факторами внешней среды. Один из наиболее впечатляющих примеров — *определение пола после оплодотворения* у некоторых низших животных. У морского червя *Bonellia* самцы и самки имеют одинаковый генотип. Если только что вылупившихся из яиц молодых червей изолировать и выращивать отдельно, то все они развиваются в самок. Если же вылупившихся животных выпустить вблизи взрослой самки, то некоторые из них проникают в хоботок взрослой особи и развиваются в микроскопических самцов, которые в конце концов мигрируют в половые

¹ Бляхер Л. Я. Проблема наследования приобретенных признаков. 1971. С. 98.

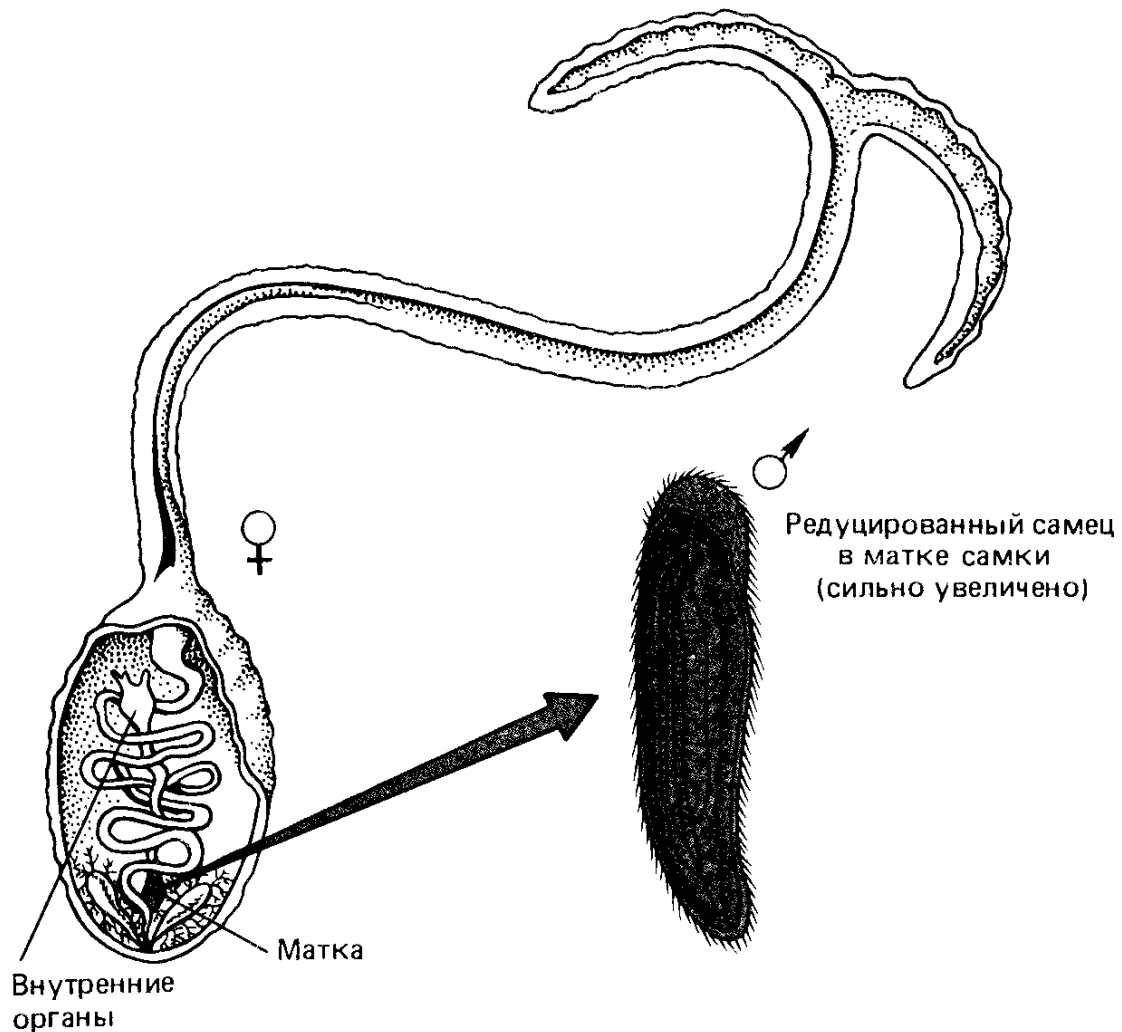


Рис. 17.2. Самка и самец морского червя *Bonellia viridis* (из Gardner a. Spusted, 1981)

пути самки. Здесь они живут в качестве паразитов, выполняя свою единственную функцию — оплодотворение яйцеклеток (рис. 17.2).

Как указывалось в гл. 5, у некоторых позвоночных животных возможно фенотипическое (гормональное) переопределение пола, которое, как, например, у некоторых рыб, оказывается полным. Тем не менее в этих случаях дальнейшее расщепление по полу соответствует хромосомному механизму его определения.

Известно, что подводные и надводные листья некоторых водных растений различаются по форме. Так, у водяного лютика (*Batrachium*) листья, погруженные в воду, значительно более расчеченные, чем надводные (рис. 17.3). У другого водного растения — стрелолиста (*Sagittaria*) различаются по форме подводные, плавающие на поверхности и надводные листья (рис. 17.4). В гл. 3 упоминалось, что примула (*Primula sinensis*), несущая доминантную аллель *P*, образует розовые цветки при 15—20°, а при 30—35°C цветки оказываются белыми. Напомним, что у гомозиготы по рецессивной аллели (*pp*) цветки будут белыми при тех и других температурах.

Яркий пример модификационного изменения у животных — окраска шерсти гималайского кролика. Обычно при 20°C у этой

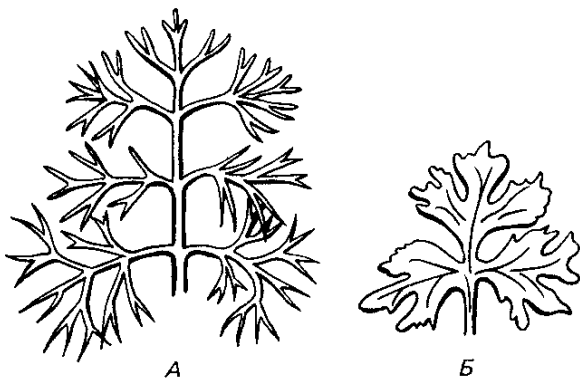


Рис. 17.3. Листья водяного лютика. А — погруженные в воду; Б — надводные

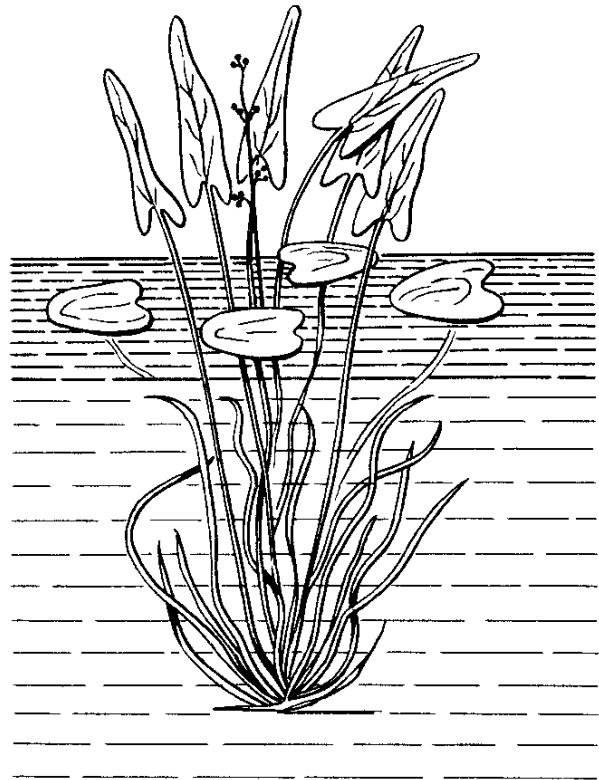


Рис. 17.4. Растение стрелолиста, образующее три типа листьев: подводные, плавающие и надводные

породы шерсть белая, за исключением черных ушей, лап и пятна вокруг носа. При 30°C такие кролики вырастают сплошь белыми. Если же гималайскому кролику выбривают участок спины и охлаждают его, например привязывая пузырь со льдом, то в этой области вырастает черная шерсть.

Для каждой области тела есть свой порог температуры, выше которого вырастает белая шерсть, а ниже — черная (рис. 17.5).

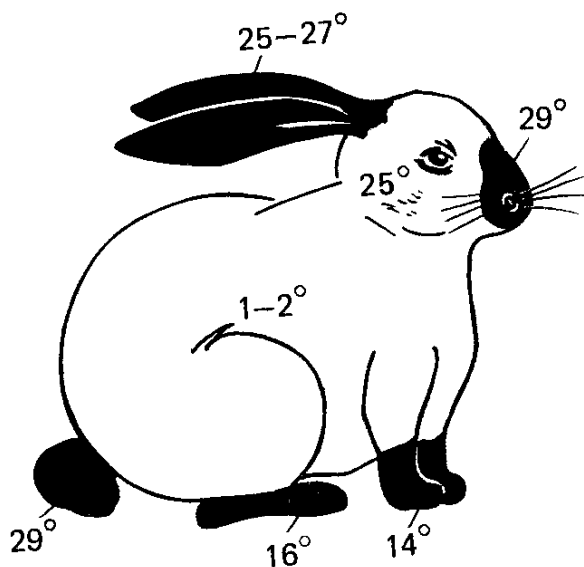


Рис. 17.5. Карта температурных порогов пигментации шерсти у гималайского кролика (из Ильина по С. М. Гершензону, 1983).

Цифры — пороговая температура, выше которой шерсть на данном участке тела белая, а ниже — черная

Следовательно, проявление аллели, c^h по которой гомозиготен гималайский кролик, зависит от температуры. Подобный опыт не может дать положительного результата с белым кроликом альбиносом ($c^a c^a$).

У *D. melanogaster* известна мутация abnormal abdomen (A). Мухи, несущие эту мутацию, отличаются аномалиями развития брюшка, но только если личинок выращивать на переувлажненном корме. На сухом корме развиваются нормальные мухи.

Несколько приведенных примеров показывают, что определенные типы модификации возникают только у организмов определенного генотипа. Следовательно, способность к моди-

фикации наследуется и характеризует генетически заданную норму реакции (см. гл. 3). Таким образом, было бы неверно рассматривать ненаследственную изменчивость—модификации—в отрыве от наследственной изменчивости. Возможность модификации определяется генотипом и реализуется при соответствующих изменениях внешней среды.

17.3. Типы модификационных изменений

Принято рассматривать несколько типов модификационных изменений. Наиболее известны адаптивные модификации, т. е. ненаследуемые изменения, полезные для организма и способствующие его выживанию при изменившихся условиях. Так, у растений, обитающих в условиях затемнения, увеличиваются листовые пластинки и тем самым активизируется фотосинтез. У пушных зверей при понижении температуры густеет мех. Загар на коже человека представляет собой адаптивное изменение, способствующее большей устойчивости к облучению солнечным светом и т. д.

Пример широко распространенных адаптивных модификаций — реакция клетки на действие излучений и химических мутагенов. Например, сохранение в ДНК клетки циклобутановых димеров и других продуктов действия ультрафиолетового излучения, не устраняемых конститутивными системами репарации при больших дозах облучения, индуцирует систему *SOS*-репарации (см. гл. 6). Так же следует рассматривать и реакцию *адаптивного ответа*, когда предварительная обработка клеток умеренными дозами мутагена делает их устойчивее к действию высоких доз того же мутагена.

Адаптивные модификации — это реакция клеток и организма на изменения условий среды, которые неоднократно действовали на организм в ходе эволюции. Все они — в пределах нормы реакции, заданной генотипом.

Неверно считать, что все модификации адаптивны. При интенсивном действии многих агентов наблюдаются ненаследуемые изменения, случайные (по своему проявлению) по отношению к воздействию. Такие изменения называют *морфозами*. Очень часто они напоминают фенотипическое проявление известных мутаций. Тогда их называют *фенокопиями* этих мутаций. В конце 30-х — начале 40-х годов И. А. Рапопорт исследовал действие на дрозофилу многих химических соединений, показав, что, например, соединения ртути вызывают фенокопию Minute (тонкие щетинки); соединения сурьмы — brown (коричневые глаза); мышьяковистая кислота и некоторые другие соединения — изменения крыльев, пигментации тела; соединения бора — eyeless (безглазие), aristopedia (превращение арист в ноги), соединения серебра — yellow (желтое тело) и т. д. При этом некоторые морфозы при воздействии на определенную стадию развития индуцировались с высо-

кой частотой (до 100%). Отмечено, что степень выраженности морфоза усиливается при увеличении дозы действующего соединения, что закономерно отличает индукцию морфозов и мутаций. Как известно, степень проявления мутантного гена не зависит от дозы вызвавшего мутацию мутагена.

Известны морфозы, возникающие у растений при недостатке или избытке микроэлементов в почве. Чаще всего морфозы выражены в форме тех или иных уродств — отклонений от стандартного фенотипа, однако возможны и *фенокопии нормы* у различных мутантных линий. Так, при повышении температуры увеличивается длина крыльев у дрозофилы, мутантной по гену *vestigial* (зачаточные крылья).

Явление фенокопирования нормы широко исследуется у микроорганизмов. Это явление получило также название *фенотипической супрессии*. В отличие от генетической супрессии фенотипическая не наследуется и проявляется только в условиях, которые ее вызывают. Один из первых примеров такого рода был получен С. Бензером и С. Чеймпом. Выращивая амбер-мутанты по генам *rII* фага T4 (см. гл. 15) в присутствии *5-фторурацила*, эти исследователи обнаружили, что некоторые мутанты приобретают способность лизировать клетки *E. coli* K (λ). Оказалось, что 5-фторурацил замещает в иРНК урацил и может образовывать пары с гуанином, а не с аденином. Тем самым индуцировались ошибки трансляции, приводившие к нормализации фенотипа некоторых мутантов *rII*.

Фенотипическую супрессию нонсенс-аллелей у бактерий вызывают *аминогликозидные антибиотики*, в частности, *стрептомицин*. Как показал в 60-х годах Л. Горини, эти антибиотики связываются с рибосомами и нарушают точность считывания генетического кода.

Пример фенотипической супрессии — восстановление жизнеспособности *условно летальных мутантов* (температурочувствительных, чувствительных к повышенному осмотическому давлению, рН и т. д.) в перmissive условиях. Явление фенотипической супрессии используют при изучении действия гена. Это перспективный подход к расшифровке молекулярного механизма модификационных изменений.

В большинстве случаев модификации не стойки и исчезают, как только прекращается действие вызвавшего их агента. Это не относится к морфозам и фенокопиям, ограждающим вмешательство внешних факторов в процессы реализации признака на критической стадии онтогенеза — в момент закладки или дифференцировки исследуемого органа. Такие модификации сохраняются в течение всей жизни особи. Необратимость подобных изменений в онтогенезе объясняется необратимостью индивидуального развития.

Сложнее обстоит дело с некоторыми модификациями на клеточном уровне. Известно несколько примеров так называемых *длительных модификаций*. Наиболее известны эксперименты

В. Иоллоса, который впервые показал, что предварительное воздействие на парамеций небольшими дозами ядов повышает устойчивость этих инфузорий к последующим воздействиям тех же агентов. Устойчивость сохранялась лишь в течение ряда вегетативных делений парамеций и исчезала после того, как происходила конъюгация, т. е. половое размножение. В данном случае длительная модификация носила адаптивный характер.

Примеры длительных модификаций известны и у многоклеточных животных. Так, у пресноводного рачка гиалодафнии в зависимости от питания изменяется высота головы. При обильном питании и повышенной температуре высота головного щлема увеличивается, а при скудном питании и пониженной температуре — уменьшается. Эти морфологические особенности сохраняются при получении партеногенетического потомства и содержания различающихся вариантов в одинаковых условиях, однако различия постепенно сглаживаются и полностью исчезают к третьему партеногенетическому поколению.

Подобные длительные модификации наблюдаются в культурах соматических клеток и часто их связывают с так называемым *эпигеномным наследованием*, т. е. с наследованием негенетических изменений. Механизм их неизвестен.

17.4. Механизмы модификаций

Модификационные изменения традиционно противопоставляют мутациям. В этом противопоставлении заключается глубокий смысл, поскольку мутации — это результат нарушения процессов воспроизведения генов, а модификации — результат изменения действия генов.

С учетом этих особенностей модификационной изменчивости при ее изучении необходимо соблюдать некоторые общие правила.

1. Исходный материал должен быть генотипически однороден.
2. Следует охарактеризовать норму реакции исследуемой линии, культуры, клона на применяемые воздействия.

3. Необходима статистическая обработка материала, при которой учитывается варьирование признака в контрольном и опытном вариантах и воспроизводимость результатов при повторных опытах.

4. Должны быть проанализированы наблюдаемые изменения: их обратимость в онтогенезе, проявление в последующих поколениях для различения мутаций и модификаций.

Несоблюдение этих правил приводит к невозможности интерпретировать результаты.

Причины модификационных изменений, особенно адаптивных модификаций, следует искать в механизмах регуляции действия генов, о которых говорилось в предыдущей главе. Механизмы регуляции лучше исследованы у прокариот и значительно хуже у эукариот. Очевидно, индукция адаптивных ферментов, регулируемых по оперонной схеме у бактерий, представляет пример *адап-*

тивной модификации. Действительно, адаптация клеток *E. coli* к лактозе как к новому субстрату представляет модификационное изменение в пределах нормы реакции клетки.

Уже упоминалось об индуцибельной системе репарации как примере широко распространенного адаптивного модификационного изменения на клеточном уровне. Еще один пример универсального механизма адаптивных модификаций — синдром *теплового шока*.

Как показал в 1962 г. Ф. Ритосса, в гигантских хромосомах личинок дрозофилы в результате реакции на резкие температурные воздействия (37°C), а также на действие многих других повреждающих агентов образуется специфический набор пуфов. Этих пуфов немного — от 5 до 10 у разных видов *Drosophila*. Они возникают в течение первой минуты после воздействия на личинок или изолированные слюнные железы. Пуфы имеют повышенную транскрипционную активность: к ним направляются молекулы РНК-полимеразы II и белки, дестабилизирующие двойную спираль ДНК. В пуфах теплового шока уменьшается количество гистона H1 (см. гл. 6). Все это согласуется с представлениями о том, что синдром теплового шока затрагивает уровень транскрипции.

Через 30—40 мин величина пуфов уменьшается. Если раньше понизить температуру, то этот процесс ускоряется. Пуфы теплового шока не удается индуцировать на изолированных ядрах, и в то же время они образуются, если ядра из непрогретых клеток слюнных желез инкубировать вместе с цитоплазмой клеток, подвергнутых тепловому шоку.

Показано, что во всех клетках организма при тепловом шоке идут сходные (а возможно, и одинаковые) процессы, о чем можно судить по активации в них одних и тех же генов: появляются одни и те же белки и РНК. В дальнейшем выяснилось, что реакция теплового шока развивается у дрозофилы при действии многих повреждающих агентов, например антибиотика антимицина А, азид-да натрия, гидроксилamina, колхицина, хлорида аммония и др.

Характерная черта реакции на тепловой шок — уменьшение пуфов, присутствовавших в политенных хромосомах до нагревания. При этом прекращается синтез ранее синтезировавшихся иРНК, а транскрипция генов гистонов, рРНК, тРНК и генов митохондрий сохраняется на прежнем уровне. Правда, наблюдается нарушение созревания 18S, 28S и 5S рРНК.

Трансляция в клетках организма, подвергнутого тепловому шоку, переключается со старых иРНК на новые иРНК, синтезированные в результате реакции на повреждающее воздействие. Старые полисомы разрушаются и образуются новые. Продуктами этих полисом у *D. melanogaster* служат восемь основных белков теплового шока (рис. 17.6). Через 6—8 ч после начала прогревания они составляют до 10% всего белка клетки.

Если синтез белков теплового шока подавить при повышении температуры, то после снижения температуры клетка не может

вернуться к синтезу нормальных белков. Это указывает на адаптивный характер синдрома теплового шока. Сами белки теплового шока обнаруживают повышенное сродство к хроматину. Они мигрируют в ядро и связываются с хромосомами преимущественно в районах расположения эухроматина.

О важной роли белков теплового шока свидетельствует и высокий уровень их эволюционной консервативности. Так, ген дрозофилы, кодирующий белок теплового шока массой 70 000 Д, был клонирован и обнаружил гомологию в опытах по гибридизации с ДНК человека, мыши, курицы, ящериц, дрожжей и кукурузы. У всех этих организмов и ряда других были обнаружены белки теплового шока, аналогичные таковым *D. melanogaster*.

Сейчас еще не ясны те регуляторные механизмы, которые запускаются в клетках при повышении температуры и других воздействиях, вызывающих «синдром теплового шока», но очевидно, что обнаружен еще один универсальный генетический механизм — механизм *неспецифических адаптивных модификаций*.

Причины модификаций, очевидно, не сводятся только к механизмам репрессии и индукции ферментов. По-видимому, существуют и некоторые спонтанные нарушения в действии генов, которые могут быть причинами морфозов и фенотипов. Впервые попытку исследования таких «случайных» модификаций предпринял Б. Л. Астауров в 1927 г. Он исследовал открытую им мутацию *tetraptera* у *D. melanogaster*. Эта репрессивная мутация приводит к превращению галтер, или жужжалец, во вторую пару крыльев. Б. Л. Астауров обратил внимание на сильное варьирование в проявлении мутантного признака, даже в условиях постоянной среды и гомозиготности по исследуемой мутантной аллели. Признак *tetraptera* варьировал не только от особи к особи: размер дополнительной пары крыльев был неодинаков, но наблюдалось различие в его проявлении на левой и правой сторонах тела дрозофилы. На основе полученных результатов Б. Л. Астауров сделал вывод о закономерной неустойчивости в действии гена, экспрессия которого может спонтанно варьировать, и, по-видимому, эта неустой-

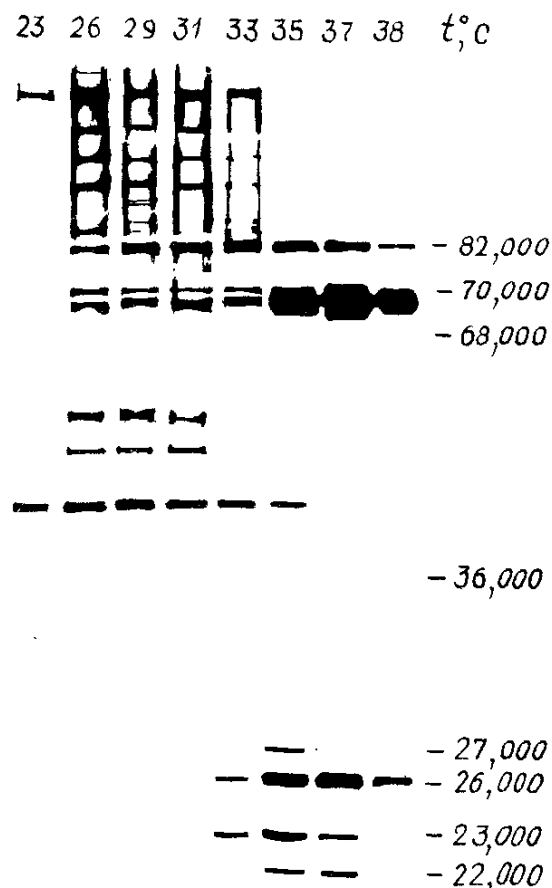


Рис. 17.6. Синтез белков теплового шока в клетках *D. melanogaster* при разных температурах (из М. Mirault et al., 1978).

Результаты электрофореза в полиакриламидном геле. Справа указана молекулярная масса основных белков теплового шока

чивость и служит основой проявления модификаций. Аналогичный пример представляет изучение мутантного признака *Bar* у *D. melanogaster*. Число фасеток в левом и правом глазах дрозофилы также может варьировать. В дальнейшем это явление получило название «шумы индивидуального развития» (developmental noise).

Причиной таких *нерегулярных модификаций* может быть нарушение экспрессии генетической информации на различных стадиях; от транскрипции до ферментативной реакции белка — генного продукта и далее нарушения морфогенетических процессов. Один из подходов к изучению закономерной неустойчивости в экспрессии генетической информации на уровне трансляции наметился в 60-х годах.

Л. Горини и другие исследовали явление фенотипической супрессии нонсенс-мутаций *E. coli* при действии стрептомицина. Этот антибиотик связывается с рибосомами бактерий, что приводит к нарушениям в считывании генетического кода. Результатом этого может быть фенкопия нормы. Например, некоторые нонсенс-мутанты, несущие нонсенс-кодоны в гене, контролирующем биосинтез аргинина, могут расти на среде без аргинина, но в присутствии сублетальных доз стрептомицина. Различные мутации, изменяющие белки рибосом, способствуют повышению уровня фенотипической супрессии (белки S4, S5, L7/L12) или понижению уровня фенотипической супрессии (S12, S17, L6).

Аналогичные результаты получены для дрожжей-сахаромицетов при действии аминогликозидного антибиотика паромомицина, также приводящем к фенотипической супрессии нонсенс-аллелей, возникающих в различных генах. В работах сотрудников кафедры генетики и селекции Ленинградского университета показано, что у дрожжей фенотипическая супрессия мутаций-нонсенсов происходит и при действии таких обычных условий, как понижение температуры с 30 до 20°C или при замене глюкозы на неферментируемые источники углерода (глицерин, этанол или галактоза).

Таким образом, ошибки трансляции, усиливающиеся при некоторых внешних воздействиях, характерны как для прокариот, так и для эукариот и могут быть причиной модификационных изменений — фенкопии нормы.

Другой возможный механизм модификаций — временные ненаследуемые изменения генетического материала, устраняемые затем системами репарации (см. гл. 6). Так, М. Резник и Р. Холлидэй (1971) исследовали синтез индуцируемого фермента *нитратредуктазы* у гриба *Ustilago maidis*. Если этот фермент индуцировать у *U. maidis* непосредственно после облучения гриба ультрафиолетовым светом, то ферментативная активность по сравнению с нормой падает. При этом в клетках синтезируется значительное количество белка, иммунологически родственного нитратредуктазе, но не обладающего ферментативной активностью. Если же перед индукцией фермента после облучения в течение некоторого времени происходит темновая (эксцизионная) репарация (см. гл. 6), то активность фермента вновь повышается.

Этот эксперимент показывает, что фотопродукты, образующиеся в ДНК, служат причиной снижения активности фермента, появления его аномальных вариантов. Следовательно, подобные изменения оказываются ненаследуемыми, т. е. модификационными.

Подобные ненаследуемые нарушения структуры генетического материала, по-видимому, проявляются в критические периоды индивидуального развития организма, при детерминации клеток. Как известно, большинство предмутационных изменений ДНК устраняется системами репарации (см. гл. 6, 12). Временные, ненаследуемые далее повреждения генетического материала могут стать причиной модификаций типа морфозов и других врожденных аномалий развития.

17.5. Взаимосвязь модификационной и наследственной изменчивости

В этой главе неоднократно отмечались различия модификационной и наследственной изменчивости. Тем не менее между ними существует взаимосвязь по меньшей мере в двух отношениях.

Во-первых, модификации представляют собой ненаследуемые изменения в пределах нормы реакций, обусловленной генотипом. Это создает определенные трудности при изучении модификаций в природных популяциях, где нет чистых линий. В этих случаях, как показал Н. В. Глотов для количественных признаков, доля изменчивости за счет взаимодействия генотип—среда может составлять более 50% от всей наблюдаемой изменчивости. Во-вторых, одни и те же факторы внешней среды могут быть причиной как модификационных, так и наследственных изменений, возникающих за счет мутаций и повышения частоты рекомбинации. При этом влияние среды на мутационный процесс и рекомбинацию опосредуется модификациями — онтогенетическими адаптациями развивающегося организма.

М. М. Тихомирова путем отбора получила линию *T Dr. melanogaster*, способную жить и оставлять потомство при температуре 32°C. Обычно при этой температуре мухи развиваются, но оказываются стерильными. Так ведет себя, в частности, стандартная лабораторная линия Кантон-С. Наследственные различия этих двух линий по теплоустойчивости выявляются при содержании их при 36°C: средняя продолжительность жизни мух Кантон-С $6,5 \pm 0,1$ ч, а мух линии Т — $16,4 \pm 0,3$ ч. Однако этот результат зависит от температуры предшествующего развития линии Т. Так, если линия Т развивалась при 32°C, то через 10 ч при 36°C в ней остается $82,3 \pm 4,0\%$ мух живыми, а если она развивалась при 25°C, то при тех же условиях остаются живыми $29,2 \pm 6,6\%$ мух. Таким образом, *онтогенетическая адаптация* (модификация),

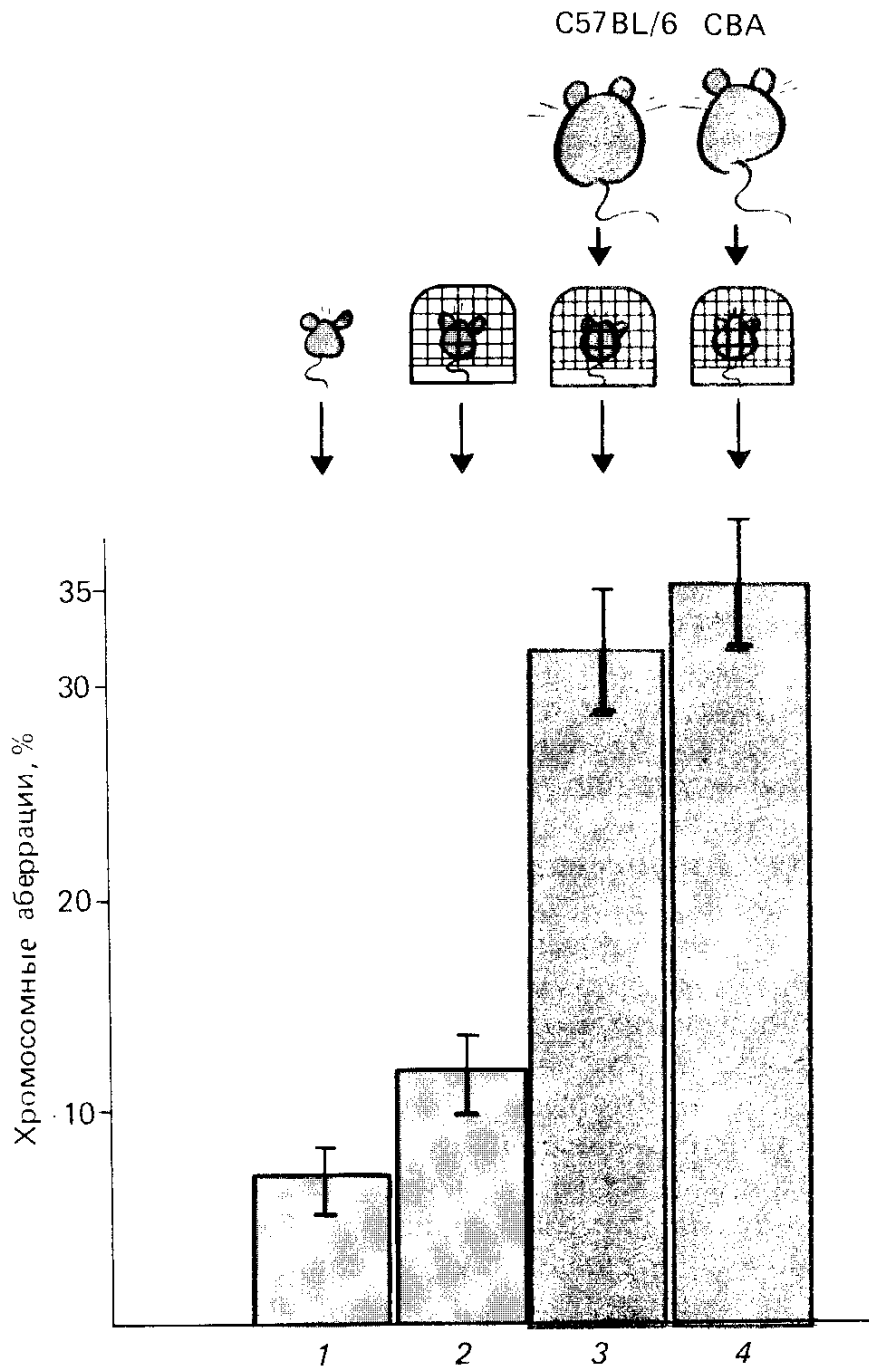


Рис. 17.7. Влияние феромонального стресса на частоту хромосомных aberrаций у мышей (Р. И. Цапыгина, Е. В. Даев, С. Н. Новиков, 1981).

Представлены данные о частоте aberrаций в сперматогенезе: 1 — без дополнительного воздействия, 2 — результат помещения мышей 30-дневного возраста на чистую подстилку, 3, 4 — результат помещения мышей того же возраста на подстилку после пребывания на ней самцов 3—4-месячного возраста линий C57B6 и CBA соответственно

развивающаяся на фоне *генотипической преадаптации*, определяет реакцию дрозофилы на высокую температуру. Более того, изучение мутагенного последствия высокой температуры, как оказалось, также зависит от онтогенетической адаптации. Высокая температура (33°C) после облучения рентгеновскими лучами вызывает дополнительное повышение частоты потерь X-хромосом только в том случае, когда линия T была выращена при 25°C , но не при 32° .

Различные стрессовые воздействия на организм не только индуцируют системы адаптации, повышающие устойчивость организма, но и активно влияют на наследственную изменчивость.

Д. К. Беляев и П. М. Бородин показали, что *стресс* у мышей повышает частоту кроссинговера, а Р. И. Цапыгина, С. Н. Новиков и другие обнаружили мутагенный эффект *феромонального стресса* у того же объекта. В последнем случае в качестве стрессора, или стрессирующего агента, использовали запах взрослого самца, который повышал частоту цитологических нарушений в сперматогенезе у молодых мышей (рис. 17.7), увеличивал частоту аномальных сперматозоидов и доминантных леталей после спаривания с интактными самками. Следует отметить, что запахи — это нормальный способ коммуникации у мышей, и при последующей адаптации, т. е. при неоднородных воздействиях такого стрессора, частота всех показателей генетических аномалий возвращалась к норме.

В связи с модификациями и генотипической изменчивостью представляют интерес полученные в последние годы данные о том, что одни и те же воздействия, вызывающие стрессовую адаптивную реакцию организма, могут активировать мигрирующие элементы генома. Так, показано, что при температурном шоке у дрозофилы резко и значительно повышается количество транскриптов мигрирующего элемента *scoria*. В длинных терминальных повторах этого элемента содержатся последовательности, гомологичные усредненной структуре промоторов генов теплового шока. Эти данные соответствуют тому, что температурные воздействия активируют перемещения мобильных элементов у кукурузы, дрозофилы и дрожжей, а также позволяют рассматривать мигрирующие элементы как мобильные промоторы, регулирующие экспрессию близлежащих генов в экстремальных условиях.

Таким образом, рассмотренные примеры показывают, что влияние внешних воздействий на модификационную и наследственную изменчивость зависит от предшествующей онтогенетической адаптации к ним.

17.6. Значение модификаций

«Мы уже отвергли ламарковские принципы, как не дающие разрешения эволюционной проблемы. Это, однако, не значит, что мы должны отрицать значение модификаций и прямого приспособления в процессе эволюции», — писал И. И. Шмальгаузен¹, и далее: «Адаптивная модификация является первой пробой реакции, при помощи которой организм как бы проверяет возможность замены и более успешного использования окружающей среды»².

¹ Шмальгаузен И. И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. 1982. С. 155.

² Там же. С. 217

В этих словах сконцентрировано представление о роли модификаций в эволюционном процессе. Обусловленные нормой реакции адаптивные модификации дают возможность организму выжить и оставить потомство. При наличии такой возможности последующие *генокопии модификаций, т. е. мутации, фенотипическое проявление которых копирует модификация*, подхватываются естественным отбором и тем самым возрастает приспособленность организма к новым изменившимся условиям. Согласно закону Гаузе (1934) два вида не могут сосуществовать в одной и той же экологической нише, т. е. с равным успехом использовать одни и те же условия окружающей среды. Поэтому освоение новых условий представляет собой составную часть эволюционной дивергенции биологических форм. В 30—40-е годы советские ученые внесли достойный вклад в обоснование эволюционного значения модификаций, не имеющее ничего общего с неоламаркизмом, принесшим большой вред в последующие годы развитию биологии. Более подробно генетические основы эволюции будут рассмотрены в следующих главах.

В заключение следует еще раз обратиться к связи между модификационной и онтогенетической изменчивостью. Во многих случаях модификации (фенокопии, морфозы) возникают в результате влияния внешних факторов на процесс реализации генетической информации на разных ее стадиях, в частности во время прохождения организмом критических стадий онтогенеза — детерминации клеток, закладки и дифференцировки органов. В некоторых случаях прослеживается общность механизмов, обеспечивающих адаптивные модификации и нормальное развитие организмов. Так, некоторые белки теплового шока дрозофилы закономерно появляются без каких бы то ни было резких внешних воздействий на определенных стадиях развития насекомого. Основным белком теплового шока с массой 70 000Д синтезируется эмбрионами на стадии бластодермы, а другие белки (22 000, 23 000, 26 000 и 27 000Д) появляются на различных стадиях развития личинки и куколки.

Знание нормы реакции организма, знание пределов его модификационной изменчивости имеет большое значение при конструировании новых форм растений, животных и микроорганизмов, полезных человеку. Особенно важно это для практики сельского хозяйства, цель которой — повышение продуктивности растений и животных не только путем внедрения новых селекционных форм — пород и сортов, но и максимальное использование возможностей каждой породы или сорта. Знание закономерностей модификационной изменчивости необходимо и для медицины, усилия которой направлены в настоящее время не на изменение генетических потенций человека, а на поддержание и развитие человеческого организма в пределах нормы реакции.

Все это определяет значение исследований модификационной изменчивости как одного из проявлений действия генов во взаимосвязи с факторами окружающей среды.

Вопросы к главе 17

1. Чем объясняется варьирование признаков в гомозиготных (чистых) линиях растений?
2. Приведите примеры фенотипической супрессии из этой и предыдущих глав.
3. Что такое адаптивные модификации?
4. Как доказать, является изучаемая форма фенкопией или мутантом?
5. Каковы статистические закономерности, отражающие модификационную изменчивость?
6. Перечислите генетические механизмы, лежащие в основе онтогенетической адаптации.
7. Приведите пример, когда условия среды или специальные воздействия могут исправить дефект развития, обусловленный генотипически.
8. У земляники *Fragaria vesca* L. имеются две независимые формы (линии), не образующие побегов-усов. Обработка растений гиббереллином приводит к формированию усов у обеих линий, но усы различаются морфологически. С какими формами изменчивости исследователь имеет дело? Как проверить выдвинутые предположения?
9. Рассмотрите генетические факторы и факторы среды, влияющие на характер образования пуфов в политенных хромосомах личинок двукрылых.
10. Что такое «норма реакции» организма и каковы методы ее изучения?
11. Перечислите типы модификаций.

5

ЧАСТЬ

ГЕНЕТИКА И ЭВОЛЮЦИЯ

Глава 18

Генетические основы эволюции. Генетика популяций

Биологическая эволюция — это процесс изменения и дивергенции биологических форм во времени. Всякое биологическое исследование, как писал Ф. Г. Добжанский, ценно прежде всего в той мере, в которой оно приближает нас к пониманию процесса эволюции.

С этой точки зрения поучительна история отношений генетики и эволюционной теории. Современная теория эволюции прежде всего представляет собой синтез дарвинизма и генетики, а также ряда дисциплин, изучающих популяционную биологию, поэтому ее называют синтетической теорией эволюции. Отношения между теорией эволюции Ч. Дарвина и молодой генетикой поначалу складывались весьма сложно.

Впервые в истории биологии Ч. Дарвин предложил естественнонаучный принцип происхождения и изменения видов на основе естественного отбора наиболее приспособленных особей. Материалом для отбора служит наследственная изменчивость организмов. Классический труд Ч. Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятствуемых пород в борьбе за жизнь» вышел в 1859 г., т. е. еще до появления работы Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами». Труд Г. Менделя остался неизвестным Ч. Дарвину и поэтому не могла быть решена главная проблема, мучившая Ч. Дарвина: каким образом наследственные вариации сохраняются в природе. Представление

о дискретных наследственных факторах и элементарных признаках, развитое менделистами, в конце концов объяснило, какой именно природный материал необходим для естественного отбора. Мутационная теория обосновала пути и механизмы возникновения новых наследственных вариантов живых существ.

На протяжении всего времени разработки теории эволюции Ч. Дарвина преследовал печально известный «*кошмар Дженкина*». Эти два слова символизируют представление о поглощающем влиянии скрещивания, якобы, усредняющем, «засасывающим» все вариации организмов. Попытки сформулировать законы наследственности помимо Менделя и менделизма оставались бесплодными.

Переоткрытие законов Г. Менделя, работы В. Иоганнсена, казалось бы, освободили дарвинизм от «*кошмара Дженкина*». Более того, изучение В. Иоганнсеном наследования в популяциях и чистых линиях (см. гл. 17) делало ненужным допущение о наследовании приобретенных признаков, показывало, что отбор эффективен только в генетически гетерогенных популяциях.

Тем не менее на первых этапах развития менделизма генетики встали в оппозицию по отношению к теории естественного отбора. Г. Де Фриз считал, что виды возникают в результате мутаций, что не требует дальнейшего действия отбора. У. Бэтсон, исходя из выдвинутой им теории «присутствия—отсутствия», построил свою теорию эволюции как предопределенный процесс утраты генов (и признаков) вследствие мутаций.

К не менее парадоксальным выводам пришел голландский генетик Ж. Лотси, отрицавший возможность возникновения полезных мутаций и тем самым не признававший роли мутационного процесса в эволюции. На основе своих исследований энотеры и спекуляции на недостаточной экспериментальной проработке мутационной теории Г. Де Фриза он считал, что природные виды гомозиготны и возникают путем гибридизации и последующего выщепления гомозиготных форм. Эти теории подвергались справедливой критике.

Сторонники «*ортодоксального дарвинизма*», в основном представители биометрической школы, а также примыкавший к ним А. Уоллес скептически относились к законам Менделя, не принимали учения В. Иоганнсена о чистых линиях.

Первый шаг к реальному синтезу дарвиновской теории эволюции и генетики был независимо сделан двумя исследователями: английским математиком Х. Харди и немецким врачом В. Вайнбергом, которые в 1908 г. подошли к математическому анализу наследования в популяциях — в больших совокупностях организмов на основе законов Г. Менделя. Тем самым были заложены основы нового раздела генетики — *генетики популяций*, изучающей законы *микроэволюции* (как назвал ее в 1927 г. Ю. А. Филипченко) в отличие от *макроэволюции*, оперирующей видами и более крупными таксономическими единицами.

18.1. Популяция — единица эволюционного процесса

Ознакомившись с основными закономерностями наследственности и изменчивости, мы вправе задаться вопросом: в какой мере эти закономерности помогают понять законы эволюций. Если биологическая эволюция — процесс изменения и дивергенции организмов во времени, то необходимо определить элементарную единицу этого процесса, удовлетворяющую следующим требованиям:

1. Она должна быть далее неделима и выступать во времени и пространстве как некое единое целое.

2. Она должна быть способна наследственно изменяться во времени, измеряемом биологическими поколениями.

3. Она должна существовать в конкретных природных условиях. Однако согласно этим требованиям отдельные организмы не являются единицами эволюции, поскольку смертны, и каждый из них представляет лишь одно биологическое поколение. Индивидуальные вариации, даже наследственные, могут не проявляться у данной особи и могут проявляться или не проявляться в следующих поколениях в соответствии с доминантно-рецессивными отношениями аллелей. Таким образом, единицу эволюции на протяжении поколений составляет некая группа особей.

Виды неравномерно распределены в пространстве, чаще всего в форме локальных популяций, которые разобщены территориально. По этой причине, а также из-за огромной численности и гетерогенности (в силу внутривидовой изменчивости) вид не может быть элементарной единицей эволюционного процесса.

Таким образом, *популяция является элементарной эволюционной структурой*, удовлетворяющей требованиям, сформулированным в начале этого раздела. *Популяцией называется общность индивидуумов определенного вида, связанных происхождением (родством), скрещиванием (гибридизацией) и общностью территории*.

Это определение популяции — наиболее общее. Некоторые характеристики ее могут исключаться, например, в случае популяций асексуальных организмов не приходится говорить о спаривании. Тем не менее нельзя отрицать существования популяций у лишенных полового процесса водорослей (*Chlorella*) или у некоторых простейших (амебы). Могут возникать затруднения с определением общности территории, например по отношению к перелетным птицам, очень широко мигрирующим в пространстве. Тем не менее приведенное определение популяции — основа для дальнейшего рассмотрения элементарного эволюционного события.

Элементарным эволюционным событием следует считать наследственное изменение популяции. Такое изменение может произойти, например, под влиянием отбора, длительно действующего в одном направлении. При этом нужно помнить, что отбор наиболее приспособленных форм происходит по их фенотипу, благоприятствуя одним и препятствуя другим в оставлении потомства, т. е. в распространении генетической информации. Отбор

по фенотипу тем не менее должен способствовать изменению соотношения генотипов в популяции и тем самым изменять ее наследственную структуру. Следует отметить, что элементарное эволюционное событие еще не представляет собой эволюционного процесса, а служит только его предпосылкой.

Итак, эволюционный процесс оперирует с популяциями, в пределах которых происходят свободные случайные скрещивания, или *панмиксия*. Такие популяции называют также *панмиктическими* или *менделевскими*. Наиболее распространена точка зрения, согласно которой процессы, происходящие в популяциях, — элементарные события микроэволюции — лежат в основе макроэволюционных преобразований.

18.2. Частоты генотипов и частоты аллелей

Главное отличие методологии популяционной генетики от уже привычной методологии генетического анализа заключается в том, что она имеет дело не с чистыми линиями и индивидуальными скрещиваниями, а с наследованием в больших совокупностях организмов, гетерогенных по своему генетическому составу.

Вся совокупность генов популяции называется ее *генофондом* и определяется как $2N$, где N — число особей. Таким образом, в каждом рассматриваемом локусе имеется $2N$ генов, когда речь идет о популяции диплоидных организмов. Это выражение справедливо для всех генов, кроме тех, которые находятся в X-хромосоме при гетерогаметности одного пола.

Важнейшей характеристикой популяции являются *частоты аллелей (генов) и генотипов*. Генофонд популяции воплощается в значениях *частот генотипов*, определяемых на репрезентативных (достаточно больших) выборках, которые должны делаться случайно для исключения субъективных ошибок экспериментатора.

В качестве примера приведем частоты генотипов по локусу *Lap 5* у *D. willistoni*. Этот локус контролирует структуру фермента *лейцинаминопептидазы*. Применяя технику электрофореза, можно определить те или иные изозимы с различной электрофоретической подвижностью у каждой мухи, отловленной в природной популяции. Характеристика одной из природных популяций *D. willistoni* по частотам генотипов представлена в табл. 18.1.

Используют также показатель, связанный с частотой ге-

Таблица 18.1. Генотипические частоты по гену *Lap5* (лейцинаминопептидаза) в популяции *D. willistoni* (Ф. Айала, 1984)

Генотип*	Число	Частота
98/98	2	0,004
100/100	172	0,344
103/103	54	0,108
98/100	38	0,076
98/103	20	0,040
100/103	214	0,428
Σ	500	1,000

* Каждая аллель характеризуется цифрой, соответствующей электрофоретической подвижности соответствующего изоэнома лейцинаминопептидазы.

Таблица 18.2. Частоты аллелей гена *Lap5 D. willistoni*, вычисленные на основе данных табл. 18.1

Аллель	Число	Частота
98	62	0,062
100	596	0,596
103	342	0,342
Σ	1000	1,000

нотипов, — частоту аллелей. Эта величина состоит из частоты гомозигот по данной аллели и половины частоты гетерозигот. Так, в рассмотренном примере (табл. 18.1) частота аллели 98 гена *Lap 5* равняется:

$$0,004 + \frac{1}{2}(0,076) + \frac{1}{2}(0,040) = 0,062.$$

Частоты трех аллелей гена *Lap 5 D. willistoni*, рассчитанные на основе частот генотипов (табл. 18.1), представлены в табл. 18.2. В тех случаях, когда каждая аллель может быть определена непосредственно, как в приведенном примере, установление их частот не вызывает затруднений.

Это далеко не всегда возможно вследствие доминирования. В этих случаях частоту рецессивной аллели можно определить, пользуясь законом Харди—Вайнберга.

18.3. Закон Харди — Вайнберга

Закон Харди—Вайнберга свидетельствует о том, что наследование как таковое не меняет частоты аллелей в популяции.

Если обозначить частоту аллели *A* через *p*, а частоту аллели *a* через *q*, то при наличии по данному локусу только двух аллелей в популяции: $pA + qa = 1$. Соотношение генотипов в таком случае будет: $(pA + qa)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$, в чем легко убедиться, воспользовавшись решеткой Пеннета:

×	<i>pA</i>	<i>qa</i>
<i>pA</i>	p^2AA	$pqAa$
<i>qa</i>	$pqAa$	q^2aa

Если в популяции для данного гена присутствуют три аллели с частотами *p*, *q* и *r*, то частоты генотипов также соответствуют формуле биномиального распределения:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$$

и т. д. при большем числе аллелей.

Представим, что аллели *A* и *a* встречаются с частотами 0,5, тогда в F_1 частоты генотипов будут:

×	0,5 <i>A</i>	0,5 <i>a</i>
0,5 <i>A</i>	0,25 <i>AA</i>	0,25 <i>Aa</i>
0,5 <i>a</i>	0,25 <i>Aa</i>	0,25 <i>aa</i>

Таким образом, $0,25AA + 0,50Aa + 0,25aa = 1$.

Нетрудно видеть, что при этом сохраняется исходная частота аллелей: 0,5*A* и 0,5*a*. В следующем поколении получают то же со-

отношение генотипов, как и в последующих поколениях. Пользуясь этим приемом и принимая иные значения p и q , легко убедиться, что уже в первом поколении в популяции устанавливается равновесие, сохраняющееся и во всех последующих.

Эта закономерность была очевидна для математика Х. Харди, и он хотел, чтобы она стала известна биологам, считавшим, что частота доминантной аллели в смешанной популяции может автоматически возрастать.

В строгом смысле закон Харди — Вайнберга приложим к бесконечно большим популяциям, в которых осуществляется панмиксия и на которые не действуют никакие внешние факторы. Только при этих условиях популяция находится в равновесии, т. е. частоты аллелей и генотипов в ней постоянны. Очевидно, что это идеальное представление о популяции никогда не реализуется в природных условиях. На популяцию постоянно действуют многочисленные внешние и внутренние факторы, нарушающие генетическое равновесие, которые будут рассмотрены далее.

Вернемся к вопросу, поставленному в конце предыдущего раздела: как определить частоту аллелей в популяции при полном доминировании? Поскольку, согласно формуле Харди—Вайнберга, $(pA + qa)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$, то, зная частоту рецессивных гомозигот, достаточно извлечь квадратный корень из полученной величины, и мы найдем частоту рецессивной аллели q . Частота доминантной аллели составит $p = 1 - q$. Определив таким образом частоты аллелей A и a , можно выяснить частоты всех генотипов в популяции.

Важным следствием закона Харди—Вайнберга является то, что редкие аллели в популяции присутствуют преимущественно в гетерозиготе. Например, если аллель a встречается с частотой 0,01, а аллель A — соответственно с частотой 0,99, то частота гетерозигот составит 0,0198, т. е. около 0,02, а рецессивных гомозигот — 0,0001. Таким образом, в гетерозиготном состоянии рецессивная аллель встречается более чем в 100 раз чаще, нежели в гомозиготном.

18.4. Проблема генетической гетерогенности природных популяций

Значение генетической гетерогенности природных популяций впервые по достоинству оценил С. С. Четвериков в своей классической работе «О некоторых моментах эволюционного процесса, с точки зрения современной генетики» (1926). С. С. Четвериков предвосхитил дальнейшее развитие популяционно-генетических исследований, предсказав, что естественные популяции должны быть в высокой степени генетически гетерогенны, что «вид, как губка, впитывает в себя гетерозиготные геновариации (так С. С. Четвериков называл мутации), сам оставаясь при этом

все время внешне (фенотипически) однородным»¹. Действительно, большинство возникающих мутаций рецессивно и при высокой численности популяции эти рецессивные мутации как бы растворяются, оказываясь в гетерозиготе. При этом вероятность их гомозиготизации обратно пропорциональна численности общей совокупности организмов.

Теоретические соображения, высказанные С. С. Четвериковым в этой работе, вскоре экспериментально подтвердились в его работе с П. Ф. Рокицким, С. М. Гершензоном, Д. Д. Ромашовым, Е. П. Балкашиной и др. В природной популяции *D. melanogaster* (из Геленджика) при инбридировании в лаборатории были найдены мутации, затрагивающие 33 разных гена.

Эти данные и последующие исследования многих других авторов подтвердили выводы С. С. Четверикова о генетической гетерогенности популяций и предвосхитили дискуссии о структуре популяций, которые возникли на западе в 40—50-х годах. В этот период рассматривались в основном две точки зрения на структуру природных популяций: *классическая модель* и *балансовая модель*. Согласно классической модели природные популяции представлены в основном гомозиготами по доминантным аллелям. Частота доминантных аллелей близка к единице за вычетом незначительной доли вредных рецессивных мутаций. С этой точки зрения эволюционный сдвиг в популяции основывается на отборе редких благоприятных аллелей.

Согласно балансовой модели популяции отдавалось предпочтение полиморфизму адаптивного «дикого» типа, т. е. для каждого гена не существует одной аллели дикого типа. Скорее большинство, если не все локусы, может быть представлено сериями аллелей с разными частотами в популяции. Таким образом, не существует некоего стандартного «дикого» типа. Балансовая модель исходила также из широкого распространения в природных популяциях эффекта *гетерозиса*, т. е. преимущества гетерозигот по сравнению с гомозиготами по тем же аллелям. (Подробнее о гетерозисе см. гл. 22.) В этом случае эволюционный сдвиг в популяции основывается на отборе не по одному гену, а по многим генам, аллели которых находятся в балансе друг с другом. При этом оптимальное для адаптации выражение каждой аллели координировано с другими генами и их аллелями.

Обе модели популяционной структуры основывались на представлении о том, что большинство вновь возникающих мутаций вредны.

Гипотеза С. С. Четверикова (1926) получала все больше доказательств по мере анализа особей, выделенных из природных популяций. Тем самым подтверждалась и балансовая модель по-

¹ Четвериков С. С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // В кн. «Проблемы общей биологии и генетики». Новосибирск. Наука. Сиб. отд., 1983. С. 189.

Таблица 18.3. Частоты хромосом *D. pseudoobscura* из Сьерра-Невада (Калифорния), содержащих мутации с различным влиянием на жизнеспособность при их гомозиготизации (Ф. Г. Добжанский, Б. Спасский, 1963)

Влияние на жизнеспособность	Частота хромосом, %		
	II	III	IV
Летали и полуметали	33,0	25,0	25,9
Сублетали (снижающие жизнеспособность по сравнению с диким типом)	62,6	58,7	51,8
Норма	4,3	16,3	22,3
Суперлетали	<0,1	<0,1	<0,1

пуляции. Пример генетической гетерогенности популяции *D. pseudoobscura* представлен в табл. 18.3.

Как видно, подавляющее большинство хромосом дрозофилы в природной популяции несет мутации, снижающие жизнеспособность. Высокую степень гетерозиготности биологического материала подтверждает и успех искусственного отбора по признакам, полезным для человека. Например, яйценоскость у кур породы белый леггорн изменилась благодаря отбору (с 1933 по 1965 г.) со 125,6 до 249,6 шт. в год. У кукурузы отбор изменил содержание белка в зерне с 10,9 до 19,4%, а отбор в противоположном направлении дал сдвиг с 10,9 до 4,9% содержания белка. В экспериментах с *D. melanogaster* успешная селекция осуществляется по 50 различным признакам.

18.5. Оценка генетической гетерогенности популяций

Большое значение для исследования генетической гетерогенности природных популяций имело применение метода *гель-электрофореза* при оценке изозимного разнообразия. Этот шаг, сделанный в 60-х годах благодаря успехам молекулярной биологии, приблизил к гену генетиков, изучающих популяции, позволил им непосредственно исследовать элементарные признаки в их молекулярном проявлении. Замены аминокислотных остатков в белках в результате мутаций могут изменять физико-химические свойства белков, в частности их электрофоретическую подвижность.

Образцы, полученные в природе (отдельные растения, животные или их органы), гомогенизируют, экстрагируют растворимые белки и наносят на гель: крахмальный, полиакриламидный, агарозный и т. д. После нескольких часов разделения белков в постоянном электрическом поле индивидуальные белки-ферменты выявляют в геле по их способности реагировать с субстратами, дающими цветные реакции. В результате изозимы одного фермента обнаруживаются на электрофореграммах в виде окрашенных полос, занимающих различное положение по отношению к стартовой позиции.

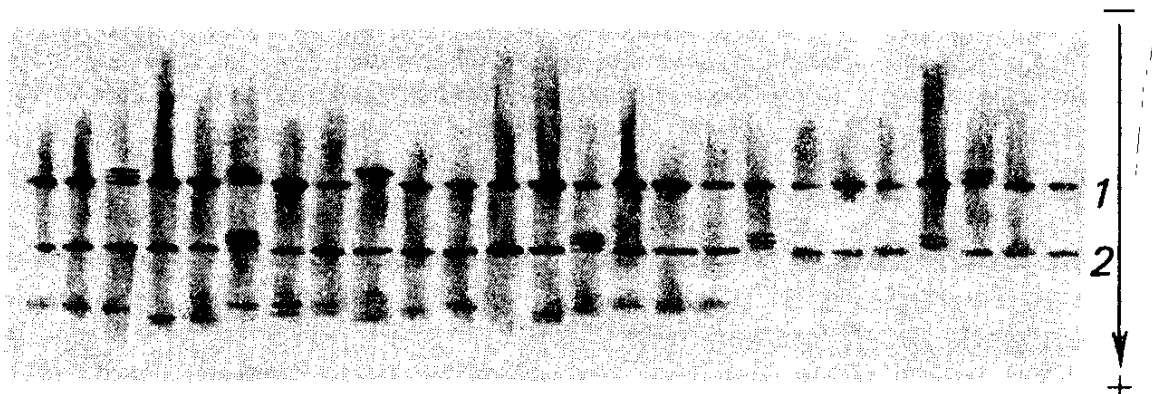


Рис. 18.1. Зимограммы аспартатаминотрансферазы (ААТ) 25 проростков из популяции сорнополевой ржи *Secale cereale* (Дагестан) (фото А. В. Войлокова).

Множественные формы ААТ (фермент — димер, состоящий из идентичных субъединиц) контролируют структурные гены: ААТ3 (изоцимы в зоне 1) — 20 гомозигот по быстрому изоциму, одна гомозигота по медленному изоциму и три гетерозиготы — размытые триплеты полос; ААТ2 (изоцимы в зоне 2) — 21 гомозигота по быстрому изоциму, четыре гетерозиготы; гомозигот по медленному изоциму не обнаружено. Изоцимы, контролируемые третьим геном ААТ1, не показаны

Если исследуемый фермент — мономер, т. е. не имеет четвертичной структуры, то у гетерозиготы по изоцимам обнаруживаются две полосы — два электрофоретических варианта. Если фермент состоит из двух идентичных субъединиц, то электрофоретических вариантов будет три, учитывая свободную комбинаторику субъединиц (рис. 18.1). При большем числе субъединиц соответственно увеличивается и число полос при электрофорезе. Встречаются и более сложные случаи, когда белки построены из идентичных и неидентичных субъединиц, т. е. контролируются двумя разными генами, например гемоглобин — $\alpha\alpha\beta\beta$ (рис. 18.2).

Такой метод оценки гетерозиготности особей в популяции обладает несравненно большей разрешающей способностью, нежели изучение разнообразия по морфологическим признакам. Однако он не оценивает все возможные варианты аллелей, присутствующие в популяции. При этом недооцениваются замены аминокислот, которые не меняют заряд молекулы, а такие варианты вполне реальны. Их существование выявили исследования с использованием систем ген—фермент (см. гл. 15). Возможно также существование мутантных аллелей, различающихся по третьим положениям отдельных кодонов, а как известно, очень часто замены нуклеотидов в третьем положении кодона оказываются синонимическими, т. е. не изменяют значения кодона, не приводят к замещениям аминокислотных остатков (см. гл. 15, рис. 15.16). Особенно сложно выявить в гетерозиготе так называемые нулевые аллели, несущие нонсенс-кодона и вследствие этого не представленные активными ферментными молекулами в изоцимном спектре. Существуют и другие причины отсутствия ферментативной активности.

Разрешающая способность анализа электрофоретических вариантов может быть повышена, если сравнивать подвижность не целых молекул фермента, а его пептидов, полученных после протеолитического расщепления. При этом применяют не только

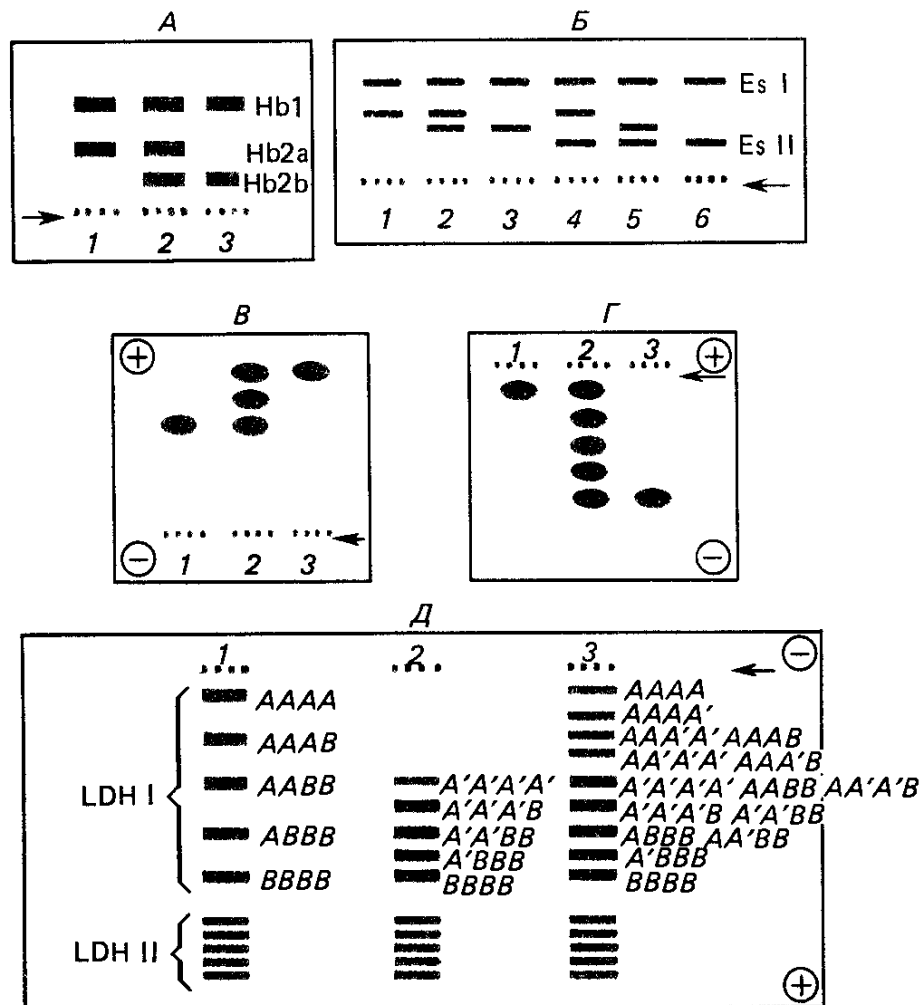


Рис. 18.2. Генетически контролируемые электрофоретические варианты белков (Ю. П. Алтухов, 1983).

А — гемоглобин моллюска *Anadora trapezia*, контролируемый двумя генами: 1, 3 — гомозиготы, 2 — гетерозигота. Лocus *Hb1* представлен одной аллелью, а *Hb2* — двумя.

Б — эстераза ракообразного *Mysis relicta*:

1, 3, 6 — гомозиготы, 2, 4, 5 — гетерозиготы. Лocus *EsI* — одна аллель, locus *EsII* — три аллели.

В — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа перепела *Coturnix coturnix*:

1, 3 — гомозиготы, 2 — гетерозигота. Фермент — димер, поэтому у гетерозигот видны три зоны активности. Средняя зона — гибридный фермент.

Г — маликэнзим мыши *Mus musculus*.

Фермент — тетрамер, состоящий из идентичных субъединиц: 1, 3 — гомозиготы, 2 — гетерозигота, дающая вследствие случайной комбинаторики субъединиц пять изоформ.

Д — мышечная лактатдегидрогеназа кеты *Oncorhynchus keta*.

Видны две группы изоформ (показаны фигурными скобками). В каждой группе — ферменты тетрамеры, кодируемые двумя генами. Гены *LDHII* гомозиготны. В одном из двух генов, кодирующих *LDHI*, гетерозиготность AA^1 : 1 и 2 — гомозиготы, 3 — гетерозигота. Поскольку по примененной методике положение ряда изоформ перекрывается, у гетерозиготы обнаруживается 9 полос вместо 15.

Данные получены разными методами. Во всех случаях стрелка указывает старт

одномерный, но и двумерный форе́з или хроматографию. Так удастся обнаружить дополнительные различия, ускользающие при использовании метода обычного электрофореза целых белков. Наконец, с появлением радиоактивных зондов — клонированных копий отдельных генов — стал возможен анализ непосредственно

вариантов самих генов, сравнение электрофоретической подвижности фрагментов геномной ДНК, расщепляемой той или иной рестриктазой. При этом конкретные гены и их фрагменты выявляются по гибридизации с радиоактивными зондами — клонированными фрагментами ДНК.

Метод зимограмм для оценки генетической гетерогенности популяций получил широкое распространение. Исследовать сотню особей из популяции по двум десяткам ферментов стало вполне реальным делом. Как при этом оценивать полученные результаты количественно? Для этого существуют две величины: полиморфизм (P) и гетерозиготность (H).

Полиморфизм (P) популяции оценивается долей полиморфных локусов из всех исследованных. Так, из 30 локусов, изученных у калифорнийского морского червя *Phoronopsis viridis*, в 18 обнаружены аллельные варианты, а в 12 вариаций не зарегистрировано. В этом случае: $P = 18 : 30 = 0,60$.

На материале нескольких популяций одного вида можно вычислить средний полиморфизм. Например, величина P была определена еще для трех популяций *P. viridis* (табл. 18.4) и составляла соответственно 0,50; 0,53; 0,47. Тогда средний полиморфизм будет оцениваться как

$$P_{\text{ср}} = \frac{0,60 + 0,50 + 0,53 + 0,47}{4} = 0,525.$$

Вероятность обнаружения дополнительных полиморфных локусов среди тех, которые уже были исследованы (например, в табл. 18.4), может быть пропорциональна увеличению выборки. В то же время уровень полиморфизма по разным локусам может быть неодинаков. В связи с этими обстоятельствами возникают вопросы: какую долю полиморфности по данному локусу принимать за значимую? Как велика должна быть выборка для окончательного суждения? Объективно ответить на эти вопросы трудно. Можно только условно принять определенный уровень значимости получаемых величин. Поэтому необходимо также сравнивать частоты гетерозиготности (H) по разным локусам в популяции.

Гетерозиготность (H) по данному локусу определяется как отношение гетерозигот к общему числу исследованных особей

Таблица 18.4. Полиморфизм (P) в четырех популяциях *Phoronopsis viridis* (Ф. Айала, 1984)

Популяция	Число исследованных локусов		P	$P_{\text{ср}}$
	полиморфных	всего		
1	18	30	$18/30 = 0,60$	} 0,525
2	15	30	$15/30 = 0,50$	
3	16	30	$16/30 = 0,53$	
4	14	30	$14/30 = 0,47$	

популяции. На основе данных по отдельным локусам определяют среднюю гетерозиготность популяции H_{cp} (табл. 18.5).

Реальные представления об уровне гетерозиготности трех популяций дают результаты, полученные

Ю. П. Алтуховым для четырех локусов у горбуши *Oncorhynchus gorbusha* (рис. 18.3). Величина H колеблется между значениями 4 и 20 %.

Поскольку популяции, несомненно, различаются по степени панмиксии (например, перекрестноопыляющиеся и самоопылятели), а также по селективной ценности гетерозигот, то и реальная гетерозиготность в них будет различной даже при одинаковых частотах аллелей. С учетом этого обстоятельства вычисляют так называемую *ожидаемую гетерозиготность* на основе условного предположения, что в популяциях всегда осуществляется полная панмиксия. Тогда при наличии четырех аллелей одного гена с частотами f_1, f_2, f_3, f_4 частота их гомозигот ожидается как $f_1^2, f_2^2, f_3^2, f_4^2$, а ожидаемая гетерозиготность будет составлять:

$$H_{ex} = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 + f_4^2).$$

Средний полиморфизм (P) и средняя гетерозиготность (H) определены для многих видов (рис. 18.4). Беспозвоночные в среднем более генетически изменчивы, чем позвоночные. $H_{cp} = 13,4\%$ для первых и $6,0\%$ для вторых. Перекрестноопыляющиеся растения значительно изменчивее, чем самоопылятели ($H_{cp} =$ соответственно 19% и 6%). По данным электрофореза, средняя гетерозиготность человеческих популяций $6,7\%$. Интересно рассмотреть, что означает эта величина для человека. Примем, что геном

Таблица 18.5. Вычисление средней гетерозиготности популяции (Ф. Айала, 1984)

Локус	Число исследованных особей		H	H_{cp}
	гетерозигот	всего		
1	25	100	0,25	} 0,19
2	42	100	0,42	
3	9	100	0,09	
4	0	100	0	

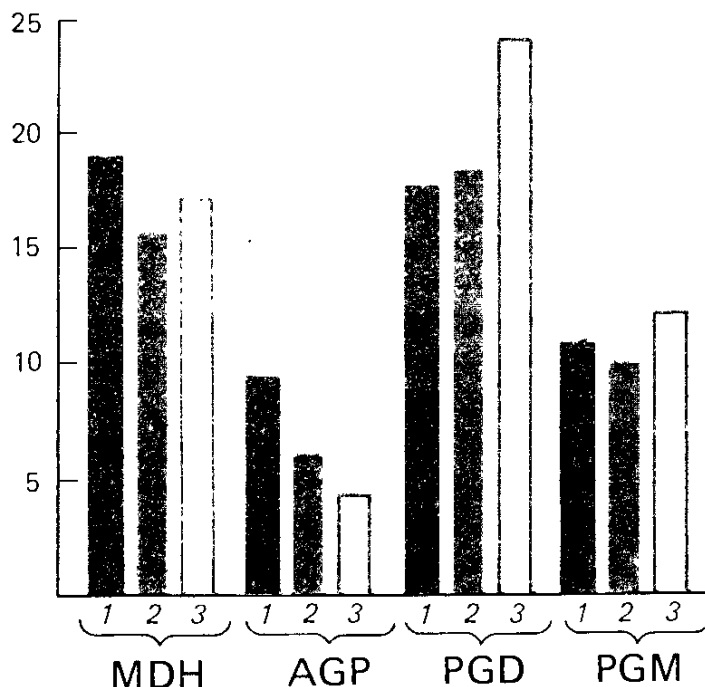


Рис. 18.3. Гетерозиготность (H), выраженная в процентах по генам, контролирующим четыре фермента горбуши, — *Oncorhynchus gorbusha* (Ю. П. Алтухов, 1985).

MDH — малатдегидрогеназа, AGP — α -глицерофосфатдегидрогеназа, PGD — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, PGM — фосфоглюкомутаза.
1, 2, 3 — три разные популяции

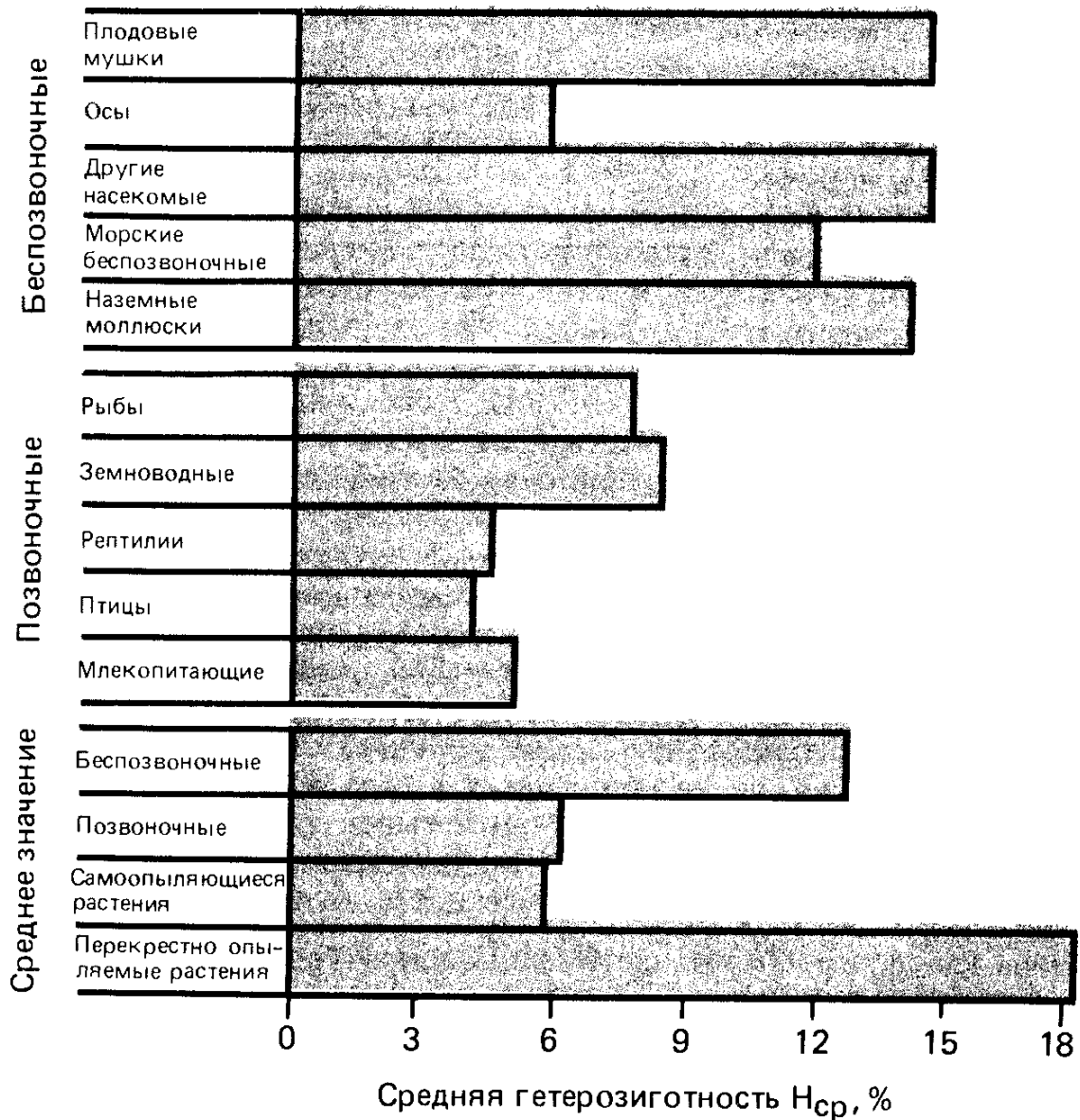


Рис. 18.4. Масштабы изменчивости в генофондах различных организмов — средняя гетерозиготность (Дж. Стеббинс, Ф. Айала, 1985)

человека включает 30 000 структурных генов, и эта величина, очевидно, заниженная. Тогда некоторый средний индивидуум гетерозиготен не менее чем по $30\,000 \times 0,067 = 2010$ генам. Следовательно, потенциально такая полигетерозигота могла бы образовать 2^{2010} , или около 10^{65} различных типов гамет. Эта потенциальная комбинативная изменчивость никогда не реализуется ни у отдельного человека, ни у всего человечества. Для сравнения скажем, что по оценкам физиков число протонов и нейтронов во Вселенной составляет около 10^{76} .

Этот пример показывает, что потенциальные возможности комбинативной изменчивости, основанной на естественной гетерозиготности популяций и видов, составляют колоссальный резерв эволюционного процесса. Таким образом, все развитие генетики популяций вполне подтвердило выводы, сделанные в 1926 г. С. С. Четвериковым о генетическом полиморфизме природных популяций, о высоком уровне их гетерозиготности.

18.6. Элементарное эволюционное событие — изменение частот аллелей в популяции

Изменение и дивергенция биологических форм во времени, как был определен в начале этой главы процесс эволюции, основываются на двух главных явлениях: *изменчивости* и *изменении частот аллелей и генотипов*. Изменение частот аллелей и генотипов в популяции составляет сущность элементарного эволюционного события.

Мы убедились, что сам по себе отбор в чистых линиях, т. е. в отсутствие генетической гетерогенности, не создает новых форм. Вместе с тем и наследование в гетерогенной популяции само по себе не изменяет частот аллелей. К изменению частот аллелей и генотипов в генетически гетерогенной популяции приводит отбор.

Изменение частот аллелей и генотипов возможно не только вследствие *отбора*, но и в результате *мутаций, миграции особей, случайного дрейфа генов, изоляции*, а также *избирательного, или ассортативного, скрещивания*. Все эти факторы, действующие в популяциях, называют *факторами динамики популяций*.

Отбор

Генетическая гетерогенность, широко распространенная в природных популяциях, составляет основу эффективности дарвиновского естественного отбора.

Прямую корреляцию между степенью гетерогенности популяции и скоростью эволюционного изменения вследствие естественного отбора математически обосновал Р. А. Фишер (1930) в своей основной теореме естественного отбора: скорость увеличения приспособленности какой-либо популяции в любой отрезок времени равна ее генетической изменчивости по приспособленности в это же время. В этом случае под приспособленностью понимают относительную скорость воспроизводства.

Эта теорема строго приложима только к варьированию за счет аллелей одного локуса и только при определенных условиях среды. Тем не менее понятно, что чем больше изменчивых генов и чем больше аллелей каждого гена существует, тем больше шансов для изменения частоты одних аллелей за счет других при отборе.

Естественный отбор действует на разные группы организмов в популяции в зависимости от их приспособленности (W). Сравнивая приспособленность нескольких групп особей, наибольшую принимают за единицу, а приспособленность остальных групп выражают в долях единицы. Например, если приспособленность для гомозигот AA и гетерозигот Aa равна 1, а для гомозигот aa — 0,9, то интенсивность естественного отбора, или коэффициент отбора (S), вычисляется как $S = W_{AA} - W_{aa} = 1 - 0,9 = 0,1$.

Тогда в популяции диплоидных организмов при условии пол-

ного доминирования можно рассчитать частоты аллелей в следующем поколении после начала действия отбора. Распределение генотипов будет соответствовать представленному в табл. 18.6.

Таблица 18.6. Изменение частот генотипов в течение одного поколения при коэффициенте отбора, равном S

Генотипы		AA	Aa	aa	Сумма
Соотношение	до отбора	p_0^2	$2p_0q_0$	q_0^2	1
	в F_1 после отбора	p_0^2	$2p_0q_0$	$q_0^2(1-S)$	$1-Sq_0^2$

Примечание. p_0 и q_0 — частоты аллелей A и a до отбора. Отбор действует против рецессивных гомозигот.

Частота аллели A в F_1 после отбора будет:

$$p_1 = \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1 - Sq_0^2}.$$

Изменение частоты аллели A за поколение составит:

$$\Delta p = p_1 - p_0 = \frac{p_0^2 + p_0q_0}{1 - Sq_0^2} - p_0 = \frac{Sp_0q_0^2}{1 - Sq_0^2}.$$

При малых значениях Sq^2

$$\Delta p \approx Spq^2.$$

Например, если $p_0 = 0,9$, а $q_0 = 0,1$, то при $S = 0,1$

$$\Delta p \approx 0,1 \cdot 0,9 \cdot 0,1^2 = 0,0009;$$

$$p_1 = 0,9009.$$

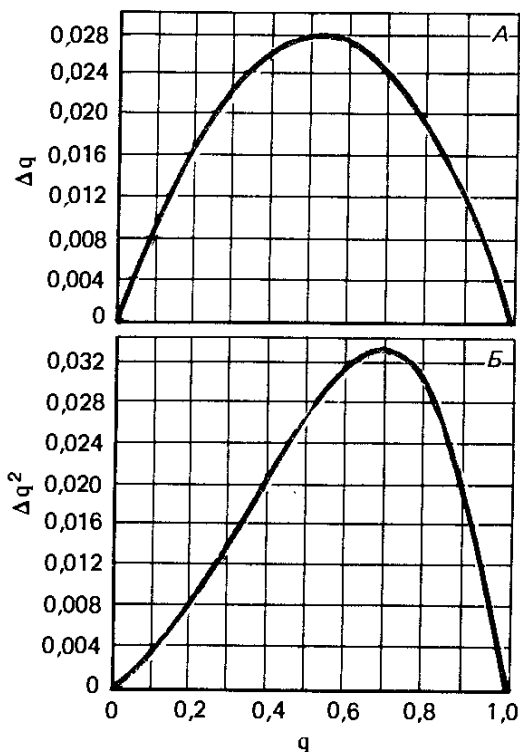


Рис. 18.5. Изменение частоты аллелей (Δq), против которой ведется отбор с интенсивностью $S = 0,2$ при разной исходной частоте q (по О. Солбриг, Д. Солбриг, 182). A — в отсутствие доминирования; B — при полном доминировании

При крайних значениях частот аллелей отбор действует наименее эффективно. Наиболее эффективен отбор при средних значениях p и q . Эту закономерность иллюстрируют кривые на рис. 18.5, показывающие изменения частоты аллели a (Δq) при отборе против рецессивных гомозигот в зависимости от величины q , а также против одной из аллелей в отсутствие доминирования.

Даже при полной элиминации гомозигот aa при низкой частоте аллели a в популяции требуется большое число поколений для ощутимого изменения значения q .

Так, если $q_0 = 0,01$, то для снижения этой величины до $0,001$ требуется 900 поколений, а до $0,0001$ — 9900 поколений.

При низких частотах рецессивных аллелей отбор в пользу рецессивных гомозигот также происходит очень медленно. Например, рецессивная наследственная болезнь человека — фенилкетонурия некогда представляла собой летальный признак, однако теперь благодаря ранней диагностике и специальной диете (см. гл. 20) можно спасти всех детей, больных фенилкетонурией. Частота фенилкетонурии в популяции человека составляет $0,006$. Даже при спасении всех больных детей эта частота повышается с $0,0006$ до $0,006036$ за одно поколение.

Все эти примеры показывают, что прежде чем отбор начнет ощутимо изменять частоты рецессивных аллелей, они должны достигнуть некоторой величины в результате мутационного процесса или действия иных факторов динамики популяций.

Эффективность отбора против доминантных аллелей значительно выше, чем против рецессивных; так, например, в случае полного доминирования при полной элиминации генотипов AA и Aa успех отбора достигается в течение одного поколения и частота аллели A сводится к 0. В действительности отбор очень часто действует не в пользу гомозигот, а благоприятствует гетерозиготам, что способствует поддержанию полиморфизма природных популяций.

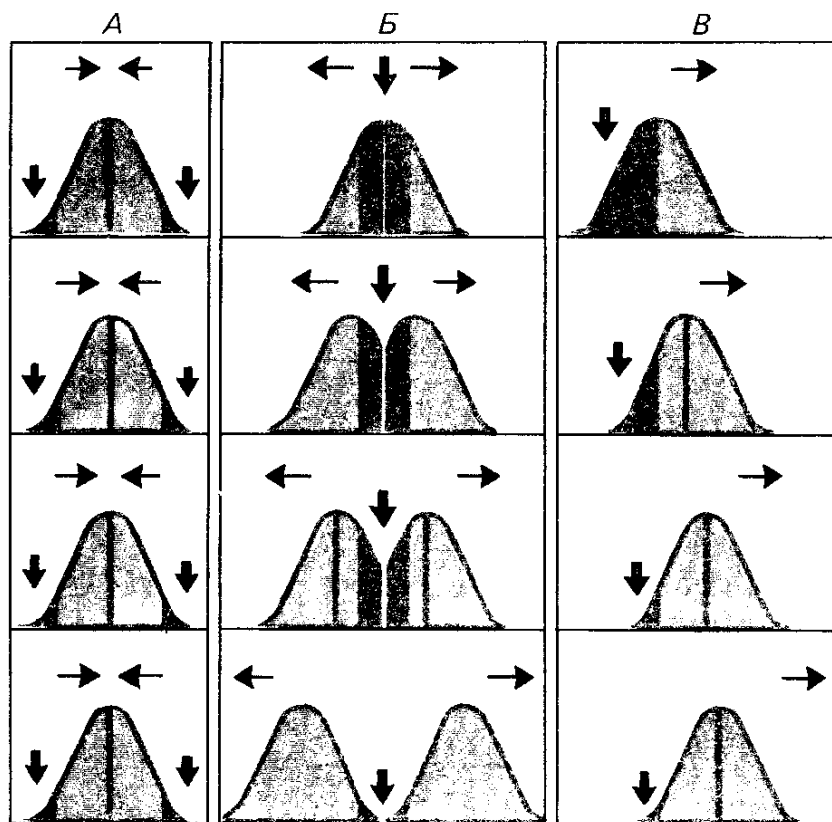


Рис. 18.6. Три главных типа отбора (О. Солбриг, Д. Солбриг, 1982). А — стабилизирующий; Б — дизруптивный; В — движущий.

Затемненные области — фенотипы, элиминируемые отбором

Как отмечалось, отбор действует на фенотипы, а косвенно сказывается на изменении частот аллелей. В зависимости от того какое влияние оказывает отбор на признаки, различают *три типа отбора*:

1) *стабилизирующий*, способствующий сохранению среднего значения признака (теория стабилизирующего отбора разработана И. И. Шмальгаузенем);

2) *дизруптивный*, или *рассекающий*, способствующий стабилизации крайних значений признака;

3) *направленный*, или *движущий*, способствующий непрерывному изменению признака в определенном направлении (рис. 18.6).

Д. К. Беляев ввел также понятие «дестабилизирующий отбор». Этим термином он обозначил повышение разнообразия в популяции при резком изменении направления отбора, в частности, в популяциях животных при их одомашнивании.

Мутационный процесс

Мутационный процесс — основа возникновения гетерогенности популяции. Из-за наличия мутационного процесса трудно говорить о существовании истинно чистых — гомозиготных линий в течение длительного времени. Тем не менее можно представить, что существует абсолютно гомозиготная (AA) совокупность ($p = 1$), в которой происходит мутационный процесс $A \rightarrow a$ с частотой u на гамету за одно поколение. Тогда в следующем поколении аллели A и a будут встречаться с частотами: $p = 1 - u$ и $q = u$. Однако происходят не только прямые мутации, но и обратные с частотой v , а в популяции имеются аллели как A , так и a с частотами соответственно p и q . Часть аллелей a будет превращаться в A с частотой v . Тогда изменение частоты аллели A под влиянием *мутационного давления* за одно поколение можно выразить как $\Delta p = vq - up$.

Частоты аллелей могут изменяться за счет мутационного процесса только до тех пор, пока vq не станет равным up . В такой ситуации наступает состояние равновесия. Значение p , при котором наступает равновесие, можно найти из выражения $vq = up$ (состояние равновесия). Преобразуя это уравнение, получим $up = v(1 - p)$, поскольку $p + q = 1$. Тогда $p(u + v) = v$, а $p = v/(u + v)$.

Точно так же и $q = u/(u + v)$.

Представим себе, что мутации $A \rightarrow a$ происходят с частотой $u = 1 \cdot 10^{-5}$ на гамету за поколение, а мутации $a \rightarrow A$ — с частотой $v = 5 \cdot 10^{-5}$. Тогда можно рассчитать величины p и q для равновесного состояния:

$$p = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{1 \cdot 10^{-5} + 5 \cdot 10^{-5}} = 0,83,$$

а q тогда будет равно $1 - 0,83 = 0,17$, т. е. в отсутствие мутационного давления частота аллели A будет значительно превышать частоту аллели a — обратно пропорционально частотам мутирования $A \rightarrow a$.

Таблица 18.7. Вероятность сохранения и элиминации одной мутации в панмиктической популяции (Р. Фишер, 1958)

Число поколений	Вероятность элиминации, если мутация		Разность	Вероятность сохранения, если мутация	
	нейтральная	имеет 1 %-ное преимущество		нейтральная	имеет 1 %-ное преимущество
1	0,3679	0,3642	0,0037	0,6321	0,6358
3	0,6259	0,6197	0,0062	0,3741	0,3803
7	0,7905	0,7825	0,0080	0,2095	0,2175
15	0,8873	0,8783	0,0090	0,1127	0,1217
31	0,9411	0,9313	0,0098	0,0589	0,0687
63	0,9698	0,9591	0,0107	0,0302	0,0409
127	0,9847	0,9729	0,0118	0,0153	0,0271
Предел	1,0000	0,9803	0,0197	0,0000	0,0197

Подобное равновесное состояние популяции может быть достигнуто при достаточно больших исходных значениях p и q . Р. Фишер (1930) подсчитал, что в панмиктической популяции вероятность сохранения селективно нейтральной мутации близка к нулю. Если вновь возникающая мутация имеет селективное преимущество в 1 %, то вероятность ее сохранения равна приблизительно 2 % (табл. 18.7). Таким образом, сам по себе мутационный процесс, мутационное давление недостаточны для распространения рецессивной мутации.

Поток генов

Поток генов, или миграции особей, представляет собой обмен генами между популяциями. Если популяции имеют разные частоты аллелей, то миграция может приводить к изменению частот аллелей, привносимых особями — *иммигрантами*. Непосредственные результаты такого события сходны с последствиями возникновения мутаций, однако миграция изменяет частоты аллелей значительно быстрее, чем мутации. Для вычисления эффекта миграции используют те же уравнения, что и для мутационного процесса. Влияние потока генов на динамику популяций тех или иных организмов зависит от скорости распространения гамет и расстояний между локальными популяциями. Одни виды, например человек, очень подвижны, другие, например некоторые бабочки, очень ограничены в своих миграциях.

Дрейф генов

Дрейф генов, или генетико-автоматические процессы, также оказывает влияние на частоты аллелей в популяциях, как показали в начале 30-х годов Н. П. Дубинин и Д. Д. Ромашов в СССР и С. Райт в США.

Мы исходили из предположения о том, что популяции имеют неограниченную численность и в них происходит панмиксия.

В действительности эти условия никогда не выполняются. В зависимости от условий существования популяции проходят через периоды максимальной и минимальной численности. Это так называемые волны жизни. Кроме того, неравномерное пространственное распределение особей в популяциях растений, а также предпочтительные скрещивания в популяциях животных нарушают случайность скрещиваний (панмиксию).

В результате этих обстоятельств генофонд каждого следующего поколения формируется некоторой выборкой из особей родительского поколения. Поэтому он подвержен изменчивости, обусловленной ошибкой выборки. Чем меньше выборка, тем больше ошибка, т. е. тем больше колебания частот аллелей. Эти изменения частот аллелей чисто случайны и не являются следствием отбора. Если популяция подвергается отбору, то любое случайное изменение, происходящее в направлении действия отбора, повышает его эффективность. Любое случайное изменение в противоположном направлении замедляет отбор.

Подобные случайные изменения могут привести к элиминации аллели, обуславливающей наибольшую приспособленность, и к закреплению в популяции аллели, обуславливающей меньшую приспособленность, если утраченная аллель не будет восстановлена в результате мутационного процесса.

Если дрейф генов приводит к снижению приспособленности популяции, то она может вымереть. В то же время иногда возникают особи, значительно отличающиеся от остальных членов популяции и обладающие при этом высоким уровнем приспособленности. Такие случаи Э. Майр называл «генетической революцией». Некоторые биологи считают, что каждый новый вид возникает в результате генетической революции. Однако такая точка зрения не общепринята.

При возникновении новой популяции за счет иммиграции очень малого числа особей многие аллели исходной, или материнской, популяции утрачиваются. Тогда новая популяция развивается на основе обедненного поначалу разнообразия генофонда, изменяющегося в результате мутаций, отбора и других факторов динамики популяций. Влияние исходного, ограниченного разнообразия генофонда на последующую судьбу популяции названо *эффектом основателя*.

Инбридинг

Конечная численность реальных популяций приводит еще к одному важному последствию. Рассмотрим его на примере человека. У каждого из нас двое родителей, четверо бабушек и дедушек, восемь прабабушек и прадедушек и т. д. На n поколений в прошлом каждый из нас имеет 2^n предков. За 20 последних поколений каждый имел более 700 тыс. предков. Примем, что на каждое столетие приходится четыре поколения. В этом случае на 20 поколений требуется время в пять столетий. Если бы все население

такой страны, как США, не связанное непосредственным родством (т. е. один из каждых 20 человек), имело абсолютно независимые наборы предков, то в XV веке в стране должно было бы жить 3 триллиона человек. Эта цифра на несколько порядков превышает все население земного шара в настоящее время. Ситуация совершенно нереальная и, следовательно, родство между людьми гораздо больше, чем это может казаться на первый взгляд.

Аналогичные рассуждения применимы к любой популяции и таким образом в популяциях можно измерить среднюю степень кровного родства особей (α): $\alpha = \sum p_i F_i$, где p_i — частота особей с коэффициентом инбридинга F_i .

Инбридинг имеет несколько следствий для популяции:

- 1) повышение гомозиготности;
- 2) проявление рецессивных аллелей;
- 3) при обычно отрицательном эффекте рецессивных аллелей инбридинг влечет за собой ослабление особей (*инбредная депрессия*);
- 4) повышение фенотипической изменчивости вследствие выхода в гомозиготу многих аллелей.

Действие инбридинга на генотипическую структуру популяции можно показать на примере популяции, имеющей равные частоты аллелей: $p = q = 0,5$. В такой популяции соотношение генотипов $0,25AA:0,5Aa:0,25aa$.

Если с этого момента размножение происходит только посредством самооплодотворения, то доля гетерозигот в каждом поколении уменьшается наполовину и постепенно приводит к практически полной гомозиготизации (табл. 18.8). В общем виде ожидаемая частота гетерозигот в поколении n составит $2pq \times (\frac{1}{2})^n$, где $2pq$ — частота гетерозигот в нулевом поколении, а n — число поколений, в которых происходило самооплодотворение.

Если в популяции часть особей размножается самооплодотворением, а остальные скрещиваются случайно, то вводится упомянутая уже величина — *коэффициент инбридинга* F . $F = \frac{s}{2-s}$, где s — доля особей, подвергающихся самооплодотворению.

Степень кровного родства, т. е. уровень инбридинга, зависит от изменения численности популяций, от наличия асортативных, или избирательных, скрещиваний в природных условиях, а также от различных способов разведения при селекционном процессе (см. гл. 22).

Таблица 18.8. Соотношение генотипов в популяции, размножающейся посредством самооплодотворения (инбридинг)

Поколение	Генотипы		
	AA	Aa	aa
0	—	1	—
1	1	2	1
2	3	2	3
3	7	2	7
4	15	2	15
5	31	2	31
10	1023	2	1023
n	$2^n - 1$	2	$2^n - 1$

Изоляция

Внутривидовая изоляция популяций друг от друга означает прекращение потока генов. Если популяции остаются изолированными на протяжении ряда поколений, то они могут дивергировать, или дифференцироваться, по генотипической структуре, особенно если отбор в них действует в разных направлениях. Дифференциация таких популяций может дать начало новым видам.

Изоляцию обеспечивают географические, или территориально-механические, и биологические факторы. Биологические факторы изоляции в конечном итоге основаны на генетических факторах. Даже поведенческие, или этологические, факторы изоляции базируются на генетических различиях особей. В то же время следует выделить и собственно генетические факторы изоляции, такие, как: 1) полиплоидия, 2) хромосомные перестройки, 3) ядерно-цитоплазматическая несовместимость, 4) несовместимость экспрессии отдельных генов вследствие их мутационных изменений.

Генетические, так же как и другие факторы изоляции, увеличивают вероятность скрещивания между родственными особями и тем самым повышают степень инбридинга в популяциях.

Те или иные формы изоляции лежат в основе видообразования и приводят к различной экологической специализации биологических форм, к освоению ими новых экологических ниш.

Итак, в настоящей главе рассмотрены основные закономерности микроэволюции, т. е. генетические процессы, происходящие в популяциях. Отправным моментом для анализа элементарного эволюционного события является принятие некоторых формальных условий, никогда не встречающихся в природе, например бесконечно большие размеры популяций, полная панмиксия в популяциях и некоторые другие. По необходимости различные факторы динамики популяций вначале рассматривались изолированно друг от друга. В действительности в природе все они действуют взаимосвязанно. Не всегда ясны результаты взаимодействия этих факторов, однако очевидно, что в генетике популяций выработаны полезные ограничения: например, неэффективность отбора в отсутствие генетической гетерогенности, неизменность частот аллелей при наследовании в равновесном состоянии популяции и др. Эти ограничения следует иметь в виду при рассмотрении процесса эволюции.

Более подробно закономерности микроэволюции рассматриваются в отдельном курсе генетики популяций.

В заключение следует сказать, что современное развитие популяционной генетики обогащается по меньшей мере двумя многообещающими подходами. С одной стороны — это моделирование популяционно-генетических процессов на ЭВМ, которое позволяет изучать и прогнозировать последствия взаимодействия различных

факторов микроэволюции и видообразования. С другой стороны — развитие *экологической генетики*, которая рассматривает популяционную динамику в реальных природных условиях. Важной составной частью экологической генетики является изучение генетического контроля взаимодействия разных организмов между собой и с факторами окружающей среды. Такой подход позволяет вычленять характер наследственной изменчивости различных организмов, существенный для их взаимодействия. Тем самым создается возможность для создания элементарных *эколого-генетических моделей*, состоящих из организмов, облигатно связанных пищевыми цепями как продуценты и потребители. В этой области генетика объединяет свои усилия с новой биологической дисциплиной — *химической экологией*. Все это позволяет приблизиться к реальным процессам, происходящим в природе.

Вопросы к главе 18

1. Определите величину H для популяции, выборка из которой представлена на рис. 18.1, по гену $AAT\ 3$, по гену $AAT\ 2$.
2. Что называется элементарной эволюционной структурой?
3. Что является элементарным эволюционным событием?
4. Перечислите факторы динамики популяции.
5. Что такое полиморфизм популяции и какой величиной он характеризуется?
6. Что произойдет с популяцией, подчиняющейся закону Харди—Вайнберга, за 10 поколений, если исходное соотношение генотипов в ней $0,2AA:0,4Aa:0,4aa$?
7. В некоей популяции частота дальтонизма среди мужчин составляет 0,08. Этот дефект обусловлен сцепленной с полом рецессивной аллелью. Каковы ожидаемые частоты всех трех генотипов у женщин?
8. Искусственно созданная популяция включает 60 % особей генотипа AA , 30 % — Aa и 10 % — aa . Определите генотипическую структуру популяции в F_3 в случае самоопыления и панмиксии.
9. В одной популяции имеются три генотипа по аутосомному локусу в соотношении $9/16AA$, $6/16Aa$ и $1/16aa$. Находится ли данная популяция в состоянии генетического равновесия?
10. Предположим, что частота мутаций $A \rightarrow a$ равна 10^{-6} , причем обратные мутации отсутствуют. Какова будет частота аллели A через 10, 1000, 100 000 поколений?
11. В человеческой популяции существуют три генотипа по локусу $Pgm\ 1$. В выборке 1110 человек.

<i>Генотип</i>	1/1	1/2	2/2
<i>Число</i>	634	391	85

Цифрами 1 и 2 обозначены аллели двух типов. Определите частоты аллелей.

12. Прямые мутации в локусе A происходят с частотой $2 \cdot 10^{-5}$, а обратные — с частотой $3 \cdot 10^{-7}$. Каковы ожидаемые частоты аллелей A и a в популяции при ее равновесном состоянии, если никакие другие процессы в ней не происходят?

13. Частоты групп крови системы АВО в некоей популяции человека следующие: $A = 0,45$, $B = 0,13$, $AB = 0,06$, $O = 0,36$. Определите частоты аллелей гена I .

Эволюция гена

Рассматривая генетические процессы, происходящие в популяциях, мы исходили из того, что закономерности микроэволюции являются основой макроэволюции. В то же время предполагалось, что генофонд популяции остается постоянным. Очевидно, в процессе эволюции число генов изменялось, изменялись и сами гены. Поэтому возникает законный вопрос: как эволюционируют гены?

19.1. Сравнительная молекулярная биология гена

К началу 70-х годов сложилось некоторое усредненное представление об организации генетического материала, основанное на результатах исследования тонкой структуры гена у бактерий и бактериофагов (см. гл. 15). «То, что справедливо для кишечной палочки, справедливо и для слона» — шуточный афоризм, приписываемый Ф. Жакобу, вполне отражает общие представления этого периода. Довольно скоро все резко изменилось. При внимательном исследовании у эукариот не были обнаружены опероны.

Достижения генной инженерии, сделавшей возможным выделение и клонирование индивидуальных генов, а также изучение первичной структуры ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции, методов секвенирования (см. гл. 15) сильно поколебали представления об универсальности структуры гена. Теория гена вступила в очередной критический период.

Итак, гены весьма разнообразны: они могут быть (а могут и не быть) организованы в опероны; контролируют одну или несколько ферментативных реакций; содержат или не содержат интроны (не кодирующие участки); могут быть расположены в строгой линейной последовательности или перекрываться структурно.

Существуют гены, кодирующие молекулы полипептидов и молекулы тРНК и рРНК. Все это касается так называемых структурных генов, о которых в основном и пойдет речь. Кроме того, существуют и такие элементы генома, которые рискованно называть генами: регуляторные области, контролирующие включение и выключение генов. Эти участки определяют диапазон ненаследственной изменчивости. Существуют мигрирующие элементы, перемещения которых приводят к перестройкам генома и тем самым вносят свой вклад в наследственную изменчивость. Регуляторные и мигрирующие элементы часто сходны по структуре. Наконец, известны *псевдогены* и повторяющиеся участки ДНК, которые, по мнению некоторых исследователей, ничего не кодируют и нужны только для

собственного воспроизведения. Это так называемая «эгоистичная ДНК». Сразу же необходимо оговориться: такой эпитет, по-видимому, отражает недостаток наших знаний.

Можно ли разобратся во всем этом разнообразии генетических элементов? Можно ли заметить какие-либо общие тенденции в эволюции гена как основного носителя генетической дискретности?

Простые подходы, основанные, например, на сравнении количества ДНК у разных организмов, позволяют

заметить только одну общую тенденцию—увеличение количества ДНК на клетку по мере усложнения биологической организации, но и из этого правила есть исключения (рис. 19.1).

Более продуктивен подход, основанный на объединении анализа тонкой структуры генов генетическими и молекулярно-биологическими методами. Сопоставим основные характеристики организации генов в двух надцарствах прокариот и эукариот в сравнении с генами их вирусов.

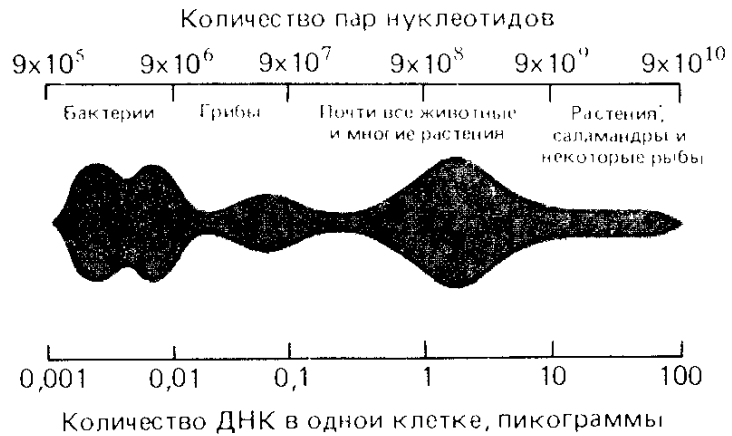


Рис. 19.1. Содержание ДНК в клетке (Дж. Стеббинс, Ф. Айала, 1985).

Количество ДНК, как правило, возрастает с усложнением организмов. Толщина полосы в каждой точке примерно соответствует числу видов и показывает, что внутри группы организмов у большинства видов содержание ДНК на клетку примерно одинаково. На правом конце диаграммы — исключения из правила. Клетки некоторых менее сложных организмов содержат очень много ДНК: ряд семенных растений, саламандры и такие примитивные рыбы, как осетр, панцирная рыба и целакант

Гены бактерий

Наиболее подробно строение генетического материала изучено у бактерий кишечной группы: *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Для их генетической организации характерны опероны — регулируемые единицы транскрипции (см. гл. 16). Гены одного оперона расположены в хромосоме бактерий рядом и кодируют ферменты, обычно осуществляющие последовательные или близкие реакции синтеза или дегградации. Эти гены находятся под общим регуляторным контролем и могут включаться или выключаться координированно. Яркий пример такой организации генетического материала — *гистидиновый оперон S. typhimurium*, где девять структурных генов оперона контролируют последовательные реакции в цепи биосинтеза гистидина. Хорошо изучены также *лактозный оперон E. coli*, в котором собраны гены, ответственные за утилизацию лактозы, *триптофановый оперон*, объединяющий пять структурных генов, контролирующих биосинтез триптофана (см. гл. 16), и ряд других. Наряду с оперонной организацией

генетического материала для прокариот характерна относительная простота реализации генетической информации отдельных генов.

Во-первых, генетическая информация каждого гена бактерий, записанная в последовательности оснований ДНК, при транскрипции переписывается на иРНК. Затем при трансляции она «дословно» переводится в первичную структуру белка, т. е. последовательность аминокислот полипептидной цепи. Как уже известно (гл. 15), такая ситуация встречается не всегда и у эукариот дело обстоит иначе.

Во-вторых, каждый структурный ген бактерий, как правило, контролирует какую-то одну ферментативную реакцию клеточного метаболизма. Это правило имеет исключения. Например, ген *pol A* кодирует фермент ДНК-полимеразу 1, которая осуществляет три ферментативные реакции при репликации ДНК: полимеризацию нуклеотидов при движении вдоль матрицы ДНК, а также отщепление нуклеотидов как в направлении синтеза, так и в противоположном направлении (см. гл. 6).

Гены бактериофагов

Структура генов и организация генетического материала сложных бактериофагов (бактериальных вирусов) имеют те же особенности, что и у бактерий. Бактериофаги Т-четной серии и λ — примеры наиболее хорошо изученных сложных бактериофагов. Линейно расположенные гены фага λ организованы в опероны, включающиеся в определенное время после заражения бактерий. Это необходимо для нормального развития и морфогенеза фагов.

Наиболее просто устроены РНК-содержащие бактериофаги R 17, f 2, Q β и др. Их генетический материал представлен одноцепочечной молекулой РНК. У этих бактериофагов, а также у одноцепочечных ДНК-содержащих фагов было обнаружено *перекрывание генов*. Эти факты рассматривались в гл. 15. Само перекрывание генов накладывает определенные ограничения на их изменчивость, поскольку одна и та же мутация может оказаться в пределах двух структурных генов и таким образом повреждать две функции. Именно это и было обнаружено при изучении нонсенс-мутанта по гену, кодирующему белок лизиса у бактериофага f 2. Та же мутация привела и к нарушению синтеза репликазы этого фага. Для структурного гена репликазы та же мутация приводила к появлению не нонсенс-аллели, а миссенс-аллели, поскольку перекрывающиеся гены транслируются в разных фазах со сдвигом считывания на один нуклеотид.

Таким образом, изменения и дальнейшая эволюция перекрывающихся генов должны происходить *сопряженно*. Это представляет как бы плату за тенденцию к увеличению информационной емкости небольшого генома. По-видимому, перекрывание генов отражает приспособление к образу жизни бактериофагов, который принято называть сугубо паразитическим. Примеры перекрывания генов известны и у сложных бактериофагов, например λ , а также в мигрирующих элементах бактерий и эукариот.

Гены эукариот

После открытия у бактерий Ф. Жакобом и Ж. Моно оперонов возник вопрос: универсальна ли подобная организация генетического материала? Генетический анализ у эукариот (в частности, у их простейших представителей — дрожжей и нейроспоры) показал, что гены, контролирующие различные этапы одного и того же пути метаболизма, как правило, случайно разбросаны по всему геному и обычно не образуют скоплений, напоминающих опероны бактерий (рис. 19.2). Было найдено несколько исключений, привлечших пристальное внимание. Например, компактный участок генетического материала у грибов контролирует три реакции в биосинтезе гистидина. Сходная ситуация (также у грибов) обнаружена при изучении генетического контроля биосинтеза ароматических аминокислот — триптофана, тирозина, фенилаланина, а также жирных кислот. Может быть, в этих и некоторых других случаях наблюдается некий атавизм — пример оперонов, не типичных для эукариот?

Если сравнить, какие этапы биосинтеза гистидина кодируют тесно сцепленные участки генетического материала у *S. typhimurium* и *N. crassa*, то выясняется, что у нейроспоры есть единственное «скопление» мутаций, блокирующих этапы 2, 3, 10. Как известно, у сальмонеллы все 10 этапов контролирует один оперон. Оказывается, что даже эти три этапа биосинтеза у нейроспоры контролируют участки генетического материала, сцепленные совсем иначе, чем у сальмонеллы (рис. 19.2). Аналогичная картина наблюдается и для локуса *his 4* у дрожжей-сахаромицетов.

Рассмотрим генетический контроль биосинтеза ароматических

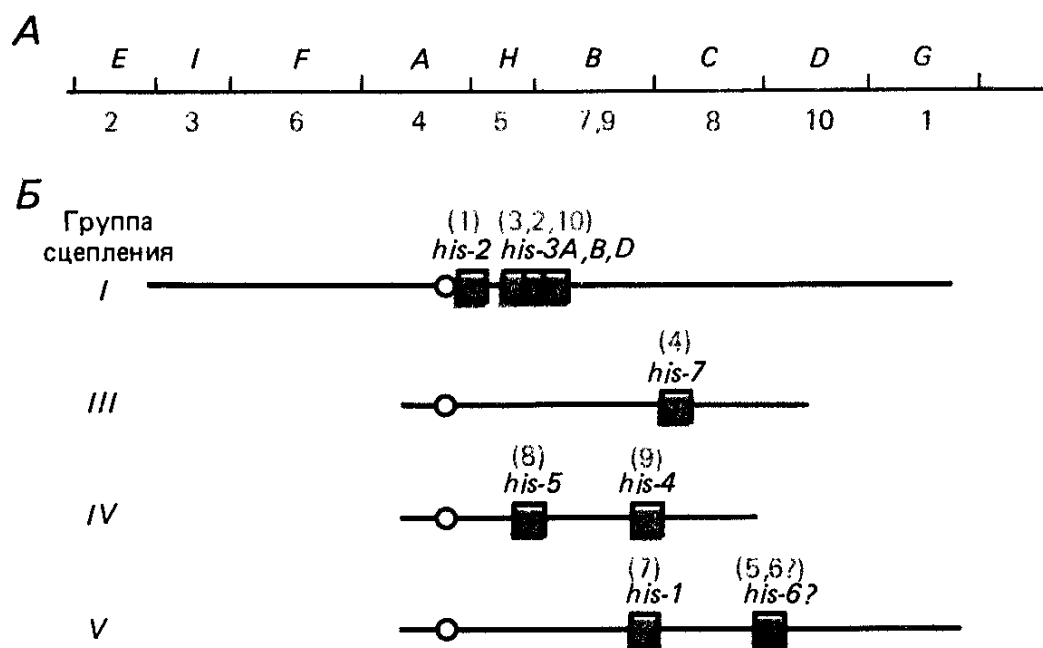


Рис. 19.2. Гены, контролирующие биосинтез гистидина у *S. typhimurium* (A) и *N. crassa* (B) (Ahmed et. al. 1964).

Цифры в скобках — этапы биосинтеза гистидина

аминокислот у нейроспоры (рис. 19.3). Мутации, блокирующие пять этапов этого пути, расположены на генетической карте в непосредственной близости друг от друга. В результате функционального и рекомбинационного тестов этих мутаций как будто обнаруживаются пять генов, из которых в двух найдена межallelная комплементация. В участке *arom 1* расположены как мутации, блокирующие любой из пяти этапов биосинтеза, так и мутации, блокирующие одновременно 2, 3, 4 или даже 5 этапов. Рекомбинационный анализ показал, что полностью некомплементирующие мутации (класс *EF*) картируются поляризованно, т. е. в одном конце участка *arom 1*.

В клеточных экстрактах присутствуют агрегаты разной молекулярной массы, проявляющие различные комбинации из пяти ферментативных активностей. Создалось впечатление, что исследователи имели дело с опероноподобной структурой, кодирующей мультиэнзимный комплекс. Однако более поздние исследования доказали, что разделение ферментативных активностей — результат действия протеолитических ферментов при выделении единого агрегата с молекулярной массой около 300 000 Д. В действительности все пять этапов пути биосинтеза ароматических аминокис-

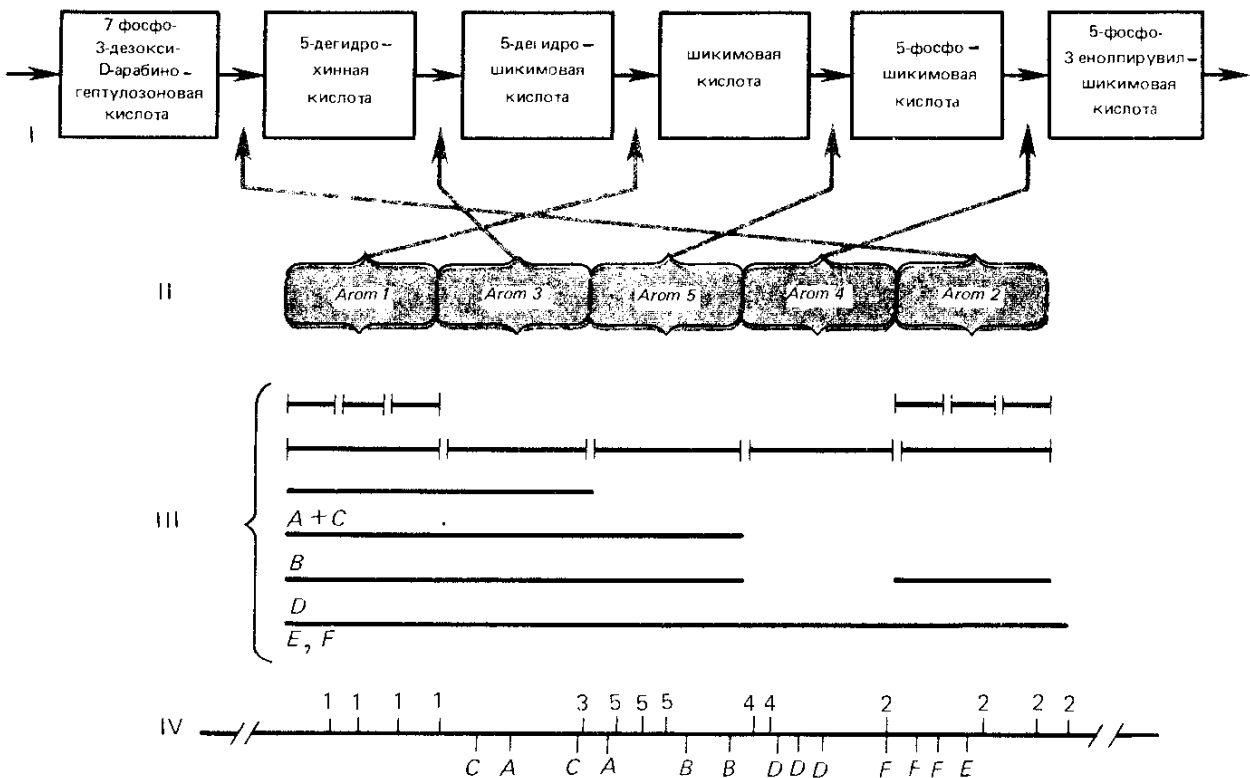


Рис. 19.3. Пять этапов биосинтеза ароматических аминокислот у *N. crassa*, контролируемые геном-кластером *arom* (по N. Giles и др.). I — часть пути биосинтеза ароматических аминокислот; II — последовательность участков гена, кодирующих соответствующие ферментативные активности; III — карта комплементации; IV — карта рекомбинации:

цифры — мутации разных участков, показанные выше (II); буквы — группы комплементации, показанные выше (III)

лот контролирует один ген, продукт которого — единая полипептидная цепь массой 150 000 Д. Эта субъединица дважды повторена в четвертичной структуре нативного фермента. Таким образом, это не оперон, а один ген, получивший наименование *ген-кластер* (cluster-gene). Такие гены-кластеры довольно часто встречаются у эукариот. Вот несколько примеров: *his 4* — дрожжей-сахаромицетов (кодирует полипептид с тремя ферментативными активностями в биосинтезе гистидина), упомянутый уже *arom 1* — нейроспоры (пять активностей), два кластера в биосинтезе жирных кислот у дрожжей-сахаромицетов: *fas 1* (три активности) и *fas 2* (пять активностей), *trp 5* дрожжей и соответственно *td* у нейроспоры (три активности), *pur 3* у нейроспоры (две активности).

У дрозофилы две ферментативные активности, осуществляемые у нейроспоры белком, кодируемым *pur 3*, также представляют собой продукт одного гена-кластера. Однако в этом случае данный белок проявляет еще одну дополнительную ферментативную активность. Это ген *r* (*rudimentary*) — см. гл. 16.

Возникновение и распространение генов-кластеров представляет собой молекулярно-генетическую иллюстрацию принципа *олигомеризации* В. А. Догеля (1936), согласно которому в эволюции происходит уменьшение числа (олигомеризация) гомологичных органов с увеличением их функциональной дифференцировки. Подобная олигомеризация на молекулярном уровне, по-видимому,

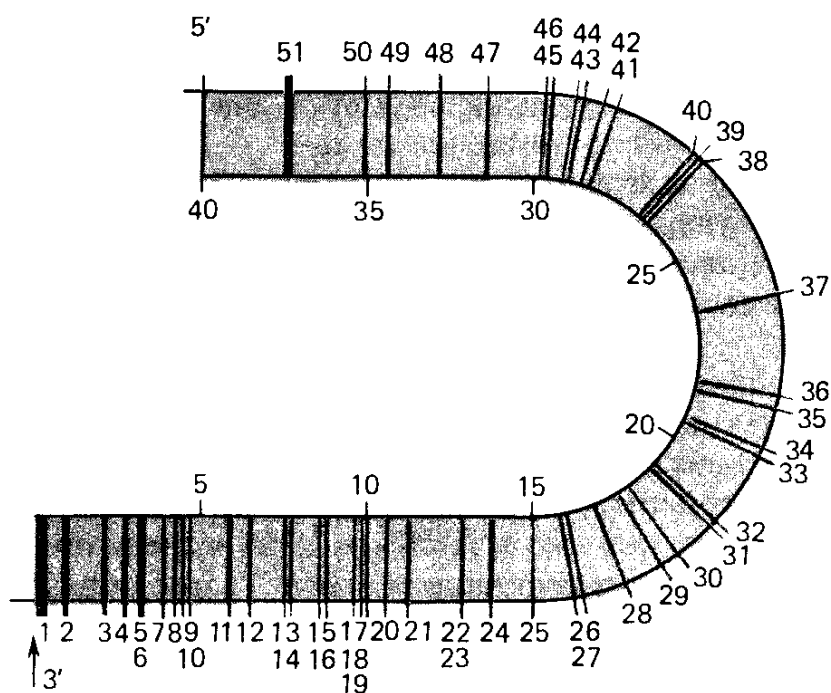


Рис. 19.4. Структура гена, контролирующего синтез коллагена курицы (Crombrugge et. al., 1980).

Темные поперечные полосы соответствуют экзонам. Длина интронов и экзонов дана в масштабе. Внешние цифры от 1 до 51 — порядковые номера экзонов, внутренние цифры — длина гена в тысячах пар оснований

отражает закрепление у эукариот некоторых удачных вариантов метаболизма, возникших в эволюции, и связана с преимуществом протекания ряда последовательных реакций в пределах единого мультиэнзимного комплекса по сравнению с теми случаями, когда их осуществляют отдельные ферменты, как это характерно для прокариот.

То, что опероны отсутствуют у эукариот, согласуется и с особенностями считывания у них генетической информации. Есть указания на то, что рибосомы эукариот, как правило, не могут повторно инициировать синтез белка на одной и той же молекуле иРНК, т. е., встретив однажды кодон-терминатор, они уже не реагируют на последующие кодоны-инициаторы.

Еще одна отличительная черта в строении генов у эукариот — распространение *интрон-экзонной*, или *мозаичной структуры* генов (см. гл. 15).

Интрон-экзонная структура характерна для ядерных генов эукариот, а также для генов, локализованных в органеллах эукариотической клетки, например в митохондриях, и не обнаружена или по меньшей мере очень редка у прокариот. Количество интронов в разных генах, а также их длина сильно различаются. Число интронов колеблется от 0 (в генах, контролирующих гистоны) до 51 (в структурном гене коллагена). Длина интрона варьирует от нескольких пар оснований (в генах тРНК дрожжей) до нескольких тысяч пар оснований (в генах для рРНК нейроспоры).

На рис. 19.4 изображен ген, контролирующий синтез коллагена курицы. Изображение интронов и экзонов соответствует относительной длине интронов и экзонов самого гена. В данном случае экзоны составляют лишь ничтожную часть всего гена.

Гены вирусов эукариот

Организация генетического материала ДНК- и РНК-содержащих вирусов эукариот крайне разнообразна. Структура генов у вирусов эукариот имеет черты сходства с организацией генетического материала у бактериальных вирусов, а также у эукариотических клеток.

Подобно бактериофагам, ДНК- и РНК-содержащие вирусы эукариот эволюционировали в направлении максимального использования своего маленького генома. По-видимому, как результат этого у ДНК-содержащего вируса SV 40 и РНК-содержащего вируса гриппа, так же как у ДНК- и РНК-содержащих бактериофагов, возникли *перекрывающиеся гены*. Таким образом, перекрывание генов широко распространено у вирусов и представляет способ их приспособления к паразитическому существованию.

С другой стороны, полная зависимость вирусов эукариот от метаболизма клетки-хозяина неотвратимо привела к возникновению у них тех свойств организации генетического материала, которые характерны для эукариотических организмов. Оказалось, что для вирусов эукариот, так же как и для самих эукариотиче-

ских клеток, свойственна *интрон-экзонная структура генов*. Существование мозаичной организации генетического материала продемонстрировано у таких ДНК-содержащих вирусов, как SV 40, полиомы, у аденовирусов, а также у ряда РНК-содержащих вирусов (вирус саркомы Рауса, вирус лейкемии мыши).

Черты сходства между вирусами и хозяевами наблюдаются в реализации генетической информации. Так, у многих РНК-содержащих вирусов эукариот различные белки образуются в результате протеолитического расщепления единого предшественника — *полипротеина* — первичного продукта трансляции вирусной РНК. Каждую молекулу вирусной РНК у РНК-содержащих вирусов можно рассматривать как самостоятельный *ген-кластер*. РНК таких вирусов служит одновременно носителем генетической информации и в качестве иРНК. Расщепление же полипротеина — это своеобразное приспособление вирусов к паразитизму внутри клетки эукариот, в которой невозможна повторная инициация в ходе белкового синтеза, и в то же время для созревания вириона необходимо несколько отдельных белковых молекул.

Знаки пунктуации, разделяющие гены, у них как бы вынесены на уровень полипептида — генного продукта.

19.2. Некоторые тенденции в эволюции гена

Данные о строении генов прокариот, эукариот и их вирусов показывают, что структура гена — элементарного носителя генетической информации в ходе эволюции не оставалась неизменной. Пользуясь этим материалом, можно обнаружить некоторые основные *тенденции в эволюции гена*.

1. *Автономизация генов* эукариот по сравнению с генами прокариот: исчезновение оперонов, сопровождаемое потерей способности к реинициации в ходе трансляции рибосомами иРНК. По-видимому, это создает благоприятные условия для раздельной, а значит, и более тонкой регуляции функции отдельных генов. Кроме того, автономизация генов открывает новые пути эволюции генома за счет хромосомных перестроек и транспозиций генов у эукариот.

2. *Олигомеризация генов* находит свое отражение в распространении генов-кластеров. Возможно, это связано с потребностью в концентрации определенных ферментативных активностей, с ускорением и координацией определенных этапов метаболизма. Как было показано на примере генетического контроля ДНК-полимеразы 1, эта тенденция проявляется уже у прокариот, отражая «находки» эволюции в организации «старых» функций, таких, например, как репликация и репарация ДНК, а также некоторых других.

3. *Появление мозаичной структуры гена*. Интрон-экзонная структура гена распространена у эукариот. За редкими исключениями такая структура отсутствует у бактерий. Правда, в генах тРНК *архебактерий* интроны найдены.

Низшие эукариоты, например грибы, содержат интроны в некоторых генах, и много интронов встречается в генах многоклеточных эукариот. По мнению У. Гилберта, мозаичная структура способствует эволюционной перетасовке *экзонов*, кодирующих разные *домены* полипептидных цепей. Кроме того, У. Гилберт считает, что возможности неоднозначного сплайсинга вследствие модификационной изменчивости открывают путь для более широких поисков новых функций в форме адаптивных модификаций с последующим возникновением соответствующих генокопий, подхватываемых стабилизирующим отбором.

4. Еще одна тенденция в эволюции гена связана со *специализацией* и паразитизмом вирусов, т. е. максимальным использованием небольших молекул ДНК и РНК, повышающим их информационную емкость. Этим можно объяснить появление *перекрывающихся генов*.

19.3. Роль генных мутаций в эволюции гомологичных генов и белков

Выявление некоторых общих тенденций в эволюции структурных генов еще не объясняет того, как изменяются гены. Для выяснения этого вопроса предприняты многочисленные исследования по сравнению белков, а затем и самих генов, кодирующих эти белки.

Прежде всего, были изучены *гомологичные белки и гомологичные гены*. Проблема гомологии генетических структур различных организмов была выдвинута еще Н. И. Вавиловым в его *законе гомологических рядов* в наследственной изменчивости (см. гл. 12). Подойти к рассмотрению этой проблемы вплотную удалось благодаря использованию методов молекулярной генетики. Доказать гомологию генов можно только исследуя белки — продукты генов или непосредственно сами гены.

В настоящее время общепринято, что третичная структура белковой молекулы полностью определяется ее первичной структурой. В то же время исследования последних лет продемонстрировали значительную изменчивость первичной структуры гомологичных белков, выполняющих одни и те же функции у разных видов и удивительное постоянство их третичной структуры (рис. 19.5).

При сравнении цитохрома С лошади и свиньи показано, что, различаясь по 17 аминокислотным остаткам из 104, они тем не менее имеют почти идентичную третичную структуру. Единственное различие, которое было предсказано, касалось локализации некоторых боковых цепей.

У прокариот различия в аминокислотных последовательностях гомологичных белков разных видов значительно больше, чем у эукариот. Конформация всех изученных к настоящему времени цитохромов С оказалась одинаковой, несмотря на значительную изменчивость их аминокислотных последовательностей (рис. 19.6).

Предполагается, что неизменность третичной структуры белка в процессе эволюции обусловлена действием стабилизирующей фор-

мы естественного отбора, направленного на поддержание конформации белковой молекулы, оптимальной для выполнения функции. Этот процесс в значительной степени зависит от структуры генетического кода: очень часто замена одной пары оснований, вызванная в каком-либо гене мутацией, приводит к подстановке аминокислоты по своим физико-химическим свойствам максимально подобной исходной (см. рис. 15.16).

Влияние аминокислотных замен в различных участках белка на его структуру и функцию не равноценно, так как белковые молекулы на уровне своей третичной структуры образуют отдельные функциональные центры. Поэтому все аминокислотные остатки, входящие в состав белковой молекулы, можно разделить на три условные группы: 1) входящие в функциональные центры, 2) не входящие непосредственно в центры, но необходимые для формирования их вторичной и третичной структуры; 3) остальные, которые не существенны для функционирования и сравнительно легко заменимы другими остатками. Такая организация белковых молекул значительно ограничивает изменчивость их первичной структуры. Чтобы получить распространение в популяции, аминокислотные замены не должны нарушать структуру функциональных центров белка, а следовательно, не должны затрагивать аминокислотные остатки, входящие в эти центры, а также аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в образовании центров, но необходимы для их формирования, т. е. они не могут касаться остатков, выделенных в 1-ю и 2-ю группы. Для аминокислот 3-й группы также не все замены приемлемы: недопустимы такие, которые приводят к значительным изменениям размера или полярности аминокислот, поскольку это нарушит стабильность или заряд белковой молекулы.

Создается впечатление, что в процессе эволюции возможности изменчивости белков крайне ограничены. И тем не менее, как это ни парадоксально, было обнаружено, что аминокислотные последовательности гомологичных белков разных видов в некоторых случаях могут различаться более чем на 50 % своих аминокислотных остатков. Это противоречие получило свое разрешение в работах американских исследователей У. Фитча и Е. Марголиаша, в основе которых лежит сравнительный анализ структуры и функции цитохрома С у организмов разных таксономических групп.

19.4. Коварионы

Аминокислотная последовательность цитохрома С к настоящему времени определена более чем у 75 видов эукариот. Обнаружено не только сильное различие первичной структуры некоторых белков, но также и то, что, несмотря на все перечисленные ограничения, более 75 % аминокислотных остатков цитохрома в процессе эволюции варьировали (см. рис. 19.6).

На основании аминокислотных последовательностей современных цитохромов была определена наиболее вероятная первичная

структура их общего предшественника, которую сравнили с аминокислотными последовательностями цитохромов разных видов. Данный подход позволил определить варьирующие аминокислотные остатки в цитохромах организмов, относящихся к разным таксономическим группам. При этом неожиданно было обнаружено, что цитохром любого вида эукариот имеет только 4—10 аминокислотных остатков, которые могут подвергаться заменам. Замена других аминокислот в полипептидной цепи, по-видимому, несовместима с функцией белка, в связи с чем соответствующие мутации в популяции организмов не распространяются, поскольку подвергаются отрицательному отбору.

Кодоны, в которых возможна фиксация по крайней мере некоторых нуклеотидных замен, приводящих к аминокислотным заменам в белке, были названы *коварионами* (от англ. *concomitantly varying codons*). Важное свойство коварионов — взаимосвязанность, проявляющаяся в том, что мутации в одном из коварионов приводят к переоценке способности варьировать у всех остальных кодонов данного гена. При этом возможно как возникновение новых коварионов, так и потеря некоторыми переменными кодонами статуса ковариона. Данный процесс в эволюции эукариот привел к тому, что в настоящее время коварионы у организмов, относящихся к разным таксономическим группам, почти не перекрываются. Как следствие переменные аминокислотные остатки, например в цитохроме С птиц, неизменны у насекомых и млекопитающих, и наоборот. Данное обстоятельство объясняет, каким образом при наличии в молекуле цитохрома С лишь нескольких переменных аминокислотных остатков более 75 % его аминокислот заменялось в процессе эволюции.

Тот же самый подход был использован для определения числа коварионов в семействах других белков: *инсулине*, α - и β -цепях *гемоглобина*, *рибонуклеазе*, *фибринопептиде А*. И в этих случаях лишь ограниченное число кодонов способно фиксировать нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным заменам. Об этом свидетельствуют и обширные данные по изучению белкового полиморфизма в природных популяциях дрозофилы. Сравнение популяций по наличию в них форм данного белка с различной электрофоретической подвижностью показало, что разнообразие популяций обеспечивается одними и теми же несколькими вариантами. Поскольку эти исследования были сделаны для большого числа белков, то можно, по-видимому, сделать вывод о том, что для каждого локуса существует небольшое число позиций, в которых происходит фиксация по крайней мере некоторых замен оснований.

19.5. Концепция нейтральной эволюции

В результате широкого распространения исследований по сопоставлению аминокислотных последовательностей гомологичных белков разных видов возникла концепция, объясняющая закономерности их эволюции с неदारвиновских позиций. Японский

генетик М. Кимура и американские генетики Дж. Кинг и Т. Джукс в 1968—1969 гг. высказали предположение о том, что естественный отбор движет только эволюцией организмов, в то время как изменения белков и нуклеиновых кислот не подвержены действию отбора и происходят в результате случайных событий — *дрейфа нейтральных мутаций*. В соответствии с этой концепцией нейтральные мутации, не влияющие на приспособленность организма, составляют основную часть мутаций, распространяющихся в популяции. Данная концепция предсказывает, что скорость эволюционных изменений гомологичных белков разных видов должна быть одинаковой. Однако проверить это не просто. Использование разных статистических подходов приводит авторов к абсолютно противоположным выводам. Иногда предполагается, что ни один из этих подходов не может дать правильные результаты, поскольку во всех случаях скорость эволюции рассчитывают на кодон, не учитывая, что в каждом гене число кодонов, способных фиксировать нуклеотидные замены, ограничено. При определении для шести белков скорости их эволюционных изменений в расчете на коварион было показано, что они практически одинаковы, что, казалось бы, подтверждает вывод о справедливости *концепции нейтральной эволюции*. Некоторые аспекты коварионной модели, напротив, ясно свидетельствуют о действии естественного отбора в эволюции белков. Поскольку концепция коварионов в своей основе не имеет предположений относительно механизма фиксации мутаций, то допускается, что коварионы могут фиксировать как адаптивные, так и нейтральные мутации. Однако тот факт, что коварионы у организмов разных таксономических групп не перекрываются, заставляет предположить, что мутации в коварионах могут быть нейтральными только при условии функционирования белка у организмов данного вида. У организмов других таксономических групп, с иными условиями функционирования белка, те же самые мутации уже вредны и отбрасываются отбором. Это, в свою очередь, означает, что белок одной видовой принадлежности, имея замены переменных аминокислотных остатков, не мог бы заместить гомологичный белок в организмах других таксономических групп, у которых данные аминокислоты неизменны. Это противоречит концепции нейтральной эволюции, согласно которой гомологичные белки разных видов взаимозаменяемы, поскольку их дивергенция осуществлялась за счет нейтральных мутаций.

Таким образом, в настоящее время невозможно дать окончательный ответ относительно механизма эволюции гомологичных белков. Можно лишь с уверенностью сказать, что по крайней мере некоторые аминокислотные замены не нейтральны, так как существуют адаптивные функциональные различия отдельных молекул в семействах гомологичных белков.

Представление о постоянной скорости молекулярной эволюции — фиксации адаптивно-нейтральных замен в белках — позволило Э. Цукеркандлу и Л. Полингу выдвинуть идею *«молекулярных часов эволюции»*. Согласно этой идее постоянная скорость замен

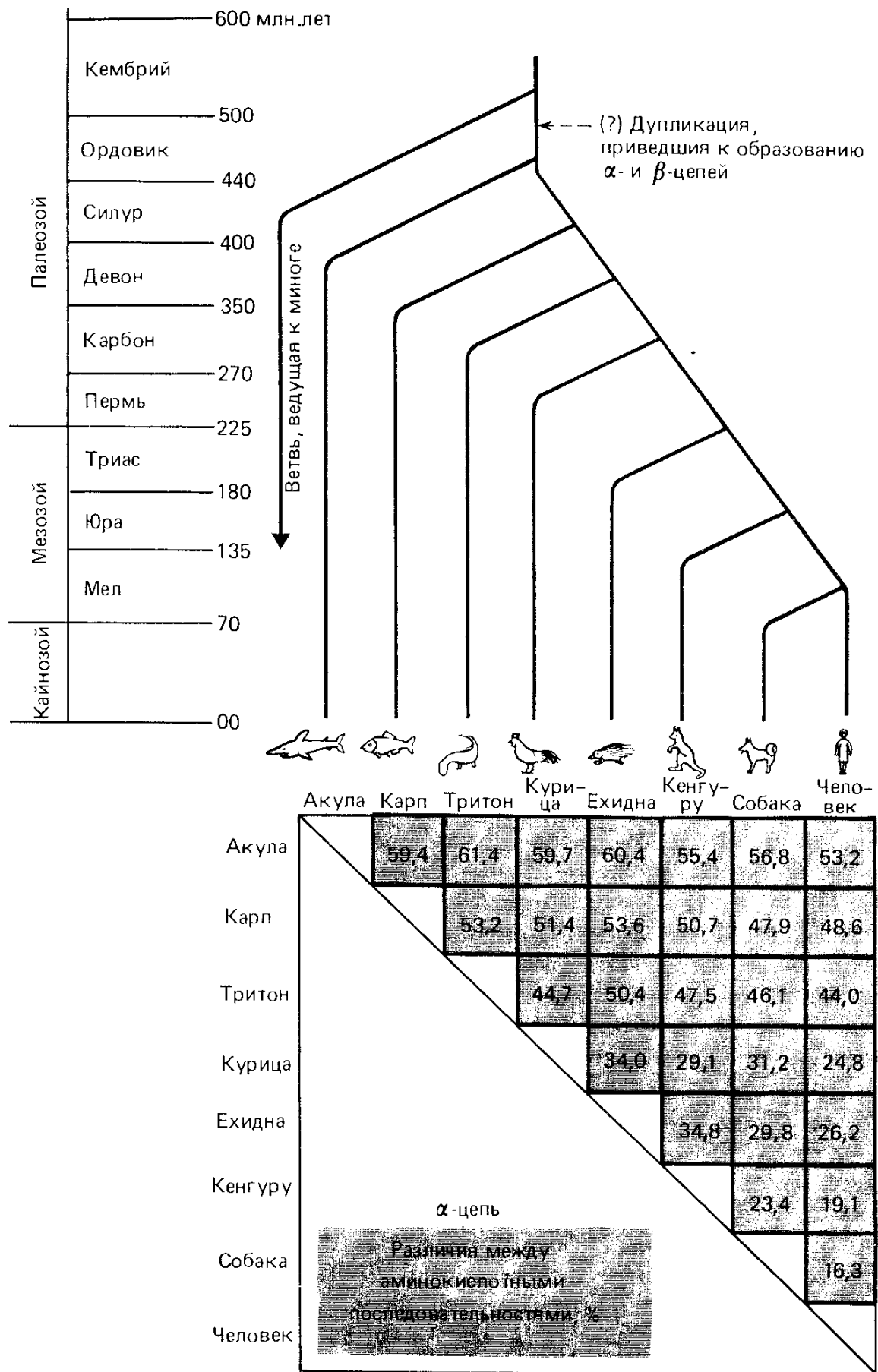


Рис. 19.7. Различия между аминокислотными последовательностями (в процентах) α -цепей гемоглобинов восьми позвоночных и схема филогенетических отношений, отражающая время дивергенции рассматриваемых таксонов (М. Кимура, 1985)

в белках позволяет высчитать абсолютное время существования того или иного вида, определить момент дивергенции видов, родов и более крупных таксонов. Действительно, наблюдается хорошее совпадение между временем дивергенции и различиями в аминокислотном составе гомологичных белков сравниваемых видов (рис. 19.7). Так, для α -цепей гемоглобина М. Кимура дает оценку скорости фиксации замен примерно $0,9 \cdot 10^{-9}$ на аминокислотный остаток в год. Разные белки могут эволюционировать с неодинаковой скоростью, которая тем не менее постоянна для каждого белка, а следовательно, и для семейства гомологичных генов.

Рассмотренная проблема связана исключительно с *дивергенцией гомологичных белков*. Каково бы ни было отношение к концепции нейтральной эволюции, факт значительной изменчивости первичной структуры и консервативность третичной структуры, или пространственной конфигурации белковой молекулы, указывает на то, что *новые гены и новые белки не могут возникать только за счет замен оснований и аминокислотных остатков*.

19.6. Как возникают новые гены?

Новые гены возникают благодаря перестройкам генетического материала: дупликациям, их последующей дивергенции в результате естественного отбора, а также в результате слияния и разделения генов и их частей.

Вследствие дупликаций какого-либо гена появляется возможность дивергенции субстратной специфичности кодируемого им фермента. Такая дивергенция происходит в несколько этапов. Первый из них состоит в замене аминокислотного остатка в составе активного центра белка или не входящего в него непосредственно, но тем не менее определяющего его конформацию. Такое изменение может приводить к появлению у данного фермента небольшого сродства к новому субстрату. Действие естественного отбора, направленного на увеличение сродства, подхватывает любую мутацию, способствующую этому. Таким образом происходит мутационная «настройка» фермента на новый субстрат. С течением времени данный процесс приводит к возникновению семейств гомологичных белков, различающихся по функции и в значительной степени — по своей первичной структуре. По-видимому, таков механизм возникновения *сериновых протеаз* млекопитающих. Сопоставление первичной и третичной структур некоторых гомологичных белков данного семейства показало, что изменения, связанные с дивергенцией субстратной специфичности этих белков, очень немногочисленны и состоят в замене одного-двух аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра.

Таким образом, механизм дупликаций и дивергенции иллюстрирует уже эволюция гомологичных генов. На рис. 19.8 показана последовательность дупликаций и дивергенция генов гемоглобина человека.

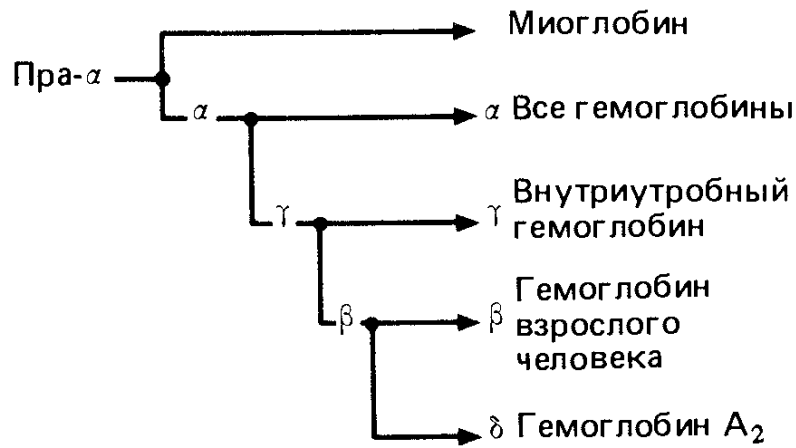


Рис. 19.8. Эволюция генов, кодирующих гемоглобины человека (Э. Цукеркандл, 1966):

Пра- α -предковый гемоглобин, кружки — моменты дупликации гена, сопровождаемые транслокацией

В геномах эукариот находят нефункциональные копии нормальных генов: лишенные интронов, свойственных полноценным копиям; несущие различные мутации, прежде всего — нонсенсы и сдвиги считывания. Эти копии получили название *псевдогенов*. Их существование подтверждает саму возможность сохранения дубликатных копий генетических единиц, которые могут служить материалом для возникновения новых генов.

Параллельно с дупликацией и дивергенцией генетического материала действует еще один важный механизм прогрессивной эволюции — процесс слияния генов. При формировании разных (современных) генов эти процессы происходили в различной последовательности, создавая эволюционную историю каждого гена.

Слияние дубликатных копий одного и того же гена вызывает повторы в первичной структуре одной полипептидной цепи. С течением времени, в результате непрекращающегося действия мутационного процесса, такие повторы в белковой молекуле становятся труднодоказуемыми. Анализ аминокислотных последовательностей 163 белков, представляющих 116 надсемейств, обнаружил внутренние дубликации в белковых молекулах 20 надсемейств. Примером белков такого типа служит альбумин быка. Этот белок состоит более чем из 580 аминокислотных остатков и, как показал анализ первичной структуры, имеет 9 повторов.

Если обратиться непосредственно к анализу первичной структуры генов, то оказывается, что в них встречаются так называемые *несовершенные повторы* нуклеотидных последовательностей. *Несовершенные повторы* — это сходные нуклеотидные последовательности в гене, встречающиеся достоверно чаще, чем можно ожидать на основе предположения о случайном совпадении. Повторы могут быть *прямыми*, *инвертированными* и *комплементарными палиндромами* (рис. 19.9). В. А. Ратнер с сотрудниками разработал программу для компьютерного поиска таких повторов и обнаружил их в ряде генов про- и эукариот. В качестве примера на рис. 19.10

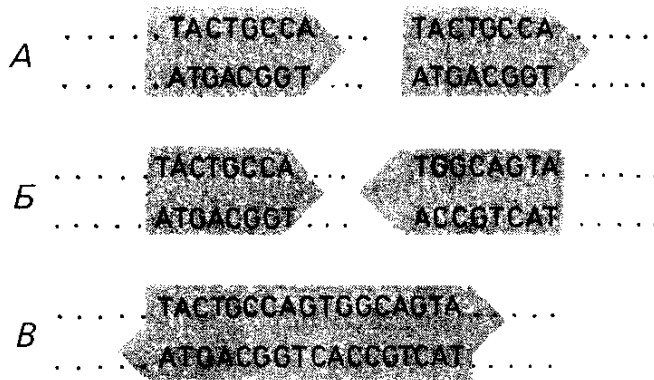
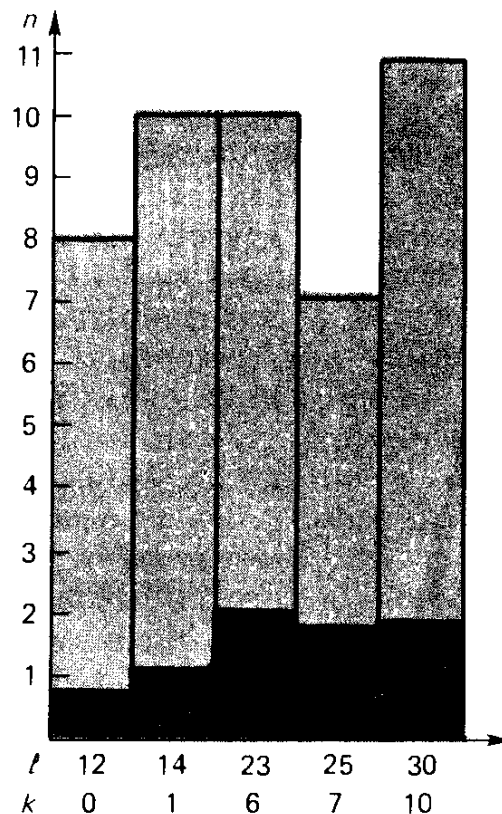


Рис. 19.9. Типы повторов в генах (В. А. Ратнер и др., 1985). А — прямой; Б — инвертированный; В — комплементарный палиндром

Рис. 19.10. Наблюдаемые и ожидаемые (темные) частоты прямых повторов в гене σ — субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* (В. А. Ратнер и др., 1985).

Длина гена — 1839 п. н., n — число повторов, l — длина повтора, k — число различающихся нуклеотидов в несовершенном повторе



представлены частоты несовершенных повторов в гене, кодирующем σ -фактор РНК-полимеразы *E. coli*.

Существование повторов указывает на возможность участия перестроек (см. гл. 13) в эволюции каждого гена.

Дубликатные копии одного и того же гена могут сливаться как между собой, так и с другими генами. В последнем случае, сопоставляя аминокислотные последовательности некоторых белков, приходят к выводу, что они гомологичны в одной части белковой молекулы и не гомологичны — в другой.

К таким белкам относятся *НАД-зависимые дегидрогеназы*. Было показано, что они состоят из двух функциональных и структурных частей — *доменов*. Один домен выполняет функцию связывания коэнзима (НАД), а второй несет каталитический центр связывания субстрата, а также центры взаимодействия субъединиц. Третичная структура той части полипептидной цепи, которая выполняет функцию связывания динуклеотидного кофермента, в остальной части молекулы у разных дегидрогеназ совершенно различна. Сходство третичной структуры НАД-связывающего домена у четырех различных дегидрогеназ позволило предположить, что предковые гены современных дегидрогеназ возникли в результате слияния дубликатных копий гена, контролирующего белок, связывающий динуклеотид с другими генами.

Действительно, было показано, что участок полипептидной цепи приблизительно в 140 аминокислотных остатков, соответствующий НАД-связывающему домену, имеет гомологичную аминокислотную последовательность у всех сравниваемых дегидрогеназ.

В настоящее время возможность слияния генов в процессе эволюции доказана путем их экспериментального слияния. Так, например, осуществлено слияние генов *his D* и *his C* у *S. typhimurium*. При этом показано, что «гибридный» белок образует два самостоятельных домена и проявляет ферментативные активности, свойственные исходным белкам, синтезируемым под контролем этих генов.

По-видимому, в эволюции осуществляется и противоположный процесс — *разделение генов*. Так, при мягком протеолитическом расщеплении мультифункциональных белков могут быть выделены фрагменты полипептидной цепи, осуществляющие отдельные ферментативные реакции.

Например, ДНК-полимеразу I *E. coli* таким образом можно расщепить на малый аминотерминальный фрагмент (35 000 Д) с 5'—3'-эксонуклеазной активностью и на большой фрагмент (76 000 Д), обладающий полимеразной и 3'—5'-эксонуклеазной активностью. Все эти данные свидетельствуют о функциональной и структурной самостоятельности доменов. Возможно домены — основные единицы эволюционных преобразований белков. *Объединение и разделение доменов* и соответствующих им «до-генов», как образно назвал Т. Р. Сойдла участки ДНК, кодирующие самостоятельные домены, происходили в эволюции неоднократно. Одни и те же функциональные центры находятся в разных сочетаниях, т. е. в одной и той же или разных полипептидных цепях у разных видов.

Интрон-эксонная структура генов вносит дополнительные коррективы в их эволюционные преобразования у эукариот. Во-первых, интроны увеличивают расстояния между до-генами, кодирующими разные домены, и таким образом повышают вероятность их перетасовки как таковых. Во-вторых, интроны, не кодирующие какой-либо активности, фиксируют замены нуклеотидов и протяженные перестройки значительно быстрее, чем экзоны.

Как показал В. А. Ратнер с сотрудниками на примере шести генов семейства β -цепей гемоглобинов, большая часть неслучайных повторов концентрируется в интронах и некодирующих областях генов.

19.7. Эволюция систем регуляции

Сравнение путей биосинтеза основных низкомолекулярных компонентов клетки, а также путей утилизации источников углерода и азота показывает, что они в основном одинаковы у большинства организмов. Матричные процессы: репликация, транскрипция и трансляция — также сходны. Все это заставляет предполагать, что основная нагрузка в ходе эволюции падала на изменения не столько структурных генов, сколько регуляторных систем. К сожалению, знания о механизмах регуляции у эукариот еще недостаточны. Тем не менее уже можно отметить некоторые фундаментальные различия регуляции у про- и эукариот. При

изложении основных тенденций в эволюции гена отмечались автономизация генетических единиц у эукариот по сравнению с прокариотами и эволюция регуляторных систем. Действительно, при оперонной организации у бактерий (см. гл. 16) изменения регуляции затрагивают целые блоки генов, в то время как у эукариот дифференциация регуляторных систем отдельных генов делает этот процесс лабильнее, и изменения регуляции могут касаться отдельных генов.

Возникновение хромосом и хроматина, представляющего собой комплекс ДНК и гистонов, создало принципиально новые возможности регуляции, основанные на изменении компактизации генетического материала. Появились такие новые регуляторные элементы, как *энхансеры* и *глушители* (см. гл. 16).

Обнаруженные уже у бактерий подвижные элементы, перемещаясь, затрагивают экспрессию целых оперонов. У эукариот мигрирующие элементы изменяют экспрессию отдельных генов. Тем самым создается более тонкая система настройки, большее разнообразие реакций, подхватываемых естественным отбором. При этом следует учесть, что в своей структуре мобильные элементы часто несут сигналы инициации (промоторы) и терминации транскрипции.

Таким образом, мигрирующие элементы, перемещаясь по геному, действуют и как средство изменения экспрессии генов, и как средство эволюции структуры генома. Это происходит благодаря тому, что один и тот же мигрирующий элемент, локализованный в разных (негомологичных) частях генома, служит для рекомбинации, приводящей к хромосомным перестройкам и транспозициям генов (см. гл. 13). В то же время мобильные элементы могут играть роль мигрирующих промоторов, объединяя структурные гены и регуляторные элементы, настраивая их на общие сигналы регуляции. Таким образом, пути эволюции структуры и экспрессии генома оказываются объединенными.

Итак, закономерности микро- и макроэволюции связаны с преобразованием структуры генов. Анализ генов и кодируемых ими макромолекул (белков, РНК) выявил не только основные тенденции в эволюционном преобразовании генетического материала, но и показал пути преобразования генов. Стало очевидно, что точковые мутации — замены нуклеотидов и аминокислотных остатков сами по себе недостаточны для прогрессивной эволюции.

Новые гены этим путем возникнуть не могут. Они образуются благодаря перестройкам генетического материала — прежде всего дупликациям, а также *нерегулярным рекомбинациям*, приводящим к слиянию и разделению целых генов и их частей, кодирующих отдельные домены.

Такая блочная эволюция получила дальнейшее развитие у эукариот благодаря автономизации генов и их частей, кодирующих отдельные домены в мозаичных генах с интрон-экзонной структурой. Автономизация генов у эукариот создала дополнительные возможности и для эволюции регуляторных систем, о чем можно

судить пока весьма приблизительно, поскольку плохо известны механизмы регуляции генов у эукариот. Существенную роль в эволюции регуляторных систем, по-видимому, играют мигрирующие элементы, которые одновременно являются и фактором эволюции структуры генома.

Вопросы к главе 19

1. Каковы основные отличия генов прокариот и эукариот?
2. В чем сходна и чем отличается организация генов у вирусов прокариот и эукариот?
3. Последовательность 20 последних аминокислот в α - и β -цепях гемоглобина человека имеет следующий вид:
 α : His—Ala—Ser—Leu—Asp—Lys—Phe—Leu—Ala—Ser—
 β : Glu—Ala—Ala—Tyr—Gln—Lys—Val—Val—Ala—Gly—
 α —Val—Ser—Thr—Val—Leu—Thr—Ser—Lys—Tyr—Arg
 β —Val—Ala—Asn—Ala—Leu—Ala—His—Lys—Tyr—His
Используя генетический код, определите минимальное число нуклеотидных замен, происшедших в участках ДНК, кодирующих эти последовательности, с момента дупликации, которая привела к образованию α - и β -цепей.
4. Что такое коварионы?
5. Какие события обсуждаются в терминах концепции «нейтральной эволюции»?
6. Что такое псевдогены?
7. Где мутации фиксируются чаще: в интронах или в экзонах? Почему?
8. Какие типы хромосомных перестроек необходимы для возникновения новых генов?
9. Какое событие необходимо для возникновения белка удвоенного размера, если кодирующая часть гена дуплицировалась тандемно, включая кодоны инициатор и терминатор, и все кодоны расположены в одной фазе считывания?

6

ЧАСТЬ

ГЕНЕТИКА ДЛЯ НАС

Глава 20

Генетика человека

Биологический вид *Homo sapiens* составляет часть биосферы и продукт ее эволюции. Закономерности биологических процессов, происходящих на клеточном уровне и имеющие универсальное значение в природе, в полной мере приложимы к человеку: организация эукариотической клетки, ее компартиментализация, основные пути метаболизма, закономерности митоза и мейоза и многие другие, рассмотренные в предыдущих главах. К человеку применимо большинство физиологических закономерностей, характерных для царства животных, класса млекопитающих, отряда приматов, семейства гоминид, к которым он относится. Все это подчеркивает его связь с миром живых существ. К человеку в полной мере приложимы закономерности наследственности и изменчивости.

20.1. Биосоциальная сущность человека

В главе 18 были рассмотрены основные факторы микроэволюционного процесса, или динамики популяций. В какой мере эти факторы, обеспечивающие элементарное эволюционное событие — изменение частоты аллелей в популяции, оказывают влияние на человека?

Несомненно, человек, как и все прочие организмы, испытывает влияние мутационного процесса — мутационное давление. Такие факторы, как миграция, или поток генов, избирательность спаривания, дрейф генов в изолированных популяциях, сохраняют свое значение и для человека. При этом действие одних факторов, например миграции, усиливается, действие других ослабляется, например, все меньше становится изолированных популяций с их близкородственными браками и повышенным коэффициентом инбридинга и т. д. В то же время главный фактор эволюции — естественный отбор — не играет той роли в человеческом обществе, какую он играет в популяциях всех прочих организмов.

Однако это не означает, что человек совсем закончил свою эволюцию. Эволюция человека перешла преимущественно в сферу социальную. Собственно социальная сфера эволюции — это культура. Многие исследователи наряду с генетической наследственностью предлагают рассматривать сигнальную наследственность (М. Е. Лобашев), социальную наследственность (Н. П. Дубинин), преемственность (С. Н. Давиденков), просто культуру (О. Солбриг и Д. Солбриг) и другие понятия. Все они означают различные формы передачи опыта между поколениями.

Сигнальная наследственность представляет собой передачу навыков адаптивного поведения от родителей потомкам, а также в пределах одного поколения и даже от потомков родителям. Несомненно, что сигнальная наследственность появилась уже у животных и формировалась на основе различных способов коммуникаций. Сюда можно отнести явление *импринтинга* (запечатления) поведенческих реакций, формирующихся на ранних стадиях постнатального развития позвоночных, различные способы обучения и подражания.

Среди млекопитающих сигнальная наследственность высокого уровня достигла у приматов. О. Солбриг и Д. Солбриг приводят пример распространения «культурного признака» в стаде макак (*Macaca fuscata*). «Это стадо приохотилось к новой пище — бататам. Одна полуторогодовалая самка, прежде чем съесть батат, стала не просто соскребать с него песок, а отмывать его в море. Такое поведение переняли другие молодые особи. Матери научились этому у своих подрастающих детенышей и стали в свою очередь обучать такому поведению более молодых потомков. В конце концов все стадо, за исключением старых самцов, которые мало общаются с остальным стадом, стало мыть бататы, прежде чем съесть их»¹.

Динамика сигнальных, или культурных, признаков сходна с динамикой биологических признаков, т. е. признаков, контролируемых генами и хромосомами. Популяции животных могут различаться по сигнальным признакам — поведению; эти признаки, подобно потоку генов, могут передаваться другим популяциям. Возможен дрейф сигнальных признаков, и по этим признакам, как и по биологическим, возможен отбор.

Наряду с этими чертами сходства имеется по меньшей мере одно существенное различие — наследование сигнальных признаков, приобретенных в онтогенезе. При этом речь идет не о наследственном закреплении онтогенетических изменений, а о сигнальной наследственности.

Зачатки социального поведения и явления сигнальной наследственности имеются уже у животных, но наивысшего расцвета сигнальная наследственность достигла в человеческом обществе в форме культуры. Социальная эволюция человека сложилась на

¹ Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. М., 1982. С. 272.

фундаменте биологической эволюции. В то же время биосоциальная сущность человека накладывает отпечаток на проявление биологических, в том числе генетических закономерностей, которым подчиняется его индивидуальное и эволюционное развитие.

20.2. Человек как объект генетики

Частная генетика человека сформировалась с учетом следующих особенностей, создающих трудности при изучении его наследственности и изменчивости:

- 1) невозможности направленных скрещиваний для генетического анализа;
- 2) невозможности экспериментального получения мутаций;
- 3) позднего полового созревания;
- 4) малочисленности потомства;
- 5) невозможности обеспечения одинаковых и строго контролируемых условий для развития потомков от разных браков;
- 6) недостаточной точности регистрации наследственных признаков и небольших родословных;
- 7) сравнительно большого числа ($2n = 46$) плохо различающихся хромосом.

Последнее затруднение, как, впрочем, и все остальные, касаются приложения так называемых традиционных методов генетического и цитогенетического анализа. В последние годы развитие новых методов в генетике и применение их к человеку позволили устранить многие, но далеко не все трудности работы с человеком как с генетическим объектом.

20.3. Методы генетики человека

Традиционные и новейшие методы, используемые в генетике человека, отражают его особенности как генетического объекта.

1. Генеалогический метод позволяет преодолеть сложности, возникающие в связи с невозможностью скрещивания и малоплодностью человека. Если есть родословные, то можно, используя суммарные данные по нескольким семьям, определить тип наследования (доминантный, рецессивный, сцепленный с полом, аутосомный) признака, а также его моногенность или полигенность.

Так, доминантный признак «*габсбургская губа*» (толстая выпяченная нижняя губа) прослеживается в династии Габсбургов, начиная с XV в. Аналогичное наследование легко выявляется для признака *брахидактилия*, или *короткопалость*, вследствие недоразвития (срастания) концевых фаланг. По доминантному типу наследуется такой дефект, как *ахондроплазия* — карликовость, связанная с резким укорочением конечностей, и др.

Использование генеалогического метода позволило установить характер наследования *гемофилии А*, или так называемой королевской гемофилии. Этот признак — несвертываемость крови вследствие дефекта или отсутствия в организме *антигемофиль-*

ного глобулина (или фактора VIII) — выражается в неостанавливаемых кровотечениях, возникающих при малейших поранениях, и приводит к гибели больных в раннем возрасте. У больных не образуется фибрин из фибриногена, а именно нити фибрина играют важную роль в реакции свертывания крови.

Гемофилия А наследуется как рецессивная аллель в X-хромосоме, т. е. обнаруживает сцепление с полом. Известно, что носительницей (гетерозиготой) гемофилии А была английская королева Виктория. Один из ее сыновей был гемофиликом и две дочери оказались гетерозиготными носительницами этой болезни. В дальнейшем благодаря бракам между представителями царствующих фамилий Европы эта рецессивная, сцепленная с полом аллель распространилась среди правителей Германии, России и Испании. Признак обнаруживает типичное кресс-кросс наследование. Мужчины поражаются чаще, поскольку имеют всего одну X-хромосому. Известны случаи гемофилии у женщин. Лечение больных основано на введении им больших количеств антигемофильного глобулина, получаемого из донорской крови.

Другой тип — гемофилия В — открыт сравнительно недавно. Он связан с дефектом другого фактора свертывания крови — тромбопластина, или фактора IX. Это также рецессивный признак, сцепленный с полом.

На рис. 20.1 показаны условные обозначения, используемые при составлении родословных. На рис. 20.2 представлена часть родословной, иллюстрирующей наследование гемофилии А. Как пример наследования по доминантному типу на рис. 20.3. демонстрируется наследование ахондроплазии.

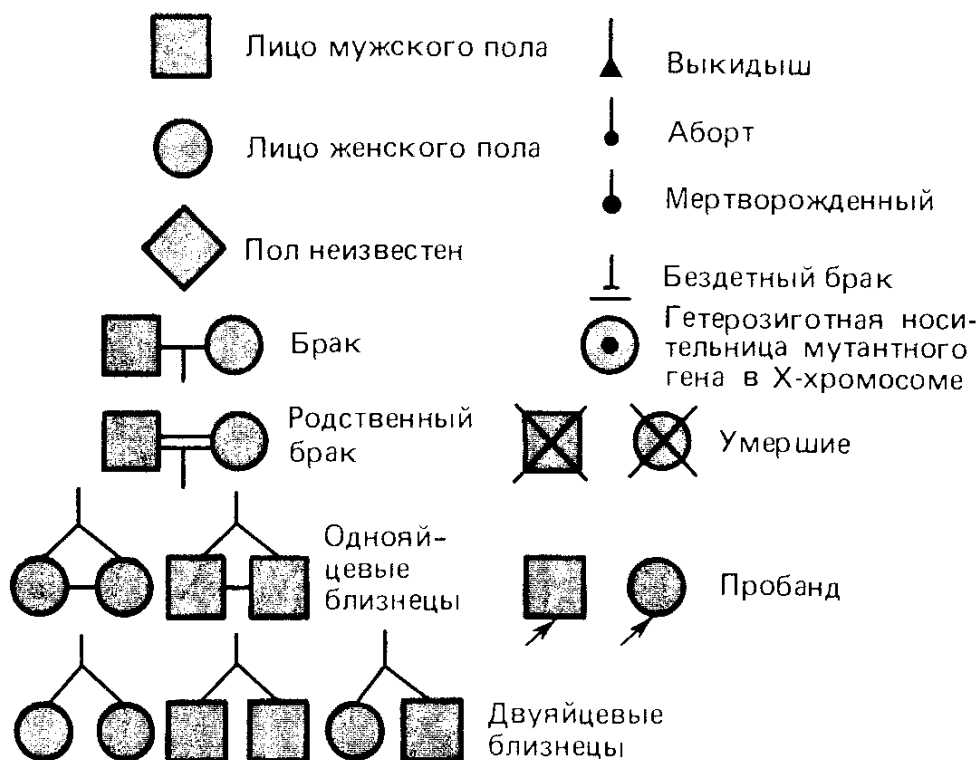


Рис. 20.1. Стандартные обозначения, принятые при составлении родословных (Н. П. Бочков, А. Ф. Захаров, В. И. Иванов, 1984)

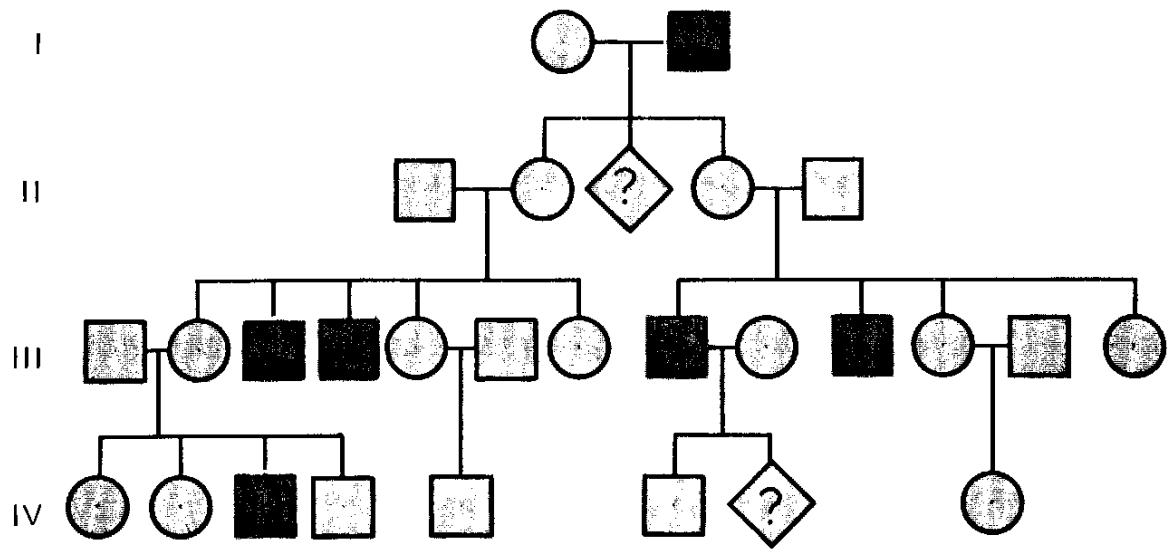
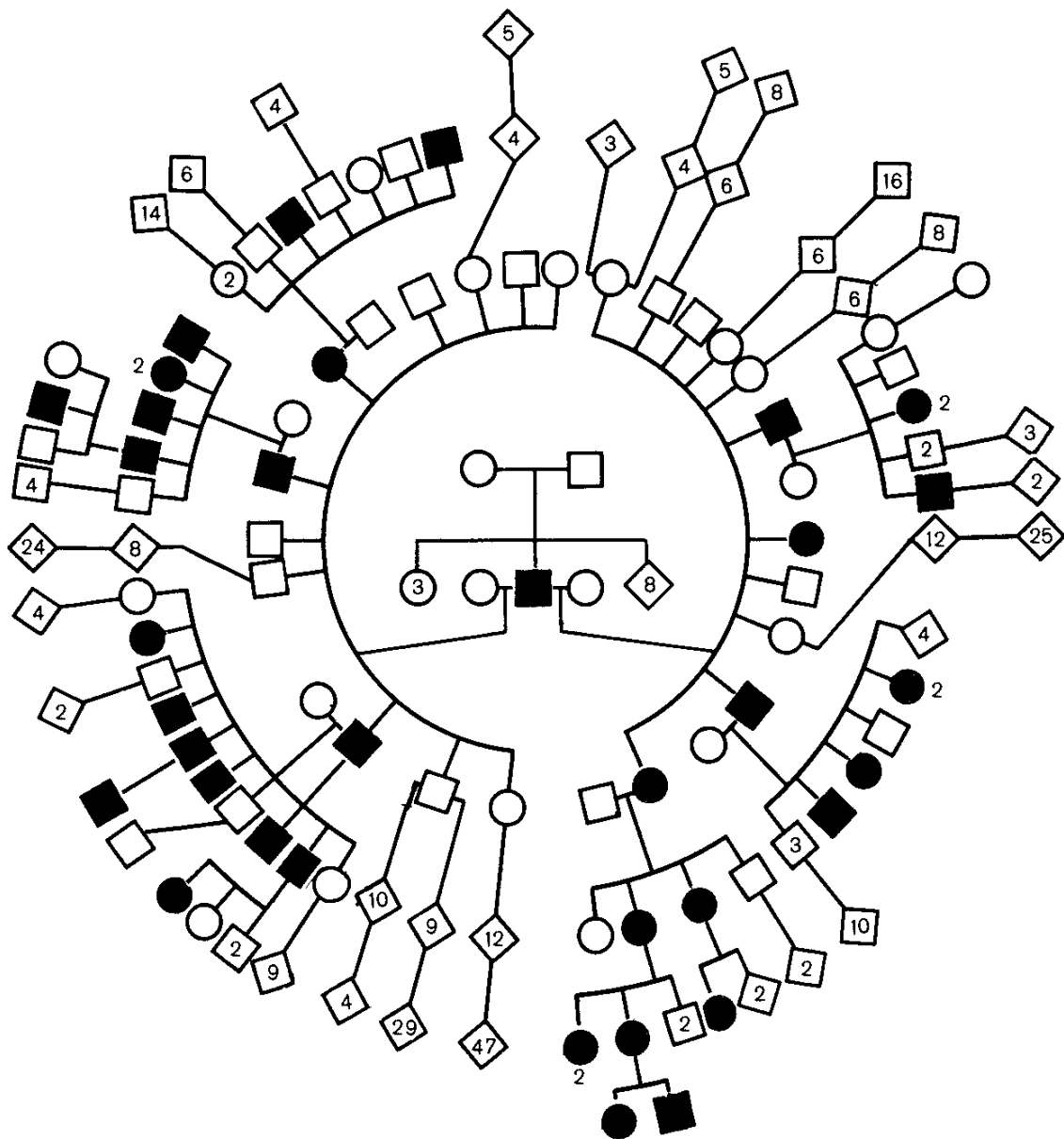


Рис. 20.2. Родословная, иллюстрирующая наследование гемофилии А (из М. Е. Лобашева, 1967).

Красные значки — больные индивидуумы; I — IV — поколения



Существенная трудность, с которой встречается генеалогический метод, — нехватка подробных родословных.

2. **Близнецовый метод** используется для выяснения степени наследственной обусловленности исследуемых признаков. Явление полиэмбрионии известно у некоторых животных (см. гл. 4). Оно характеризуется появлением нескольких *идентичных*, или

однойцевых, близнецов (ОБ) — *монозиготных близнецов*. Наряду с такими ОБ существуют *разнойцевые близнецы (РБ)*, рождающиеся при оплодотворении двух одновременно созревающих яйцеклеток. Если ОБ как результат клонирования одной оплодотворенной яйцеклетки всегда идентичны по полу и очень похожи, часто практически неразличимы, то РБ могут иметь как одинаковый, так и разный пол. Встречаются РБ, сильно различающиеся по внешним признакам, как различаются особи, возникшие в результате самостоятельных случаев оплодотворения. В этом случае РБ представляют результат расщепления при скрещивании.

Основоположником близнецового метода в генетике человека был Ф. Гальтон, (XIX в.), который обратил внимание на то, что есть близнецы похожие и различающиеся и предложил сравнивать их между собой для выяснения влияния наследственности и «питания», т. е. влияния среды на проявление признаков. Несмотря на то что Ф. Гальтон в то время не мог точно указать, какие близнецы являются ОБ, а какие РБ, он впервые применил подход, широко используемый в генетике человека в настоящее время.

Близнецовый метод основан на трех положениях:

1. ОБ имеют идентичные генотипы, а РБ — различные генотипы.

2. Среда, в которой развиваются близнецы и под действием которой появляются различия признаков у ОБ, может быть одинаковой и неодинаковой для одной и той же пары ОБ.

3. Все свойства организма определяются взаимодействием только двух факторов: генотипа и среды.

Эти положения позволяют сравнивать влияние генотипа и среды на развитие признаков в соответствии со схемой на рис. 20.4.

ОБ и РБ обычно сравнивают по ряду показателей на большом материале. На основе полученных данных вычисляют показатели *конкордантности* (частоты сходства) и *дискордантности* (частоты различий). Некоторые примеры сравнения ОБ и РБ, представлен-

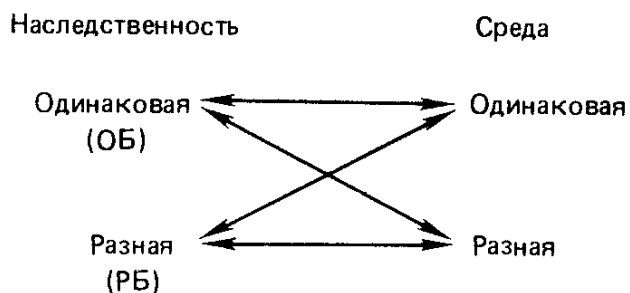


Рис. 20.4. Схема, иллюстрирующая возможность близнецового метода в изучении роли генотипа и среды в развитии признаков человека (по Н. Н. Медведеву, 1972). ОБ — однойцевые близнецы, РБ — разнойцевые близнецы

Рис. 20.3. Родословная, показывающая доминантное наследование ахондроплазии, или хондродистрофической карликовости (из В. П. Эфроимсона, 1964).

Красные значки — больные индивидуумы, цифры — число потомков

ные в табл. 20.1, показывают, что у ОБ конкордантность значительно выше, чем у РБ, однако степень сходства для разных признаков варьирует. Это позволяет оценить роль генотипа и среды в их проявлении.

Предложено несколько способов количественного выражения доли наследственности в развитии признака. Простейший из них:

$$H = \frac{M \% - D \%}{100 - D \%},$$

где H — доля наследственности, M — конкордантность у ОБ, D — конкордантность у РБ.

Близнецовый метод дает ценные результаты при изучении морфологических и физиологических признаков. Его возможности не следует переоценивать, особенно в применении к показателям социального поведения человека. Многие авторы пытались

Таблица 20.1. Конкордантность некоторых признаков человека у однояйцевых и разнаяйцевых близнецов (по С. М. Гершензону, 1983)

Признаки	Конкордантность, %	
	ОБ	РБ
<i>Нормальные признаки</i>		
Группы крови системы АВО	100	64
Форма бровей	100	51
Цвет глаз	99,5	28
Цвет волос	97	23
Папиллярные линии кистей рук	92	40
<i>Патологическое состояние</i>		
Косолапость	23	2
Грыжа спинного мозга	77	33
Синдром Дауна	89	7
Рахит	88	22
Паралитический полиомиелит	36	6
Корь	95	87
Скарлатина	84	47
Дифтерит	50	38
Рак	16	14
Эпилепсия	67	3
Слабоумие	91	53
Шизофрения	80	13
Маниакально-депрессивный психоз	77	19

анализировать склонность к преступлениям, используя близнецовый метод (некоторые результаты представлены в табл. 20.2).

Из этой таблицы следует, что если один из пары близнецов совершает преступление, то вероятность того, что и второй близнец преступник, значительно выше для ОБ, чем для РБ.

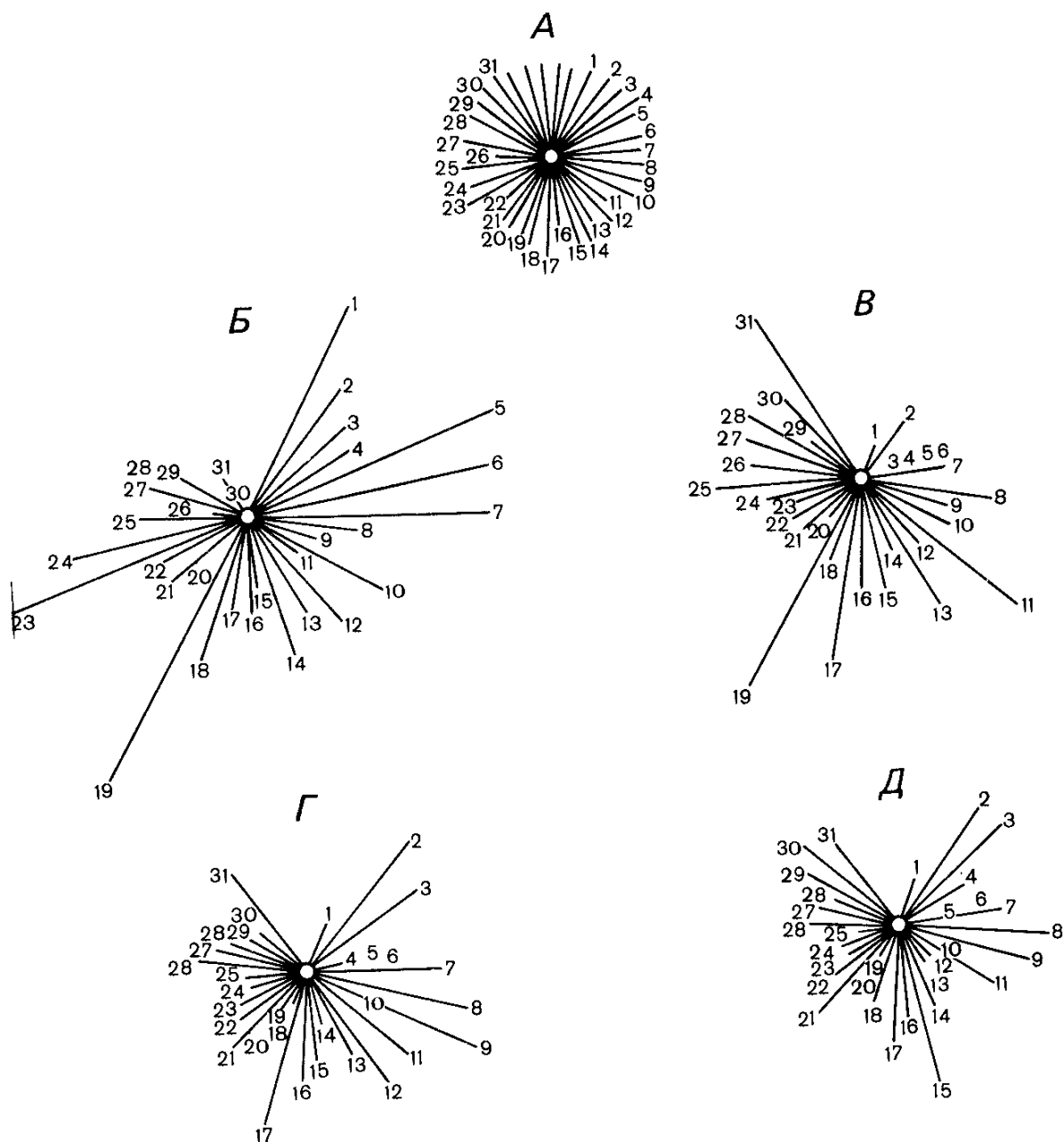


Рис. 20.5. Полярные координаты, иллюстрирующие обмен веществ в организме человека (R. Williams, по Т. Янагасаэ, 1979). А — гипотетический средний индивидуум; Б, В — фактические примеры неродственных взрослых индивидуумов; Г, Д — однояйцевые близнецы.

В качестве показателей (длина луча) использованы значения интенсивности обмена таких соединений, как: 1 — креатинин, 2 — сахароза, 3 — KCl, 4 — NaCl, 5 — HCl, 6 — мочевая кислота, 7 — глюкоза, 8 — лейцин, 9 — валин, 10 — цитруллин, 11 — аланин, 12 — лизин, 13 — таурин, 14 — глицин, 15 — серин, 16 — глутаминовая кислота, 17 — аспарагиновая кислота, 18 — соли лимонной кислоты и т. д.

Далеко идущие выводы о роли наследственности в асоциальном поведении людей были бы поспешными, поскольку в приведенных исследованиях не учитывался ряд важных социальных показателей, характерных для близнецов. Прежде всего то, что ОБ, как правило, дружнее РБ. Для ОБ характерны более сходный социальный опыт и замкнутость. В большинстве исследований не указано, какие именно преступления совершили близнецы, были ли их поступки сходными или различными. Необходим также анализ

Таблица 20.2. Сравнение преступного поведения однойцевых и разнородных близнецов (по В. П. Эфрому, 1971)

Автор, год исследования	Страна	ОБ			РБ		
		Число пар	Второй близнец		Число пар	Второй близнец	
			тоже преступник	не преступник		тоже преступник	не преступник
Ланге, 1929	Германия	13	10	3	17	2	15
Легра, 1932	Голландия	4	4	0	5	0	5
Кранц, 1936	Германия	31	20	11	43	23	20
Штумпфель, 1939	»	18	11	7	19	7	12
Боргстрем, 1939	Финляндия	4	3	1	5	2	3
Розанов и др., 1941	США	45	35	10	27	6	21
Иосимасу, 1957	Япония	28	14	14	26	0	26
Хайяси, 1967	»	15	11	4	Данные недостаточны		
Христиансен, 1968	Дания	91	48	43	122	29	93
Суммарные данные		249	156 62,6 %	93	264	69 25,4 %	195

формирования личности близнецов, их общения, среды и т. д. Сходство поведения ОБ может быть результатом их одинакового социального опыта, их поведение может быть обусловлено сочетанием одинакового генотипа и одинаковой или очень похожей социальной среды.

Для применения близнецового метода требуется критическое отношение к его возможностям.

Пример последовательного применения близнецового метода представляет исследование роли генотипа и модификаций в формировании обмена веществ человека. На рис. 20.5 графически условно представлены полярные координаты, отражающие обмен различных соединений у двух однойцевых близнецов и двух неродственных индивидуумов в сравнении с неким гипотетическим средним вариантом. По некоторым показателям резко различаются даже однойцевые близнецы — результат клонирования (см. гл. 4) размножения организмов. Такие различия могут быть связаны как со случайными изменениями среды, происшедшими в онтогенезе близнецов, так и с естественными (внутренними) причинами модификационной изменчивости (см. гл. 17).

Таким образом, применение близнецового метода показывает, что такие генетически детерминированные признаки, как показатели обмена веществ, могут сильно подвергаться модификационной изменчивости. Это следует учитывать, в частности, при описании симптомов наследственных заболеваний, что очень важно в медицинской генетике.

3. Цитогенетический метод. Хромосомный набор человека представлен на рис. 20.6. Как уже упоминалось, довольно большое число трудно отличимых друг от друга (в пределах групп) хромосом создавали трудности в применении цитологического метода и в развитии цитогенетики человека. Разработка методов диффе-

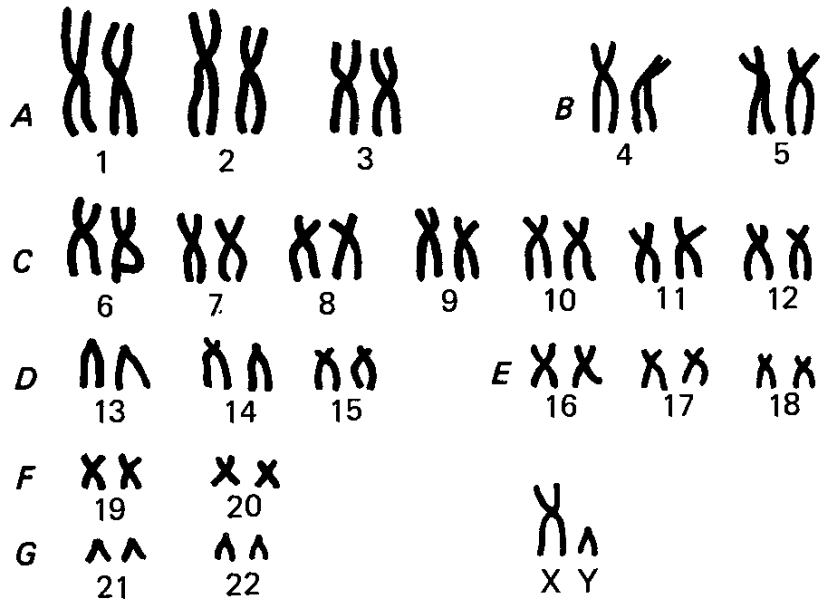
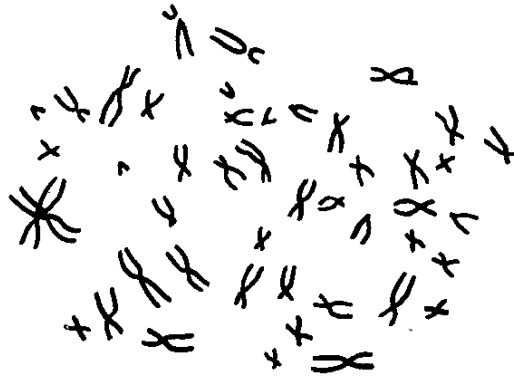


Рис. 20.6. Хромосомный набор мужчины (А. А. Прокофьева-Бельговская, 1969). А — Е — группы близких по размерам и строению хромосом

ренциальной окраски упростила проблему идентификации всех хромосом человека (рис. 20.7). Благодаря культивированию клеток человека *in vitro* можно получать достаточно большой материал для описания цитологических особенностей исследуемого индивидуума. Для этого обычно используют кратковременную культуру лейкоцитов периферической крови.

Цитологический контроль применяют при диагностике ряда наследственных заболеваний, которые связаны с явлениями анеуплоидии и различными хромосомными aberrациями (см. далее). Наряду с изучением митотических хромосом полезную информацию получают и при наблюдении интерфазных клеток. В частности, мужчин и женщин различают по наличию в интерфазном ядре так называемого *тельца Барра*, или *полового хроматина*. Он есть у женщин и отсутствует у мужчин. Половой хроматин представляет собой результат гетерохроматинизации одной из двух X-хромосом, инактивируемой у женщин (см. гл. 16). Идентификация полового хроматина (рис. 20.8) в клетках соскоба слизистой оболочки рта широко применяется для определения генети-

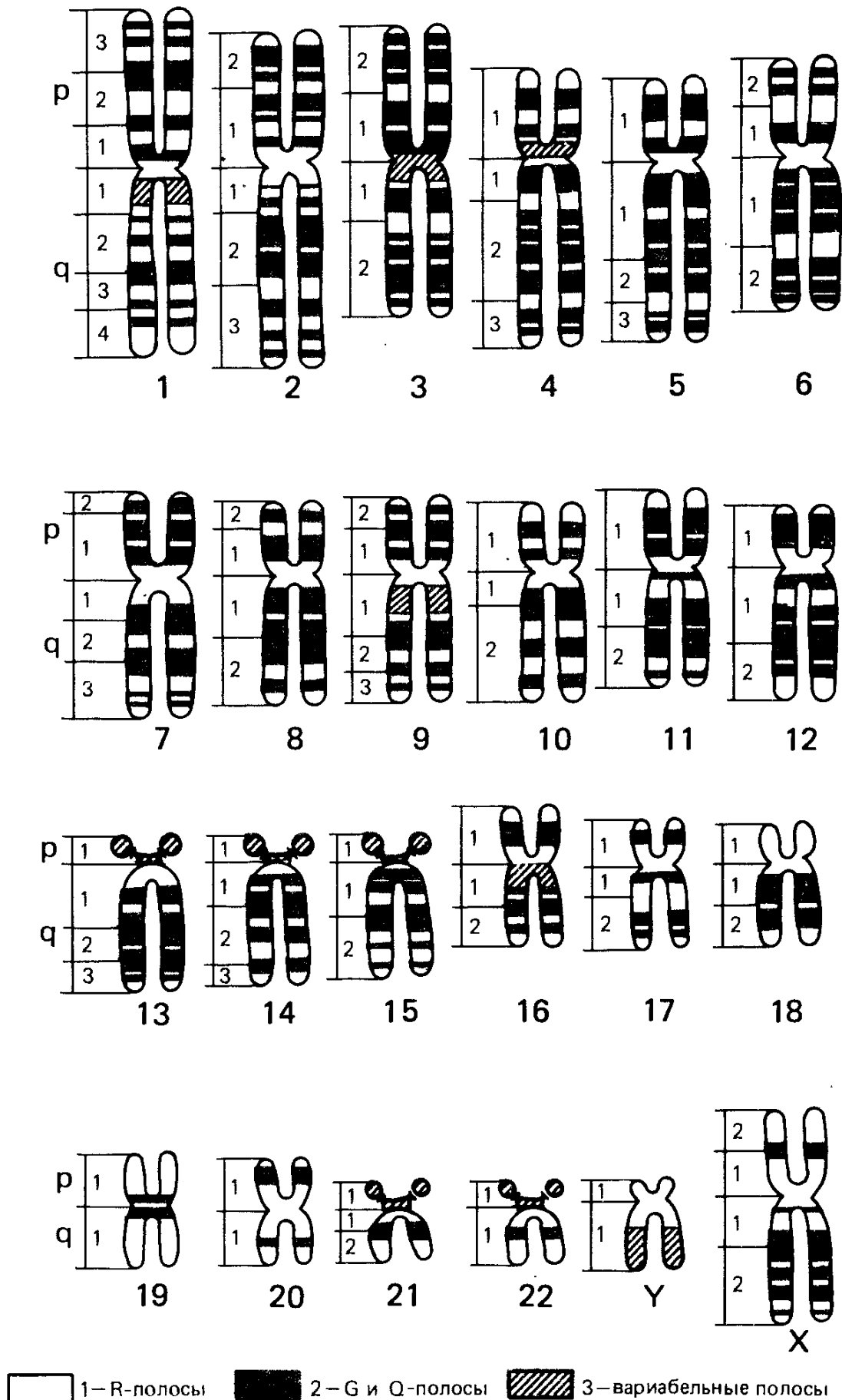


Рис. 20.7. Идиограмма кариотипа человека, получаемая с применением метода дифференциальной окраски.

p и q — плечи хромосом. Цифры около хромосом (1—4) — участки плеч, R, G, Q — полосы, наблюдаемые при окраске различными способами



Рис. 20.8. Половой хроматин я вдре эпителиальной клетки слизистой оболочки рта (А. А. Прокофьева-Бельговская, 1969)

Цитологический метод приобрел большое значение в связи с возможностями, которые открыла *гибридизация соматических клеток*. Как было показано в гл. 11, получение гибридов между соматическими клетками человека и мыши позволяет в значительной степени преодолеть проблемы, связанные с невозможностью скрещиваний, и картировать многие гены, контролирующие метаболизм клетки.

Клонирование ряда генов человека позволило обнаружить полиморфизм по этим генам на основе использования рестрикционного анализа хромосомной ДНК. Различающиеся фрагменты ДНК, соответствующие данному гену или его участку, выявляются при помощи электрофореза рестрикетов и последующей гибридации их с радиоактивным зондом — клонированным участком ДНК, по которому изучают полиморфизм. Такие зонды используют также для локализации генов непосредственно на препаратах хромосом. Объединение этого подхода с методом дифференциальной окраски дает возможность «привязывать» конкретные гены к участкам конкретных хромосом. Объединение генеалогического метода с цитогенетическим, а также с новейшими методами генной инженерии значительно ускорило процедуру картирования генов у человека. Карты хромосом человека представлены на рис. 20.9.

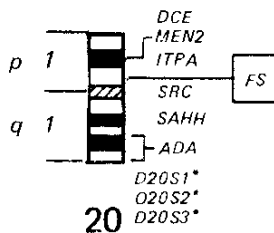
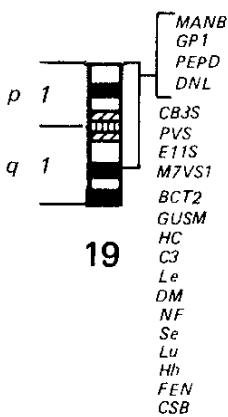
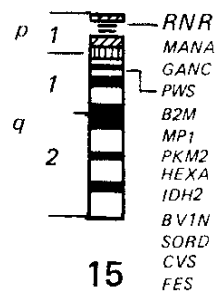
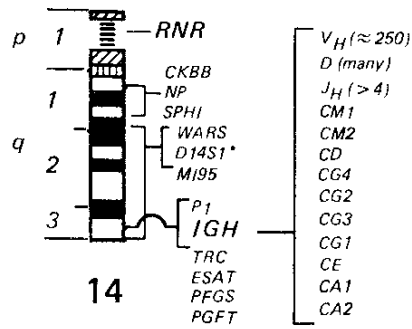
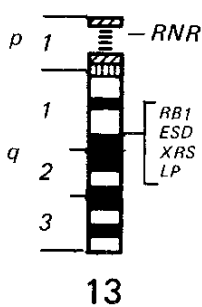
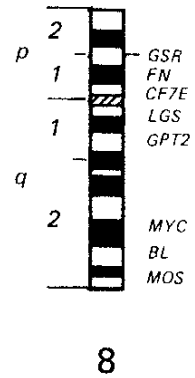
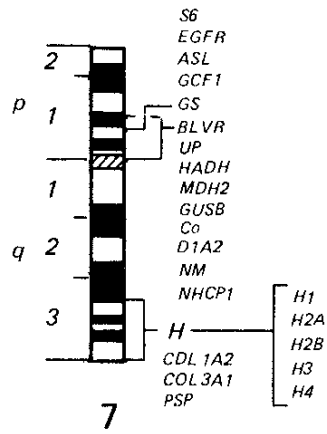
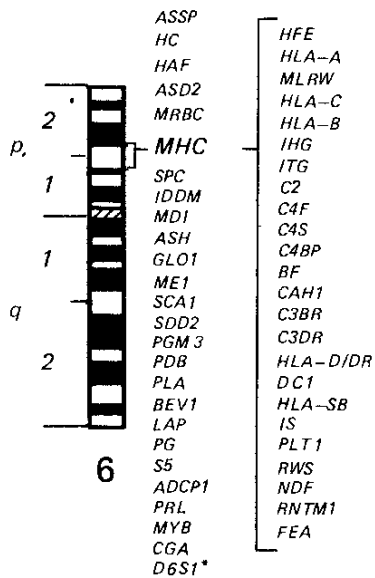
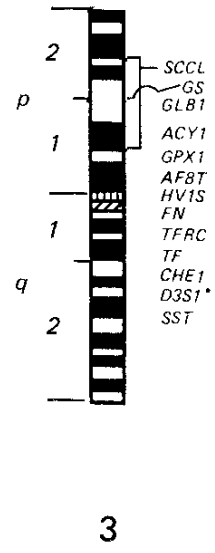
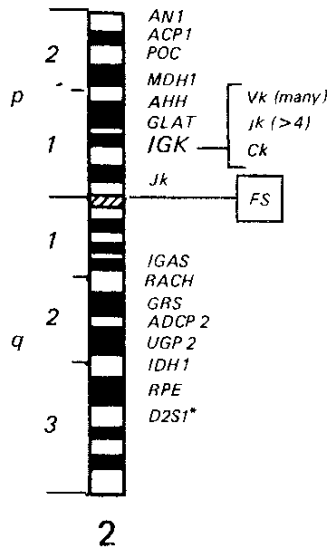
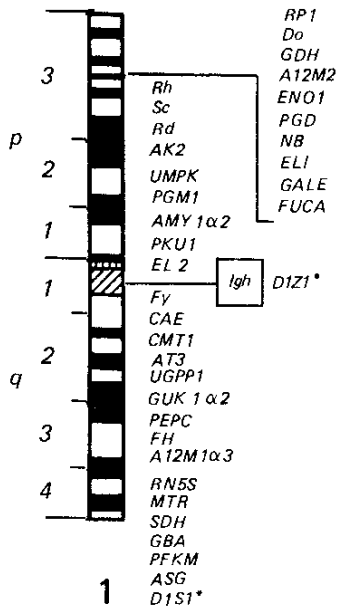
4. Популяционный метод, или методы генетики популяций, о которых говорилось в гл. 18, широко применяются в исследованиях человека. Он дает информацию о степени гетерозиготности и полиморфизма человеческих популяций, выявляет различия частот аллелей между разными популяциями. Так, хорошо изучено распространение аллелей *системы групп крови АВО*. Некоторые данные представлены в табл. 20.3. Различную концентрацию конкретных аллелей локуса 1 связывают с известными данными о чувствительности разных генотипов к инфекционным

ческого пола пациентов в практике медицинской генетики, а также в спортивной медицине.

Путем цитологических исследований людей, имеющих разное число X- и Y-хромосом вследствие нерасхождения, выявили, что число телец полового хроматина соответствует формуле

$$B = X - P/2,$$

где B — число телец Барра, X — число X-хромосом, P — пloidность. Для диплоидных клеток это означает, что число телец полового хроматина равно числу X-хромосом минус единица.



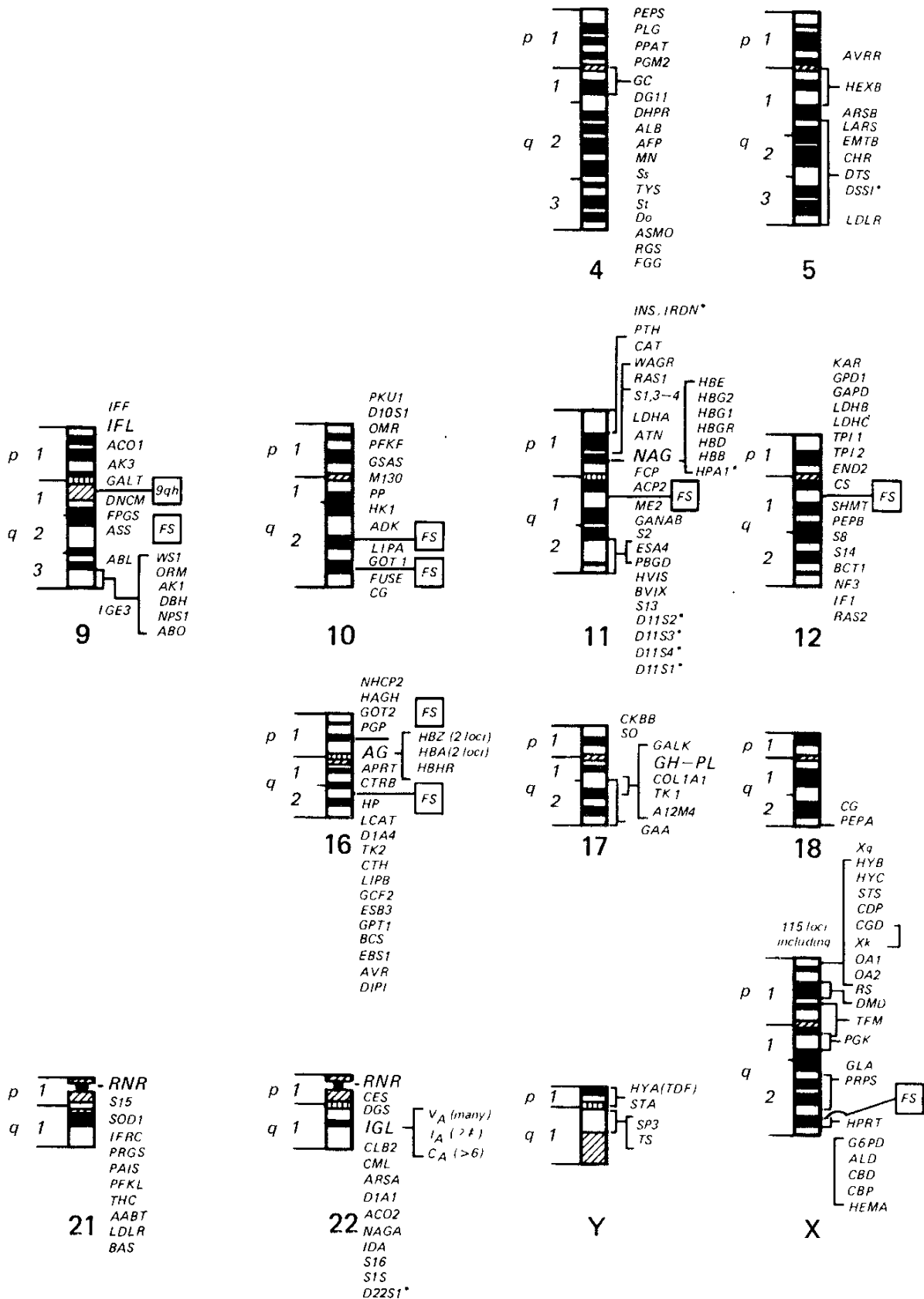


Рис. 20.9. Карты хромосом человека (по Н. П. Бочкову, А. Ф. Захарову, В. И. Иванову, 1984).

Слева (см. с. 508) p и q — плечи хромосом, номера их участков. Справа (см. с. 509) — обозначение генов согласно их международной номенклатуре. Поперечные полосы — результаты, полученные при дифференциальной окраске хромосом

Таблица 20.3. Частоты (%) групп крови в популяциях различных частей света (Ф. Г. Добжанский, 1966)

Популяция	O	A	B	AB
<i>Европа</i>				
Шотландцы	51,2	34,2	11,8	2,7
Французы	41,6	47,0	8,0	3,3
Сербы	32,5	41,9	18,2	7,3
Поляки	33,1	39,3	19,0	8,5
Русские (москвичи)	33,3	37,4	22,8	6,5
<i>Азия</i>				
Персы	37,9	33,3	22,2	6,6
Индусы (Бомбей)	31,8	29,2	28,3	10,8
Сиамцы (Тайланд)	37,3	21,8	33,1	7,8
Буряты	30,4	21,9	37,8	9,9
Китайцы (Пекин)	28,6	26,6	32,0	12,8
Японцы (Токио)	30,1	38,4	21,9	9,7
<i>Африка</i>				
Египтяне	32,6	35,5	24,4	7,5
Кикуйя (Кения)	60,4	18,7	19,8	1,1
Банту (Южная Африка)	46,4	29,5	19,4	4,7
Бушмены	56,0	33,9	8,5	1,6
<i>Австралия</i>				
Аборигены	60,7	39,3	0	0
<i>Америка</i>				
Эскимосы (Аляска)	38,1	44,1	13,1	4,8
Блад	17,4	81,8	0	0,7
Навахо	72,6	26,9	0,2	0,2
Майа	97,8	1,3	0,5	0,5
Бороро (Бразилия)	100	0	0	0

болезням. Это помогает понять направление эволюции и отбора, действовавшего в разных регионах, в истории человечества.

Предполагается, что снижение концентрации аллели i^0 в ряде популяций было связано с распространением чумы, так как возбудитель чумы *Pasteurella pestis* обладает свойством антигена O. Снижение концентрации аллели I^A связывают с эпидемиями оспы, предпочтительно элиминировавшими носителей антигена A.

Популяционный метод позволяет определить адаптивную ценность конкретных генотипов. Многие признаки и соответственно обуславливающие их гены адаптивно нейтральны и проявляются как естественный полиморфизм человеческих популяций (например, многие морфологические признаки: цвет глаз, волос, форма ушей и т. д.). Другие признаки возникли как адаптивные по отношению к определенным условиям существования; например, темная пигментация кожи негров предохраняет от действия солнечной радиации. Известны примеры условно адаптивных аллелей. К их числу относится такая генетическая аномалия, как *серповидноклеточная анемия*. Рецессивная аллель, вызывающая в гомозиготном состоянии это наследственное заболевание, выражается

в замене всего одного аминокислотного остатка в β -цепи молекулы *гемоглобина* (глутаминовая кислота \rightarrow валин). Больные серповидноклеточной анемией погибают в раннем возрасте. Эта болезнь распространена в популяциях тропической Африки и тропической Азии. Сравнительно высокая частота летальной аллели в указанных

Таблица 20.4. Частоты (%) наследственных аномалий при близкородственных и неродственных браках (К. Штерн, 1960)

Страна	Неродственные браки	Браки между кузенами
Франция	3,5	12,8
Япония	1,02	1,69
Швеция	4	16
США	9,82	16,15

районах озадачивала исследователей, пока А. Аллисон не обнаружил, что гетерозиготы по серповидноклеточной анемии гораздо устойчивее к *малярии*, чем гомозиготы по нормальной аллели. Таким образом, в естественных условиях распространения малярии в местных популяциях отбор шел в сторону поддержания в гетерозиготе аллели, очевидно, вредной в гомозиготном состоянии.

В популяциях человека так же, как и в популяциях других организмов, в гетерозиготном состоянии содержится значительный *генетический груз*, т. е. *рецессивные аллели, приводящие к развитию различных наследственных болезней*. Как явствует из гл. 18, повышение степени инбридинга в популяциях должно приводить к повышению частоты гомозиготизации рецессивных аллелей. Эта закономерность должна предостерегать от заключения *близкородственных браков*. Сравнение частот наследственных аномалий у потомков от неродственных браков и от браков между кузенами (двоюродными братьями и сестрами) показывает, что во втором случае частота аномалий обычно значительно выше (см. табл. 20.4).

Источником генетического груза служат мутации, возникающие в популяциях человека спонтанно или под действием факторов окружающей среды, среди которых все больший удельный вес приобретают так называемые антропогенные факторы (см. гл. 21). Несмотря на насущную необходимость знания частот *спонтанного мутирования* у человека, общая оценка этого показателя пока весьма приближительна. Значительно проще оценить частоту доминантных, нежели рецессивных, мутаций. Например, по данным датских генетиков, частота доминантной мутации *ахондроплазии* составляет 0,00004 на локус за поколение, т. е. 4 гаметы из 100 000 несут вновь возникшие мутации. Данные, касающиеся других мутаций, колеблются между частотами порядка 1 на 10 000 и 1 на 100 000 на локус.

Если принять, что число структурных генов в гаплоидном наборе человека от 100 000 до 1 000 000 (по оценкам разных исследователей), то суммарная частота генных мутаций составит от 1 до 10 на гаплоидный геном.

При изучении летальных эффектов в близкородственных браках показано, что около 8 % всех людей несут вновь возникшую мутацию. Таким образом, приближительные оценки, получаемые

Таблица 20.5. Частота возникновения генных мутаций у человека (Н. П. Бочков, А. Ф. Захаров, В. И. Иванов, 1984)

Признаки (заболевания)	Частота мутаций на 1 млн. гамет
<i>Аутосомно-доминантные</i>	
Ахондроплазия	5,1—13
Аниридия	2,6—2,9
Микрофтальмия без психических нарушений	5
Синдром Марфана	4,2—5,8
Пельгеровская аномалия лейкоцитов	9—27
Нейрофиброматоз	44—100
Множественный полипоз толстой кишки	10—50
Ретинобластома	3—12,3
Хорея Хантингтона	1—10
Туберозный склероз	6—10,5
Мышечная дистрофия	8—11
Синдром Апера (акроцефало-синдактилия)	3—4
Несовершенный остеогенез	7—13
Поликистоз почек	65—120
Множественные экзостозы	6,3—9,1
Синдром Гиппеля — Линдау	0,18
<i>Аутосомно-рецессивные</i>	
Микроцефалия	27
Амавротическая идиотия	11
Буллезный эпидермолиз	5
Ихтиоз	11
<i>Рецессивные, сцепленные с полом</i>	
Гемофилия А	37—52
Гемофилия Б	2—3
Мышечная дистрофия типа Дюшена	43—105
Ихтиоз	24
Глазо-лице-пальцевый синдром	5

разными методами, совпадают. Частоты возникновения некоторых генных мутаций у человека представлены в табл. 20.5.

Частота хромосомных aberrаций и геномных изменений значительно превышает частоту генных мутаций. Например, частота нерасхождения 21-й пары хромосом около 1 %. Если принять этот показатель как среднюю частоту нерасхождения, то суммарная частота нерасхождения составит около 20 %. По-видимому, высокий уровень гибели зигот на ранних стадиях развития у человека объясняется высокой суммарной частотой мутаций различного типа.

Как и любая другая дисциплина, современная генетика человека использует многие методы смежных наук: биохимии, физиологии, молекулярной биологии, генной инженерии и т. д. Большой удельный вес в решении проблем генетики человека и медицинской генетики имеет *онтогенетический метод*, согласно которому развитие нормальных и патологических признаков рассматривается в ходе индивидуального развития. Некоторые наследственные

болезни проявляются только в определенном возрасте. Примером может служить *хорея Хантингтона*, наследующаяся как ауто-сомный доминантный признак. Это заболевание выражается в расстройстве психики у больных в возрасте 25—45 лет. К этой же категории относится *болезнь Альцгеймера* (старческое слабоумие) и др.

20.4. Медицинская генетика

Генетический груз в человеческих популяциях проявляется в большом числе наследственных заболеваний. Их известно около 2000. Частоту наследственных заболеваний можно оценить на примере исследования, проведенного А. Стивенсоном в Северной Ирландии. Он обнаружил, что около 4 % новорожденных несут серьезные генетические дефекты. Эта цифра не включает выкидыши и мертворождения, частота которых составляет около 14 % от зарегистрированных беременностей. Часть из них, несомненно, происходит по причинам генетических аномалий. Эта цифра (4 %) не включает такие распространенные болезни, как диабет и шизофрения, в возникновении которых существенную роль также играет наследственность компонента.

А. Стивенсон установил, что около 26 % больничных коек в Северной Ирландии занимают пациенты, страдающие наследственными болезнями. Кроме того, 6—8 % пациентов, консультирующихся с врачами, тоже относятся к этой категории.

Упомянутая уже шизофрения встречается в среднем с частотой 1 %, а в некоторых странах и чаще. Например, на севере Швеции частота этого заболевания колеблется между 2 и 3 %.

Изучение и возможное предотвращение последствий генетических дефектов человека — предмет медицинской генетики. Условно наследственные болезни можно подразделить на три большие группы: болезни обмена веществ, молекулярные болезни, которые обычно вызываются генными мутациями, и хромосомные болезни.

1. **Болезни обмена веществ** человека с позиций генетики стали предметом изучения уже в начале нашего столетия. Напомним исследования А. Гаррода, начатые им в 1902 г., по врожденным «ошибкам» метаболизма. Пример наследственных заболеваний, причиной которых являются генные мутации, блокирующие обмен фенилаланина на разных стадиях, показаны на рис. 20.10. Самая безобидная из этих болезней — *альбинизм* (встречающаяся с частотой от 1:10 000 до 1:200 000) выражается в повышенной чувствительности к солнечному свету из-за отсутствия кожных пигментов, а также в седине и дефектах зрения.

Фенилкетонурия встречается среди новорожденных с частотой 1:10 000, а в популяции 1—4:100 000. Если не поставить своевременный диагноз и не исключить фенилаланин из пищи новорожденного, то нарушается миелинизация мозга, развивается микроцефалия, резко выраженное слабоумие. Задержка нервно-психического развития наблюдается и при *тирозинозе*. *Алкаптонурия*

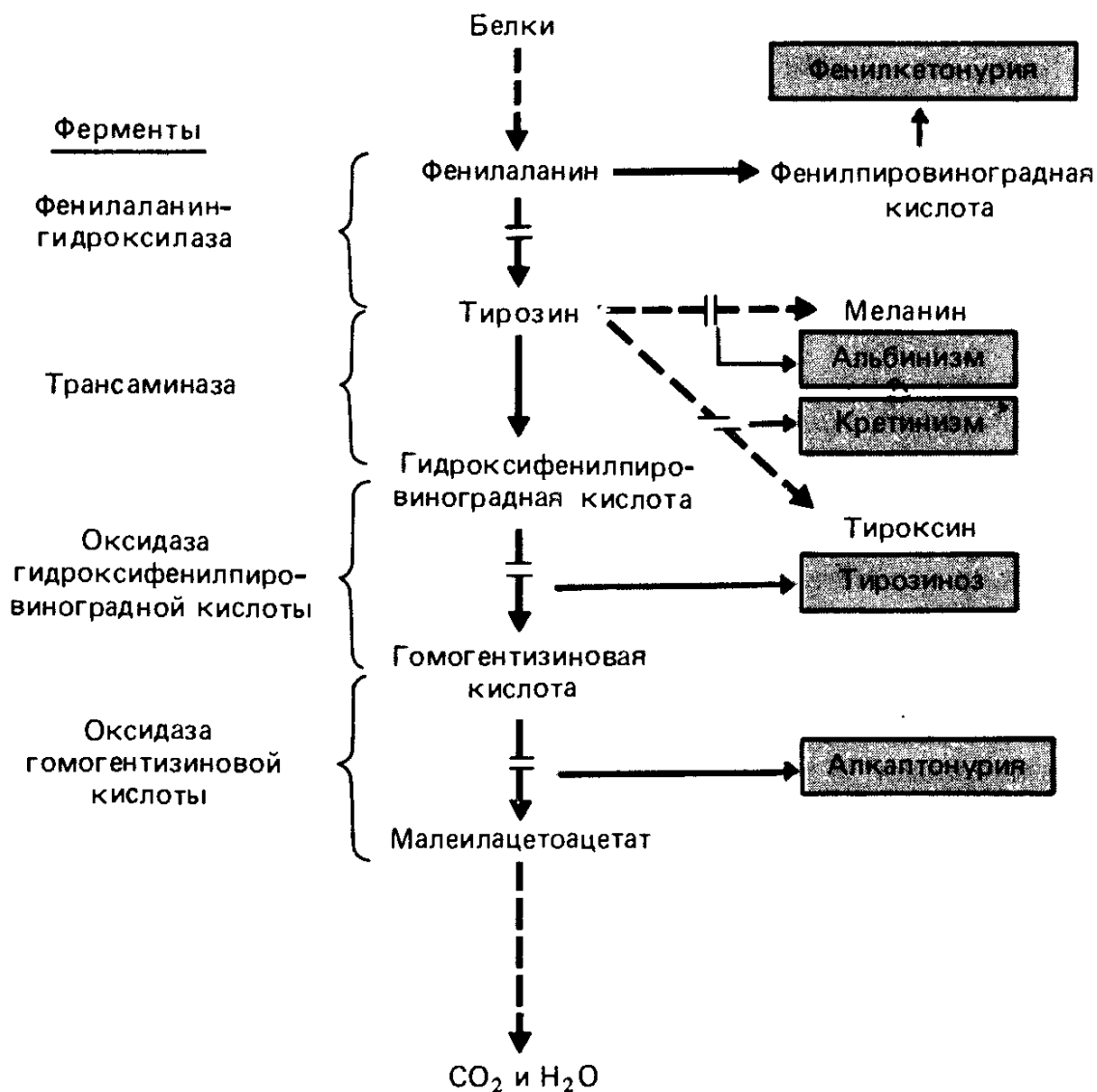


Рис. 20.10. Наследственные болезни, причинами которых является блокирование ферментативных реакций превращения фенилаланина. Толстые стрелки — метаболический путь, разрывы в стрелках — прерывание реакций, тонкие стрелки указывают на наследственные заболевания

проявляется в среднем возрасте в виде деформирующих артритов конечностей и позвоночника.

2. **Молекулярные болезни.** Граница между болезнями обмена веществ и молекулярными болезнями условна и скорее отражает степень осведомленности о причинах наследственной аномалии. Подробно изучено значительное число так называемых *гемоглобинопатий*, т. е. болезней, возникающих из-за наследственного нарушения структуры гемоглобина. Их известно более 100 для α и β -цепей глобина. Гемоглобинопатии различают в зависимости от молекулярных причин возникновения: замены аминокислот (уже приводился пример серповидноклеточной анемии — HbS) и *талассемии*. Последний тип связан с нарушением синтеза α - или β -цепей, например с замедлением или прекращением их синтеза.

Подавляющее большинство мутаций, затрагивающих аминокис-

лотные остатки, ответственные за формирование третичной и четвертичной структуры, нарушают функции гемоглобина и вследствие этого приводят к заболеваниям людей — носителей соответствующих аномалий. Данные табл. 20.6 показывают, что большинство замен (58 из 66) аминокислот в тех

Таблица 20.6. Связь между локализацией аминокислотных замен в молекуле и нарушениями функций гемоглобина человека

Локализация в молекуле	Мутантные аллели	
	всего	с аномальными функциями гемоглобина
Снаружи	66	8
Внутри:		
контакт с геном	20	19
прочие	7	7
Контакты субъединиц:		
$\alpha_1 \beta_2$	14	11
$\alpha_1 \beta_1$	5	5

частях α - и β -цепей, которые располагаются снаружи молекулы гемоглобина в результате складывания полипептидных цепей, не оказывает какого-либо существенного влияния на функционирование всей молекулы. В то же время замены во внутренней — гидрофобной части почти всегда сопровождаются нарушениями функций.

Причинами упомянутых выше талассемий могут быть делеции, например, одного или более структурных генов $Hb\alpha$. Для α -цепи имеется в норме четыре гена. Тяжесть заболевания коррелирует с числом утраченных копий гена.

β -Талассемии могут быть связаны как с делециями, так и с точковыми мутациями структурного гена, подавляющими или полностью прекращающими синтез полипептида. К этой же категории относят и более сложные перестройки. Например, известны формы гемоглобинов с множественными заменами. Происхождение одного из типов гемоглобина — *Лепоре* объясняется результатом неравного кроссинговера между расположенными рядом генами для δ - и β -цепей, имеющих высокий уровень гомологии первичной структуры. В результате получилась полипептидная цепь с N-терминальной частью δ - и C-терминальной частью β -глобина. Обнаружен и реципрокный продукт такого обмена — гемоглобин *анти-Лепоре*.

Мутации — вставки и выпадения вблизи терминаторного кодона в пределах генов для α - и β -цепи — приводят к появлению более длинных, чем в норме, соответственно α - и β -цепей глобина, поскольку естественные кодоны-терминаторы (в обоих случаях UAA) оказываются «не в фазе» и трансляция иРНК продолжается дальше, пока рибосома не встречает новый кодон-нонсенс. Это, в частности, гемоглобин *Констант Спринг* ($HbCS$), содержащий 31 лишний аминокислотный остаток в α -цепи, и некоторые другие формы.

К молекулярным болезням относятся аномалии генетических процессов, например, нарушения репликации и репарации ДНК. Наиболее подробно изучены различные формы пигментной ксеродермы — рецессивный аутосомный дефект эксцизионной репара-

ции и самой репаративной ДНК-полимеразы. На основе гибридизации соматических клеток установлено не менее шести групп комплементации, по-видимому, соответствующих самостоятельным генам, контролирующим репарацию. Больные пигментной ксеродермой проявляют повышенную чувствительность к действию солнечного света, у них развивается рак кожи.

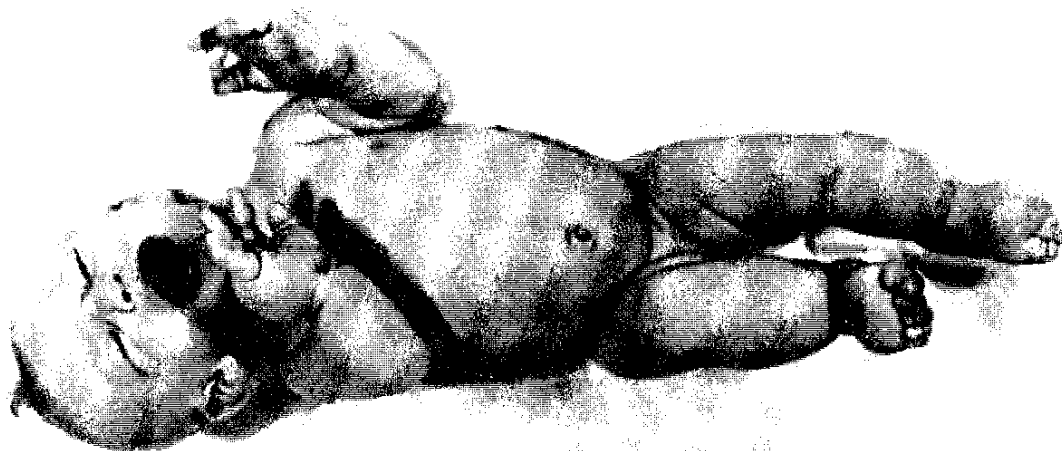
Дефекты систем репарации выявлены и при других наследственных заболеваниях. При *анемии Фанкони* дефектен этап вырезания поврежденного участка из молекулы ДНК (нарушен синтез экзонуклеазы). В случае *атаксии — телеангиэктазии (синдром Луи Бар)* также повреждены системы репарации, что выражается в повышении чувствительности клеток больных к действию излучений и химических мутагенов, резко увеличивающих в них частоту хромосомных aberrаций, имеющую высокий спонтанный уровень (около 7,5% для лимфоцитов периферической крови). При радиотерапии таких больных наблюдаются осложнения иногда со смертельным исходом. Механизмы репарации нарушены и в случае *прогерии*, или *преждевременного старения*, и *синдрома Блума*.

3. Хромосомные болезни. Этот тип наследственных заболеваний связан с изменениями числа или структуры хромосом. Характерным отличием большинства хромосомных болезней от болезней, причинами которых оказываются генные мутации, является их повторное возникновение, а не наследование от предшествующих поколений. Хромосомные и геномные мутации образуются как в гаметогенезе родителей, так и непосредственно в зиготе или на ранних стадиях дробления. В последнем случае форма наследственного заболевания будет мозаичной.

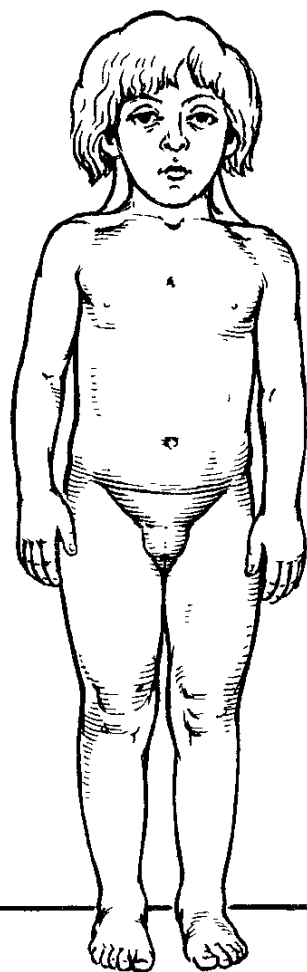
У человека известны все типы хромосомных и геномных мутаций, включая полиплоидию. Описаны редкие триплоиды и тетраплоиды в основном среди спонтанно абортированных эмбрионов или плодов и среди мертворожденных. Новорожденные с такими нарушениями живут несколько дней. Редки среди живорожденных и моносомии по аутосомам. Описаны *моносомии по 21-й и 22-й хромосомам*. Обычно это мозаичные организмы со значительной долей нормальных клеток. Любые хромосомные перестройки приводят к развитию патологического состояния.

Моносомия всего организма описана для X-хромосомы. Это *синдром Шерешевского — Тернера*, первое клиническое описание которого в 1925 г. дал советский ученый Н. А. Шерешевский, а затем в 1938 г. — Дж. Тернер. Примеры анеуплоидии у человека представлены в табл. 20.7. Поскольку у человека Y-хромосома играет определяющую пол роль (см. гл. 16), индивидуумы XO — женщины, однако с нарушениями в развитии первичных и вторичных половых признаков (рис. 20.11). Вторая X-хромосома необходима для нормальной дифференцировки гонад по женскому типу. У больных не обнаруживается половой хроматин.

Женщины-трисомии с кариотипом 47, XXX (см. табл. 20.7) нормальны в умственном и физическом отношении, плодовиты и не обнаруживают отклонений в половом развитии. С увеличением



А



Б

Рис. 20.11. Синдром Шершевского — Тернера (45, XO), А — новорожденная (фото Е. Семеновой) и Б — девочка 7 лет (фото из консультативного кабинета по медицинской генетике г. Воронежа).

Характерные признаки — низкорослость, короткая шея, отсутствие большинства женских вторичных половых признаков

Таблица 20.7. Примеры анеуплоидии у человека

Хромосомы	Синдром	Частота при рождении
<i>Половые хромосомы (♀)</i>		
ХО моносомия	Шерешевского — Тернера	1 : 5 000
XXX трисомия	} Мета-женщины	1 : 700
XXXX тетрасомия		
XXXXX пентасомия		
<i>Половые хромосомы (♂)</i>		
XYY трисомия	} Нормальные	1 : 1 000
XXY трисомия		
XXYY тетрасомия		
XXXY тетрасомия		
XXXXXY гексасомия		
<i>Аутосомы</i>		
Трисомия 21	Дауна	1 : 700
Трисомия 13	Патау	1 : 5 000
Трисомия 18	Эдвардса	1 : 10 000

числа X-хромосом увеличивается частота отклонения от нормы: умственная неполноценность, аномалии зубов, нарушения формы черепа, изменения других частей скелета, нарушение системы половых органов.

Различные комбинации X- и Y-хромосом при полисомии по половым хромосомам, кроме XYY, объединяют под общим названием *синдрома Клайнфельтера* (табл. 20.7). Y-хромосома определяет мужской пол, и мальчики до периода полового созревания мало отличаются от людей с нормальным кариотипом 46, XY. В дальнейшем наблюдается недоразвитие мужских половых признаков, прежде всего гонад, что влечет за собой недоразвитие мужских вторичных половых признаков. Больные обычно высокорослые, но с женским типом скелета и с проявлением некоторых женских вторичных половых признаков (характер волосяного покрова, гинекомастия) (рис. 20.12). В клетках больных с синдромом Клайнфельтера идентифицируется половой хроматин.

Из числа аутосомных болезней наиболее подробно изучена трисомия по 21-й хромосоме, или *синдром Дауна*. Его хромосомная природа была установлена Ж. Леженом и др. в 1959 г. Типичные признаки больных с трисомией 21 — широкая переносица, широкое расстояние между ноздрями, раскосые глаза с характерной складкой века — эпикантом (рис. 20.13). Больные обнаруживают умственную отсталость. Около половины больных имеют порок сердца и крупных сосудов. Самая опасная черта болезни Дауна — ее высокая частота (табл. 20.7). Неоднократно отмечено, что частота новорожденных с синдромом Дауна увеличивается с возрастом матери. 22—40 % детей с синдромом

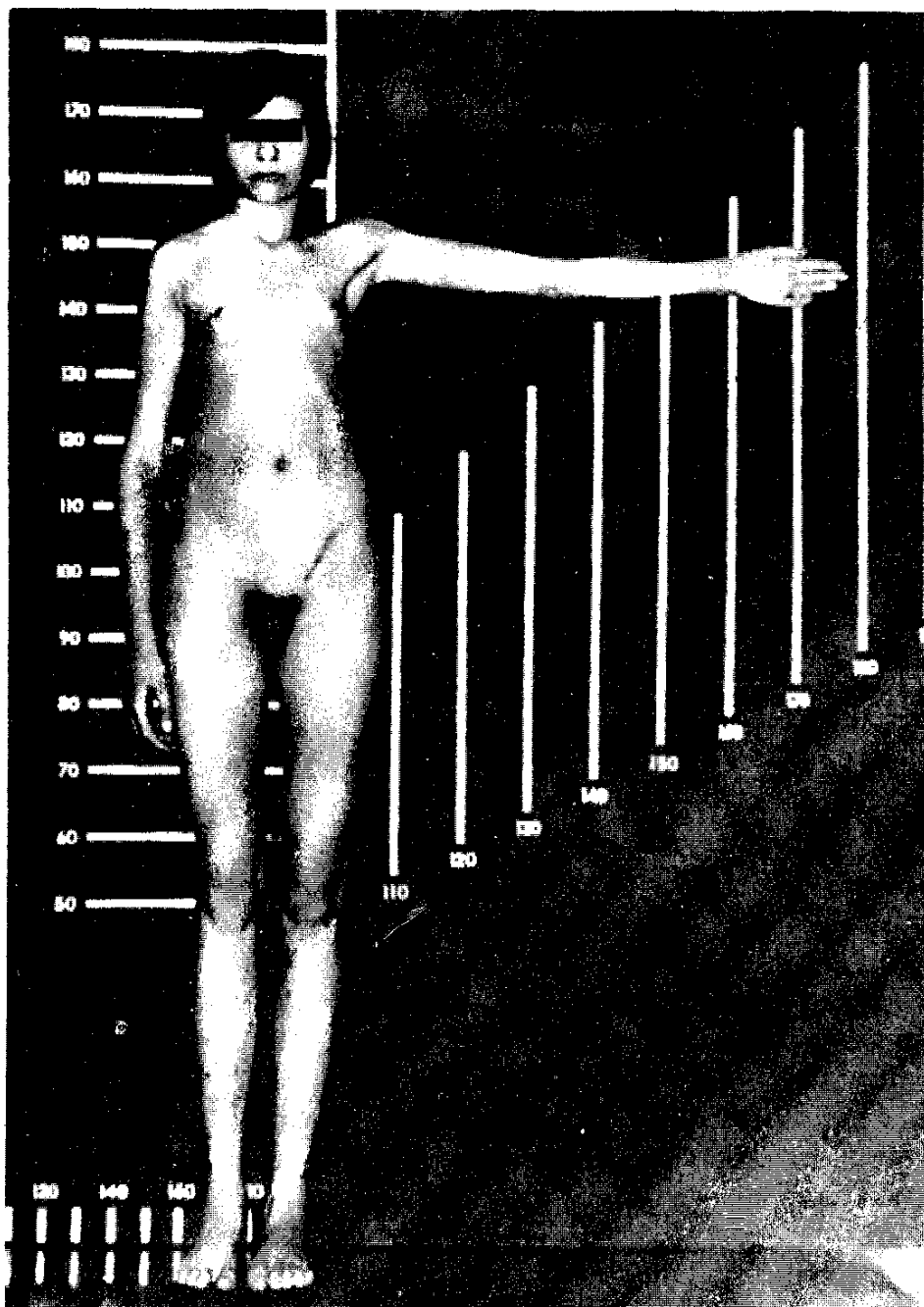


Рис. 20.12. Мужчина 16 лет с синдромом Клайнфельтера (47, XXY) (фото межобластного медико-генетического центра г. Кривой Рог).

Характерные признаки — недоразвитие тестикул, слабый волосяной покров, высокий рост и нередко развитие бюста (гинекомастия)

Дауна рождают матери старше 40 лет, составляющие лишь 2—3 % женщин детородного возраста.

Возраст матери	Частота синдрома Дауна у новорожденных, %
15—19	0,03—0,04
20—24	0,02—0,04
25—29	0,04—0,08
30—34	0,11—0,13
35—39	0,33—0,42
40 и более	0,80—1,88



Рис. 20.13. Больной с синдромом Дауна, 19 лет (трисомия 21) (фото научно-поликлинического отделения Института медицинской генетики АМН СССР).

Типичные для синдрома Дауна черты лица — широкая голова, эпикант, широкий нос

Вследствие пониженного иммунитета больные с синдромом Дауна рано умирают, поэтому они практически не встречаются среди взрослых людей. Применение с 1939 по 1947 г. *сульфаниламидных препаратов* и *антибиотиков* повысило среднюю продолжительность жизни этих больных с 9 до 15 лет. Больные обычно бесплодны, но известно 11 случаев, когда женщины с болезнью Дауна имели детей. Из 11 детей пятеро унаследовали этот синдром. Следовательно, лишняя 21-я хромосома передается с вероятностью 50 % в соответствии с теоретически ожидаемым.

Здесь рассмотрены лишь некоторые примеры генных (метаболических и молекулярных) и хромосомных болезней человека. Приведенные примеры до некоторой степени дают представление о тяжести генетического груза человечества, сложности и хрупкости генетической организации человека.

20.5. Значение диагностики и лечение от наследственных болезней

По мере развития медицины возможность выявления наследственных заболеваний увеличивается. Этот фактор указывает на растущее значение медицинской генетики и генетики человека. Меры, принятые при раннем выявлении наследственных болезней, могут предотвратить их развитие. Диетологические меры позволяют избежать патологических последствий, например при

галактоземии, фенилкетонурии и других наследственных болезнях обмена.

При диагностике наследственных заболеваний Н. П. Бочков с сотрудниками рекомендует руководствоваться следующим:

1. Применять клинико-генеалогический метод, который позволяет обнаруживать «семейные» болезни.

2. Часто к наследственным относятся заболевания, повторяющиеся хронически и длительно не поддающиеся лечению, особенно в детском возрасте.

3. На возможную наследственную форму заболевания указывают редко встречающиеся специфические симптомы.

4. То же относится к патологическим изменениям многих органов и систем.

Действительно, плейотропия, специфические проявления мутантных признаков характерны для наследственной изменчивости. И даже в тех сравнительно немногих случаях, когда вмешательство медицины помогает больным с генетическими дефектами, говорить об излечении нельзя, поскольку причина болезни — изменение генетического материала. Тем не менее успехи биологии и медицины в этом направлении вселяют большие надежды.

Для многих наследственных заболеваний стала возможной так называемая *пренатальная (т. е. до рождения) диагностика*. Это метод *амниоцентеза* (рис. 20.14), который заключается в получении с помощью шприца 10—15 мл *амниотической жидкости*, в которой находятся клетки плода. Такой образец центрифугиро-

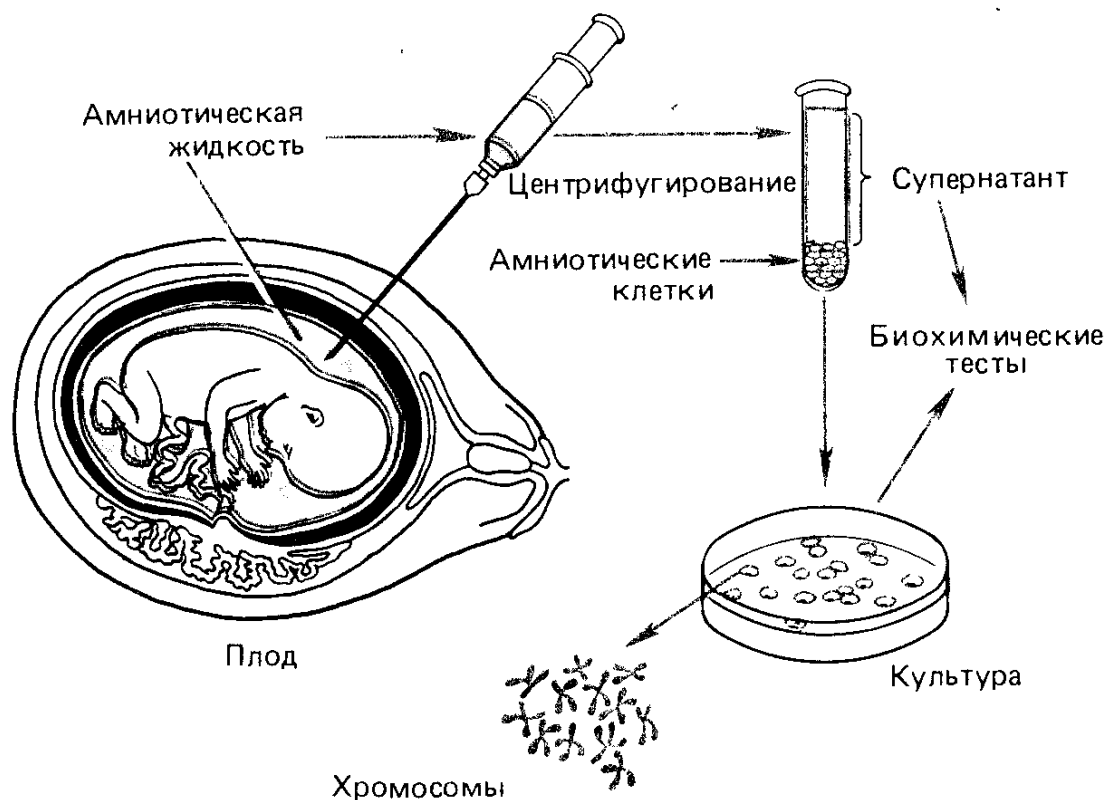


Рис. 20.14. Амниоцентез — метод пренатальной диагностики наследственных заболеваний (F. Ayala, J. Kiger, 1980)

ванием разделяют на клетки, которые культивируют на искусственной среде, и надосадочную жидкость, в которой определяют соотношение метаболитов, отражающих нормальное или патологическое состояние плода. Культивируемые эмбриональные клетки используют для определения числа хромосом и выявления возможных хромосомных аномалий.

Этим методом можно определить более 100 хромосомных и генных аномалий уже в первые недели беременности, что позволяет при неблагоприятном диагнозе принять решение о продолжении или прерывании беременности.

Выяснение метаболических и молекулярных причин того или иного наследственного заболевания дает возможность компенсировать дефект в порядке модификационных изменений — *фенотипировать норму*.

Уже упоминалась *гемофилия А*, при лечении которой требуется введение большого количества *фактора VIII*. Поскольку препарат получают из донорской крови, стоимость его очень высока. Применение методов генной инженерии позволило и в этом случае приблизиться к решению проблемы. На основе знания части первичной структуры фактора VIII была синтезирована ДНК — зонд размером в 36 п. н. Ее использовали для поисков гена, кодирующего фактор VIII, в банке генов (см. гл. 11) человека, полученном с помощью фага λ . Выделенный в конце концов ген оказался рекордно большим, длиной 186 000 п. н. Он содержит 26 экзонов и 25 интронов. Первичную структуру фактора VIII составляют 2332 аминокислотных остатка, которые остаются после того, как от его предшественника отрезается 19 аминокислот так называемого *лидерного пептида*, необходимого для секреции.

Из-за больших размеров гена для фактора VIII ни одна фаговая частица в банке генов не содержала его целиком.

Выделенный по частям и сшитый из кусков ген ввели в культивируемые клетки китайского хомячка, которые стали вырабатывать фактор VIII и выделять его в культуральную среду. Так был получен еще один препарат для медицинских целей методами генной инженерии.

На примере исследования гена, кодирующего фактор VIII, можно показать, как в настоящее время исследуется молекулярная природа наследственных изменений. Имея в распоряжении радиоактивную ДНК гена и смесь рестрикционных фрагментов геномной ДНК человека, страдающего гемофилией, можно провести электрофорез этой геномной ДНК и затем гибридизовать фрагменты с радиоактивным зондом. Если мутация затронула последовательность нуклеотидов какого-либо рестрикционного сайта, то картина распределения радиоактивных полос, выявляемых при электрофорезе, будет отличаться от той, которая получается для геномной ДНК здорового человека. Применяя этот метод, Р. Лон и Г. Вихар показали, что у разных больных-гемофиликов наблюдаются как точковые мутации — замены пар нуклеотидов, так и делеции различной длины (рис. 20.15).

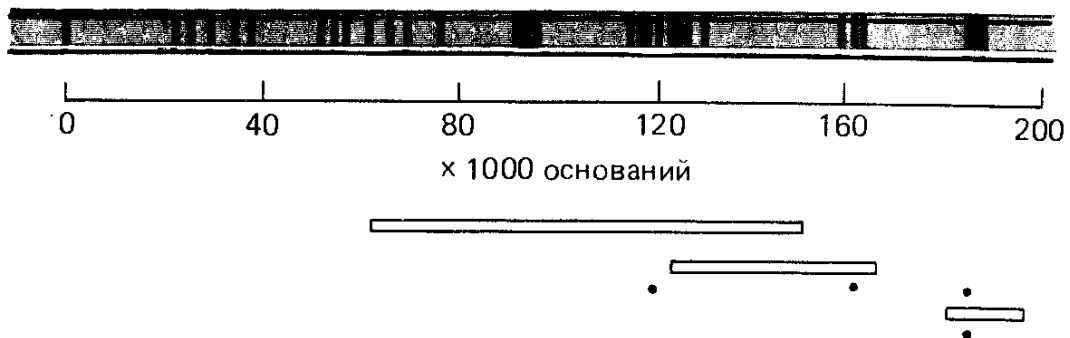


Рис. 20.15. Мутации в структурном гене фактора VIII, вызывающие гемофилию А (Р. Лон и Г. Вихар, 1986).

Темные участки — экзоны, светлые — интроны в гене, кодирующем фактор VIII. Цифры — тысячи пар нуклеотидов. Под физической картой гена показаны точковые мутации — кружки и делеции — отрезки

Выделение и клонирование нормальных генов человека все больше позволяет надеяться на то, что возникнет новая отрасль медицины — *генотерапия*, предсказанная еще в середине 70-х годов Дж. Меррилом и др. Генотерапия позволит заменять дефектные гены нормальными и тем самым устранять причину болезни, а не ее симптомы.

20.6. Медико-генетическое консультирование

Большое значение для медицинской генетики имеет определение *гетерозиготного носительства*, т. е. выявление в популяции индивидумов, которые сами не страдают от наследственного заболевания, но гетерозиготны по рецессивной мутации, которая способна его вызвать. Если такими гетерозиготами по одному и тому же гену окажутся супруги, которые решат завести ребенка, то они легко могут вычислить вероятность появления у них потомка — гомозиготного по рецессивной аллели и, следовательно, страдающего от наследственной болезни.

Вся беда заключается в том, что в большинстве случаев молодые люди, вступая в брак, даже не подозревают о такой возможности и уж конечно не «проходили» генетику. Для того чтобы помочь сориентироваться тем, кто хочет узнать, какова вероятность появления в их семье той или иной наследственной аномалии, существует *медико-генетическое консультирование*. Конечно, задачи этой службы значительно сложнее, чем предсказание простых вариантов расщепления. Знание генетики человека, детальное знакомство с родословными людей, обращающихся за консультацией, позволяют врачу-генетику оценивать степень риска в каждом конкретном случае. Принятие решения — иметь или не иметь детей, прервать или не прервать беременность — всегда остается за супругами.

Таким образом, современные тенденции генетики человека — это активное противодействие неблагоприятным факторам, вызывающим наследственные аномалии на основе знания генетических закономерностей. Однако эта позиция имеет мало общего

с наивными и жестокими идеями улучшения человеческой породы путем селекции, которые выдвигали сторонники некогда модной *евгеники* на заре существования генетики.

Человечество гетерогенно по своим морфологическим, физиологическим признакам, по способностям к различного рода деятельности. Эта гетерогенность — разнообразие способностей — залог процветания человечества, гарантия его дальнейшего прогресса. Попытки проповедовать идеи неравенства между какими бы то ни было этническими группами или расами людей на основе их генетических различий не имеют ничего общего ни с биологическими законами, ни с законами социальной справедливости. Дальнейший прогресс социалистического общества во многом зависит от правильного понимания законов генетики в применении к человеку, прежде всего в создании равных возможностей для обеспечения максимального раскрытия человеческой личности.

Вопросы к главе 20

1. Перечислите основные методы изучения генетики человека и оцените разрешающую способность каждого из них.

2. Приведите примеры сигнальной наследственности из своей жизни.

3. Приведите примеры фенотипирования нормы в лечении наследственных заболеваний.

4. Как вы понимаете роль биологических и социальных факторов в онтогенезе и филогенезе человека?

5. Как вы объясните появление женщин, гетерозиготных по мутации дальтонизма, находящейся в X-хромосоме, но являющихся дальтониками только по одному глазу или даже части глаза, а также женщин — идентичных близнецов, одна из которых дальтоник, а другая — нет?

6. Гипофосфатемия у человека обусловлена доминантным геном в X-хромосоме. Мужчина с этой болезнью женился на здоровой женщине. Какая часть их сыновей унаследует гипофосфатемию:

а) $\frac{1}{2}$, б) $\frac{1}{4}$, в) 1, г) $\frac{1}{3}$ д) 0?

7. Какими способами составляются генетические карты хромосом у человека?

8. Каковы последствия моносомии и трисомии у человека? Приведите примеры.

9. Мужчина, страдающий наследственной болезнью, женился на здоровой женщине. У них было 8 детей: 4 девочки и 4 мальчика. Все девочки (но ни один из мальчиков) унаследовали болезнь отца. Каков тип наследования этой болезни: а) аутосомный рецессивный; б) аутосомный доминантный; в) сцепление с Y-хромосомой; г) доминантный, сцепленный с X-хромосомой; д) рецессивный, сцепленный с X-хромосомой?

10. Какие группы крови и в каком количественном соотношении ожидаются у детей от следующих браков:

$I^A I^B \times I^A I^B$, $I^A I^B \times i^0 i^0$

11. Что такое половой хроматин и сколько имеется телец полового хроматина: а) у больных с синдромом Тернера; б) у больных с синдромом Клайнфельтера; в) у людей с генотипом XXXY?

12. Приведите пример родословной семьи, в которой обнаружена аномалия, наследующаяся по типу рецессивного, сцепленного с полом признака.

13. Что такое конкордантность? Когда и как используется этот показатель в генетике человека?

14. Каковы задачи медико-генетических консультаций?

15. Что общего в механизме возникновения гемоглобинов Лепоре и анти-Лепоре?

Глава 21

Проблемы генетической безопасности

Развитие научно-технической революции поставило человечество перед проблемой долговременных и необратимых изменений окружающей среды: сокращение площади лесов, загрязнение вод рек, морей и океанов, загрязнение атмосферы и почвы. Эти нежелательные последствия хозяйственной деятельности имеют глобальный характер. Они нарушают экологическое равновесие на больших территориях (целых стран и континентов) и угрожают в целом биосфере, частью которой является человек.

По мнению специалистов к началу 80-х годов наибольшее значение имели следующие факторы загрязнения антропогенного происхождения (номера расставлены в порядке значимости):

1. Пестициды.
2. Тяжелые металлы.
3. Диоксид углерода.
- 4.5. Диоксид серы и продукты ее окисления.
- 4.5. Взвеси.
- 6.7. Разливы нефти.
- 6.7. Сточные воды промышленных предприятий.
8. Твердые отходы.
9. Химические удобрения.
- 10.11. Органические отходы.
- 10.11. Оксиды азота.
12. Радиоактивные отходы.
- 13.14. Городской мусор.
- 13.14. Отходы атомных электростанций.
15. Фотохимические оксиданты.
16. Углеводороды воздуха.
17. Оксид углерода.
18. Тепловые отходы.
19. Городские шумы.

Этот перечень дает общее представление о воздействии человека на окружающую среду. Наряду с экологическими последст-

виями и отрицательным воздействием на здоровье нынешнего поколения людей загрязнение биосферы имеет еще и далеко идущие генетические последствия. Результатом осознания этого обстоятельства было рождение в 60—70-х годах новой науки — *генетической токсикологии*.

21.1. Генетическая токсикология

Открытие индуцированного мутационного процесса потребовало от исследователей больших усилий. Прежде чем Г. Мёллер (1927) опубликовал свою работу о мутагенном эффекте радиации у дрозофилы, целый ряд попыток, предпринятых в школе Т. Х. Моргана, окончился неудачей. Открытие химического мутагенеза у дрозофилы В. В. Сахаровым и М. Е. Лобашевым основывалось на достоверных, но небольших эффектах. Исторический парадокс заключается в том, что в наше время воздействия, которые имеют реальную или потенциальную мутагенную активность, встречаются на каждом шагу. Для многих распространенных загрязнителей окружающей среды, таких, как *промышленные отходы* или вещества, используемые в промышленности, например *диэтилсульфат*, *этиленмин*, *β-пропиолактон* и др., как *радиоактивные отходы*, как *пестициды* (*инсектициды*, *фунгициды*, *гербициды*), установлена *генетическая активность*. Кроме того, она установлена и для химических соединений, с которыми человек контактирует в своей повседневной жизни: лекарства, пищевые добавки, прежде всего консерванты и пищевые красители, косметические средства; некоторые красители для волос, аэрозольные лаки.

Распространение мутагенов в окружающей среде чревато повышением частоты мутаций, а следовательно, увеличением *генетического груза человечества*, что в свою очередь влечет за собой физические страдания больных, ставит сложные моральные проблемы перед обществом и, наконец, ложится на его плечи тяжелым экономическим бременем (см. гл. 20). *Генетическая токсикология изучает мутагенную активность факторов антропогенной природы, прежде всего химических соединений, разрабатывает методы и способы оценки их генетической активности*. Эта наука ставит своей целью свести к минимуму степень риска мутагенных воздействий, уменьшить генетическую опасность во всех областях человеческой деятельности.

Эта в значительной степени прикладная наука возникла на основе исследования мутационного процесса, популяционной генетики и экологии. Генетическая токсикология тесно связана с *экологической генетикой*, и, по мнению некоторых исследователей, является ее частью. Эти дисциплины перекрываются в той области, которая касается взаимодействия организмов с факторами окружающей среды, особенно мутагенными, а также в области генетики популяций. В то же время генетическая токсикология имеет самостоятельные прикладные задачи по ограничению рас-

пространения мутагенов, а также в изучении канцерогенов, многие из которых представляют собой мутагены.

Знание механизмов мутационного процесса (см. гл. 12, 13) убеждает в том, что мутагенез, репарация и рекомбинация имеют много общих этапов, связанных с репликацией ДНК. Поэтому в основу работ по генетической токсикологии положено не только выявление *мутагенной*, но и *рекомбиногенной активности*, а также изучение влияния внешних воздействий на процесс репарации генетического материала. В целом этот подход и представляет собой выявление *генетической активности факторов среды*. Генетически активные факторы можно разделить на три категории: физические, химические и биологические.

Физические факторы. К их числу относятся различные виды ионизирующей радиации и ультрафиолетовое излучение. Исследование действия радиации на мутационный процесс показало, что пороговая доза в этом случае отсутствует, и даже самые небольшие дозы повышают вероятность возникновения мутаций в популяции. Повышение частоты мутаций опасно не столько в индивидуальном плане, сколько с точки зрения увеличения генетического груза в популяции. Например, облучение одного из супругов дозой в пределах удваивающей частоту мутации (1,0 — 1,5 Гй) незначительно повышает опасность иметь больного ребенка (с уровня 4—5 % до уровня 5—6 %). Если такую же дозу получит население целого района, то число наследственных заболеваний в популяции через поколение удвоится.

Японские ученые изучили хромосомные аберрации в лейкоцитах крови людей, подвергшихся атомной бомбардировке в Хиросиме и Нагасаки. Они показали, что перестройки в лейкоцитах обнаруживаются даже спустя тридцать лет после атомных взрывов. При этом была показана четкая зависимость частоты перестроек от дозы и характера излучений в диапазоне от 0,01 до 5,0 Гй. Общая частота аберраций оказалась выше у людей, пострадавших от атомного взрыва в Хиросиме, чем у жителей Нагасаки, поскольку в первом случае излучение содержало большую примесь нейтронов, оказавшихся эффективнее в индукции мутаций (см. табл. 21.1), чем γ -излучение.

Приведенные цифры сами по себе красноречиво свидетельствуют о генетической опасности применения ядерного оружия и должны служить предостережением против гонки атомных вооружений, против испытаний ядерного оружия. Принципиальная и последовательная политика СССР в этом вопросе исходит из гуманистических принципов и основана на строго научной аргументации.

Следует иметь в виду, что генетическую опасность таит не только применение атомной энергии в военных целях, но и ее использование в мирных целях в случае аварийных ситуаций, приводящих к загрязнению среды радиоактивными излучениями. Это требует постоянного контроля за соблюдением правил эксплуатации исследовательских и промышленных атомных реакторов.

Таблица 21.1. Хромосомные мутации у людей, переживших атомные бомбардировки в Хиросиме и Нагасаки (по Н. П. Дубинину, 1986)

Доза облучения, Гр	Число исследован- ных людей	Число изучен- ных клеток	Клетки с мутациями	
			число	%
<i>Хиросима</i>				
Контроль	263	24 414	294	1,20
0,01—0,99	70	6 459	175	2,71
1,00—1,99	37	12 634	626	4,95
2,00—2,99	42	6 484	615	9,48
3,00—3,99	43	3 896	489	12,55
4,00—4,99	30	2 869	407	14,19
5,00 и выше	31	3 222	532	16,51
<i>Нагасаки</i>				
Контроль	156	14 748	199	1,35
0,01—0,99	57	5 472	103	1,88
1,00—1,99	62	5 727	96	1,68
2,00—2,99	58	5 443	150	2,76
3,00—3,99	30	2 753	94	3,41
4,00—4,99	21	2 312	164	7,09
5,00 и выше	16	1 566	206	13,15

Нежелательные последствия для популяций живых организмов может иметь также усиление воздействия ультрафиолетового излучения. Хорошо известен мутагенный эффект *коротковолнового излучения* (с длиной волны до 280 нм), в зоне которого находится спектр поглощения нуклеиновых кислот. Генетической активностью обладает также *длинноволновый ультрафиолетовый свет* (280—320 нм), или так называемый *ближний ультрафиолетовый свет*, входящий в спектр солнечного излучения. Обычно ультрафиолетовый свет с этой длиной волны задерживается озоновым слоем атмосферы. Озоновый слой атмосферы может разрушаться при некоторых техногенных воздействиях, что приводит к проникновению через атмосферу ближнего ультрафиолетового света, который воздействует на растения, животных и микроорганизмы. Кроме того, спектр некоторых производственных источников УФ-излучения также содержит ближний ультрафиолетовый свет.

Развитие технологии, приводящее к новым физическим воздействиям на окружающую среду: действие *ультразвука, токов высокой частоты, переменного магнитного поля* и т. д., требует постоянного генетико-токсикологического контроля для своевременного выявления и предотвращения генетических последствий действия этих факторов.

Химические факторы. Химизация сельского хозяйства и других областей человеческой деятельности, развитие химической промышленности обусловили синтез огромного потока веществ (в общей сумме от 3,5 до 4,3 млн.), в том числе таких, которых

в биосфере никогда не было за миллионы лет предшествующей эволюции. Это означает прежде всего неразложимость и таким образом длительное сохранение чужеродных веществ, попадающих в окружающую среду. То, что было принято первоначально за достижения в борьбе с вредными насекомыми, в дальнейшем обернулось сложной проблемой. Широкое применение в 40—60-е годы инсектицида ДДТ, относящегося к классу хлорированных углеводородов, привело к его распространению по всему земному шару вплоть до льдов Антарктиды.

Большинство пестицидов обладает большой устойчивостью к химическому и биологическому разложению и имеет высокий уровень токсичности.

Классическим примером неосмотрительности стало применение ДДТ для уничтожения комаров на оз. Клир-Лейк в США (Калифорния). После обработки концентрация этого инсектицида в воде составила 0,02 части на 10^6 , в планктоне — 10 на 10^6 , в планктоноядных рыбах — 903 на 10^6 , в хищных рыбах — 2690 на 10^6 , в птицах, питающихся рыбой, — 2134 на 10^6 . Таким образом, концентрация ДДТ по мере повышения уровня в пищевой цепи повысилась в 100 000 раз и привела к сокращению численности птиц на этом озере.

Применение пестицидов таит опасность для здоровья людей и обуславливает увеличение генетического груза, поскольку для ряда их ингредиентов показана генетическая активность, особенно для полихлорбифенилов. У ряда основных компонентов гербицидов, применявшихся армией США во время войны в Индокитае для обеспечения удобства наблюдения с воздуха в джунглях, уничтожения посевов и т. д., обнаружена мутагенная активность. Это касается, в частности, «оранжевого» реактива, содержащего следующие мутагены: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), 2, 4, 5-трихлорофеноксиуксусную кислоту (2, 4, 5-Т) и диоксин.

Довольно широко распространенные соли азотной кислоты (нитраты) биохимически превращаются в нитриты — соли азотистой кислоты, обладающие мутагенной активностью. В кислой среде желудка млекопитающих из нитритов и аминокислот образуются нитрозосоединения, которые относятся к классу так называемых супермутагенов. В связи с этим во многих странах введено ограничение на использование нитрита натрия в качестве консерванта мясных и растительных продуктов.

Мутагенный эффект может быть следствием воздействия загрязнителей атмосферы и воды, производственных отходов и выхлопных газов автомобилей, содержащих алкилирующие соединения, органические соединения ртути и др.

Дополнительные проблемы для генетической токсикологии представляет определение мутагенной активности сложных смесей, содержащих соединения, усиливающие генетическую активность при взаимодействии друг с другом. Кроме того, многие вещества, сами по себе не мутагенные, в результате активации в организме

человека, животных и растений приобретают генетическую активность.

Мутагенные соединения содержатся в продуктах жизнедеятельности некоторых микроорганизмов, заражающих пищевые продукты. Так, установлена генетическая активность *афлатоксина* — токсина одного из видов плесневого гриба — аспергилла.

Большого внимания заслуживает мутагенный эффект некоторых лекарственных веществ, например *актиномицина*, *аминоптерина*, *гикантона* и др. С 1979 г. в нашей стране все лекарства рекомендуются к производству после их тщательного генетико-токсикологического исследования и определения степени риска при их применении. При этом нужно принимать во внимание, что некоторые соединения, например *канцеростатики*, могут обладать значительной мутагенной активностью, но их применение все же диктуется необходимостью спасения жизни больных, и после всестороннего взвешивания возможных последствий такие лекарственные препараты все же используются.

Биологические факторы. Наряду с физическими и химическими мутагенами генетической активностью обладают также некоторые факторы биологической природы. Механизмы мутагенного эффекта этих факторов изучены наименее подробно. В конце 30-х годов С. М. Гершензоном начаты исследования мутагенеза у дрозофилы под действием экзогенной ДНК и вирусов. С тех пор установлен мутагенный эффект многих вирусных инфекций и для человека. Аберрации хромосом в соматических клетках вызывают *вирусы оспы*, *кори*, *ветряной оспы*, *эпидемического паротита*, *гриппа*, *гепатита* и др.

Повышение частоты хромосомных мутаций наблюдается при заражении крыс микоплазмой (*Mycoplasma pulmonis*). По данным Ю. Я. Керкиса, Н. Н. Ильинских и др., *стрептолизин-О* (токсин гемолитического стрептококка) увеличивает частоту мутаций в культуре эмбриональных фибробластов человека. Если в контроле наблюдалось, $4,0 \pm 0,5 \%$ аберраций хромосом, то при воздействии стрептолизина-О этот показатель повышался до $24,3 \pm 0,6 \%$. Выявлена генетическая активность (судя по числу хромосомных аберраций) заражения людей шигеллой (возбудитель дизентерии) и другими возбудителями инфекционных заболеваний.

Особого внимания заслуживает мутагенез под влиянием *вакцинации*. Благодаря введению живых вакцин достигнуты большие успехи в борьбе с опасными инфекциями: оспой, тифом, бруцеллезом и др. В то же время широкое распространение вакцинации, охватывающей большие количества людей и нередко проводимой повторно, повышают опасность индукции мутаций. Частота хромосомных аномалий повышается и вследствие *иммунологического стресса*, вызываемого пересадкой и отторжением кожного лоскута, как это впервые показал для мышей Ю. Я. Керкис.

Рассматривая различные мутагенные факторы окружающей среды, следует принять во внимание, что они действуют не только

по отдельности, но и во взаимодействии. Так, упомянутый уже природный яд афлатоксин дает мутагенный эффект в результате *метаболической активации* в организме человека или после воздействия на него солнечного света.

Таким образом, постоянное внимание генетической токсикологии, которую можно назвать службой генетической безопасности, должно быть обращено на существование и возможность появления новых физических, химических и биологических факторов, обладающих генетической активностью.

21.2. Тест-системы и система тестов генетической активности

Обилие химических соединений, которые по мере их появления необходимо проверять на генетическую активность, обусловило разработку простых, надежных и дешевых методов и *тест-систем для скрининга, или просеивания*, большого числа соединений. Для выявления мутагенов, в этих тест-системах используются различные объекты и различные критерии. В настоящее время генетическая активность веществ определяется по следующим основным критериям: 1) генным мутациям — заменам, вставкам и выпадениям пар нуклеотидов; 2) конверсии и 3) реципрокной, преимущественно митотической, рекомбинации; 4) нерасхождению хромосом в митозе; 5) хромосомным аберрациям; 6) обменам между сестринскими хроматидами. Кроме того, применяют такие критерии, как увеличение частоты доминантных деталей у дрозофилы и мышей и частота аномальных сперматозоидов у мышей. Последние два теста нельзя строго отнести к генетическим, однако их результаты хорошо коррелируют с остальными тестами, основанными на критериях повреждения генетического материала.

В качестве объектов при массовом определении генетической активности тех или иных факторов используют культуры клеток человека и животных, высшие растения, микроорганизмы, *D. melanogaster*.

Тест-системы для быстрой оценки генетической активности химических соединений

Объекты	Учитываемый эффект
1. Бактерии <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	Реверсии His ⁻ — His ⁺ Устойчивость Aza ^s — Aza ^r Индукция профага λ
2. Грибы <i>Sacch. cerevisiae</i>	Мутации: реверсии ауксотрофных мутантов, «незаконное» спаривание α × α митохондриальные мутации
<i>Schiz. pombe</i> <i>Asp. nidulans</i>	реверсии ауксотрофных мутантов мутации по биосинтезу метионина
<i>Sacch. cerevisiae</i>	Рекомбинация: митотическая конверсия, митотический кроссинговер

<i>Asp. nidulans</i>	митотический кроссинговер Анеуплоидия и хромосомные перестройки:
<i>Sacch. cerevisiae</i>	нерасхождение хромосом в митозе у анеуплоидов (учет по рецессивным селективным маркерам) делеции и потери III хромосомы (система: $\alpha \times \alpha$)
<i>Asp. nidulans</i>	потери хромосом в митозе у диплоидов $y/+$
3. Высшие растения Традесканция Бобы	хромосомные aberrации в кончиках корня
4. <i>Dr. melanogaster</i>	Соматические мутации: мозаичность крыльев и глаз
5. Культура клеток млекопитающих Гепатоциты крыс и др.	Одноцепочечные разрывы ДНК Внеплановый синтез ДНК
Человек — HeLa Лимфоциты человека	Цитогенетические эффекты: хромосомные aberrации, обмены сестринских хроматид Генные мутации устойчивости

Тесты с использованием микроорганизмов отличаются большой пропускной способностью и чувствительностью к мутагенным воздействиям. Они позволяют в полной мере использовать преимущества селективных методов. Однако главная проблема при применении этих тестов — возможность экстраполяции получаемых результатов на человека. Проверка большого количества соединений на мутагенную активность с использованием млекопитающих, например мышей, не возможна по причине громоздкости и высокой стоимости экспериментов.

Решение проблемы было достигнуто при использовании теста на мутагенную активность, опосредованную метаболической системой хозяина. В первоначальном варианте этого теста потенциальные мутагены вводили в организм мышей или крыс, в перитонеальную полость которых помещали тест-микроорганизм: бактерии, дрожжи, конидии нейроспоры, у которых затем учитывали мутации под влиянием мутагенов, активированных ферментами животных. В дальнейшем мутагенез, опосредованный метаболической системой хозяина, был упрощен и стал проводиться *in vitro*. Для этого мутаген наносят на чашки Петри, засеянные тест-объектом, в смеси с ферментами микросомной фракции клеток печени мыши или крысы. В этой фракции, обозначаемой S9, находится цитохром P₄₅₀, главная функция которого в организме — детоксикация чужеродных соединений. Действуя на некоторые так называемые промутагены, система микросомного окисления превращает их в мутагены.

В системах с метаболической активацией промутагенов используют не только микросомную фракцию печени, но и кровь или мочу животных и человека, а также экстракты из тканей высших растений.

Благодаря использованию детально разработанных мутацион-

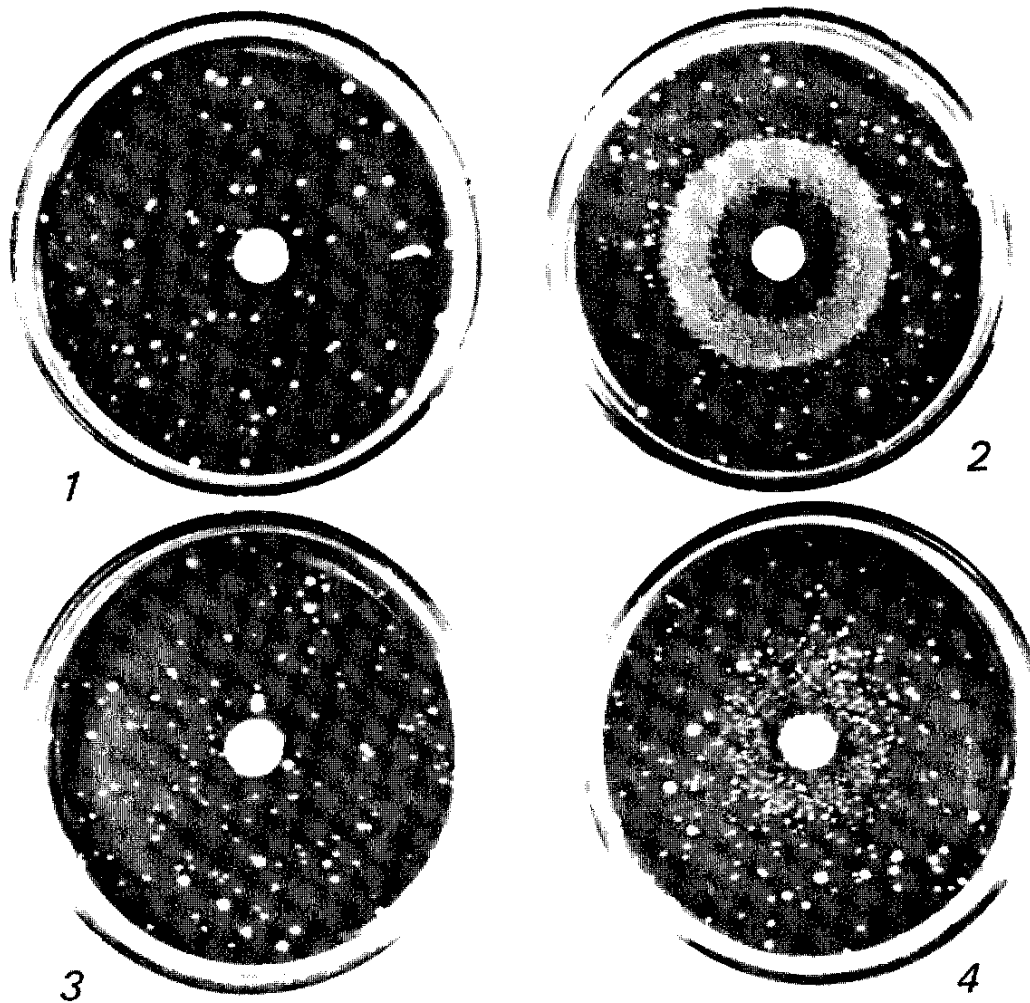
ных систем у микроорганизмов открываются большие возможности не только для тестирования мутагенной активности различных соединений, но и для выяснения механизма их действия. При этом используют мутантов с генетическими изменениями определенной молекулярной природы. Так, широкое применение нашла тест-система, разработанная Б. Эймсом на основе His⁻-мутантов *S. typhimurium*. Он использует несколько мутантов типа замены пар оснований, а также типа вставок-выпадения пар оснований по гистидиновому оперону. Мутации объединяются с делецией по одному из генов, контролирующей эксцизионную репарацию, что повышает чувствительность теста в несколько сот раз. В геном тех же штаммов введена мутация, блокирующая образование липополисахаридной капсулы бактерий, благодаря чему повышается проницаемость клеток. В клетки введены также плазмиды — R-факторы, которые способствуют выявлению мутаций, возникающих как ошибки рекомбинации.

Мутагенный эффект испытываемых соединений определяется в так называемом *spot-тесте*, для чего на чашки Петри без гистидина, засеянные тест-штаммом, наносится исследуемое вещество вместе с микросомной фракцией гомогената печени мыши для активации мутагенов. Появление His⁺-ревертантов свидетельствует о генетической активности испытываемого агента.

Благодаря использованию этой системы показана тесная корреляция мутагенной активности и канцерогенности многих соединений, т. е. выявление генетической активности соединения одновременно с большой вероятностью указывает на то, что оно потенциальный канцероген. Б. Эймз показал мутагенную активность ряда веществ, применяемых в качестве консервантов пищи, ряда красителей для волос, сигаретного пепла, грибных токсинов (в частности, афлатоксинов), бенз(а)пирена и др.

В дальнейшем подход, разработанный Б. Эймзом, нашел применение и в работе с другими микроорганизмами: бактериями, дрожжами (рис. 21.1).

При изучении мутагенеза под действием факторов, загрязняющих окружающую среду, необходимо испытывать сложные смеси веществ, включающих органические и неорганические молекулы. Кроме того, даже зная химическую структуру соединения, трудно предсказать характер его мутагенной активности. Поэтому для испытаний предложено использовать набор штаммов одного и того же микроорганизма, несущих мутации известной молекулярной природы и специфически реагирующих на действие эталонных мутагенов. Среди таких мутагенов, применяемых в эксперименте в качестве обязательного позитивного контроля, используются ультрафиолетовый свет, этилметансульфонат, нитрозосоединения, β-пропиолактон, 6-гидроксиламинопуридин и т. д. В таких тестах выявление мутагенной активности загрязнителей окружающей среды позволяет грубо оценивать механизм действия активного начала. Кроме того, применение серии штаммов с различной локализацией мутаций позволяет минимизировать «эффект контекста» на



А

Рис. 21.1. Демонстрация генетической активности химических соединений и лова). А — реверсии $His^- \rightarrow His^+$ *Salmonella typhimurium*. Спот-тест Б. Эймза: в центре кружок фильтровальной бумаги, смоченной мутагеном, растворенным в смеси, содержащую микросомную фракцию печени животных

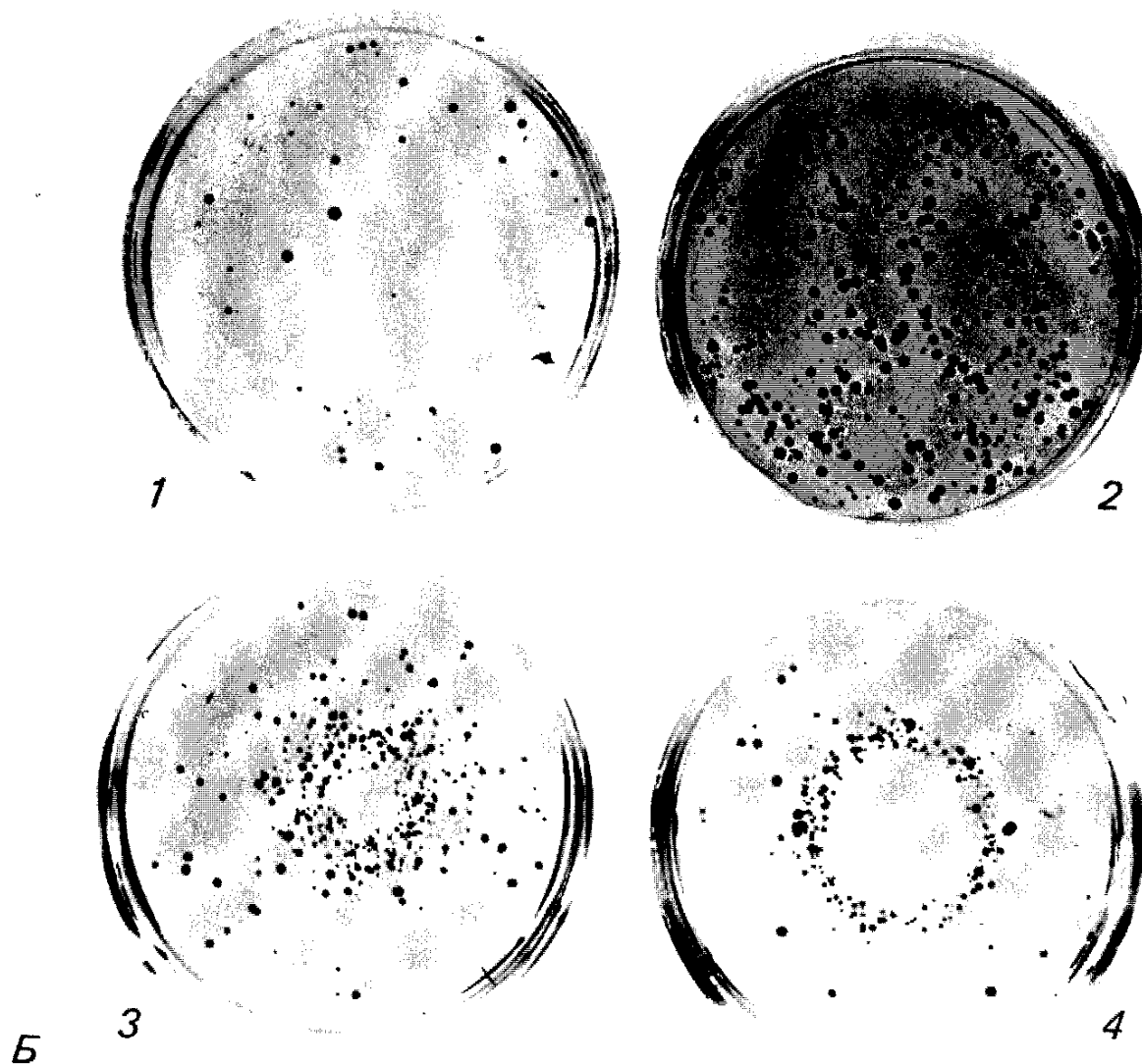
1 — ДМСО — контроль без мутагена, 2 — ДМСО + N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуа (мышь) без кофакторов, 4 — то же, что на чашке 3, но с

Б — реверсии $Ade^- \rightarrow Ade^+$ у дрож

1 — контроль, 2 — под действием ультрафиолетового света (75 Дж/м^2), 3 — N-нитро

мутагенез. Известно, что мутации одинаковой природы происходят с неодинаковой частотой в разных участках даже одного и того же гена.

Наряду с прокариотическими микроорганизмами (бактерии) в тест-системах часто используют эукариотические микроорганизмы — грибы: дрожжи *Sacch. cerevisiae*, *Schiz. pombe*, нейроспору и аспергилл, в меньшей степени — водоросли и простейших. У дрожжей, так же как и у бактерий, учитывают прямые и обратные генные мутации, применяют метаболическую активацию, а кроме того, дрожжи сами активируют многие промутагены. В дополнение к этому у дрожжей исследуют внутригенную рекомбинацию (конверсию) и реципрокную рекомбинацию в митозе. На



ультрафиолетового света в тест-системах с микроорганизмами (фото Ю. И. Пав-
чашки без гистидина засевают культурой TA100 *S. typhimurium* и помещают
в диметилсульфоксиде (ДМСО). При необходимости добавляют активирующую
(мышей, крыс, кур и т. д) с необходимыми кофакторами:

нидин, 3 — ДМСО + 2-аминофлуорен + неполная активирующая смесь (из печени
добавлением кофакторов — полная активирующая смесь.

жей *Sacch. cerevisiae*, штамм p2089.

зометилмочевины (спот-тест), 4 — N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина (спот-тест)

основе генетических критериев у этого объекта учитывают также
хромосомные aberrации — потерю плеча или всей III хромосомы,
а также нерасхождение хромосом. Последний эффект удобнее
исследовать у аспергилла, для которого хорошо разработаны
методы анализа нерасхождения хромосом, приводящие к гаплои-
дизации в парасексуальном цикле (см. гл. 8).

При всем удобстве микроорганизмов генетическая токсикология
не может ограничиться только ими. Большой практический инте-
рес представляют мутагенные эффекты у многоклеточных живот-
ных и в клетках человека. В качестве многоклеточного животного
используют дрозофилу, у которой учитывают доминантные летали,
нерасхождения и потери хромосом в мейозе, митотический крос-

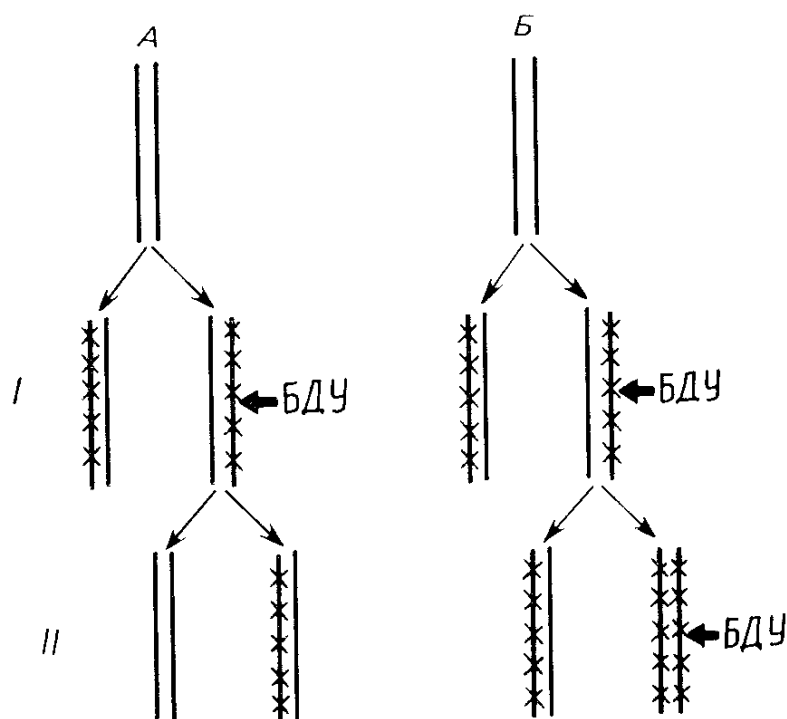


Рис. 21.2. Включение 5-бромдезоксисуридина (БДУ) в ДНК в зависимости от присутствия БДУ в течение одного (А) или двух (Б) циклов репликации:
I — первая репликация, II — вторая репликация

синговер и возникновение мутаций в соматических клетках. В последнем случае действуют мутагеном на личинок и изучают мозаичность глаз или крыльев как результат появления мутантных клонов в ходе дифференцировки имагинальных дисков (см. гл. 16).

К числу быстрых тестов с использованием высших растений относится учет хромосомных aberrаций в корешках традесканции, *Crepis*, *Vicia* и др.

Наиболее адекватной тест-системой должна служить культура клеток человека, в которой учитывают хромосомные aberrации и обмены между сестринскими хроматидами, современный метод анализа которых предложили в 1972 г. А. Ф. Захаров и Н. А. Егорова. При репликации хромосом лимфоцитов периферической крови человека в присутствии 5-бромдезоксисуридина (БДУ) этот аналог включается на место тимидина. Если БДУ дают только в течение одного клеточного цикла, то меченой после второго цикла будет только одна хроматида из двух (см. гл. 6), если же БДУ находится в среде в течение двух клеточных циклов, то мечеными к концу второго цикла будут обе хроматиды (рис. 21.2): одна по обоим комплементарным цепям ДНК, а другая только по одной. Собственно обнаружить различие хроматид (содержащих тимидин и БДУ) удастся только с помощью красителей: азур-эозина, красителя Гимза, акридинового оранжевого и др., а также при исследовании флуоресценции хромосом с БДУ. После окраски акридиновым оранжевым хроматиды, не содержащие брома, светят в зеленой части спектра, а включившие бром — в красной.



Рис. 21.3. Обмены между сестринскими хроматидами в клетках яичников китайского хомячка (P. Perry, 1980): А — спонтанные; Б — при действии $3 \cdot 10^{-7}$ М антибиотика адриамицина в течение 24 ч.

Клетки культивировали в течение двух клеточных циклов с 5-бромдезоксисуридином (10 мкмоль), окраска по Гимза

Увеличение частоты сестринских обменов при действии какого-либо агента указывает на его генетическую активность (рис. 21.3).

В культурах клеток человека учитывают также генные мутации, например, по локусу *тимидинкиназы*. Этот эксперимент занимает от двух до пяти недель. Время, необходимое для обнаружения других генетических событий и у других объектов, легко установить, зная их особенности, упомянутые в предыдущих главах. Так, эксперименты с бактериями при качественном или полуколичественном учете генетической активности занимают одну неделю. При количественном исследовании мутагенной активности с применением системы метаболической активации это время увеличивается до 4—5 недель. Сходные затраты времени необходимы для работы с грибами: дрожжами и нейроспорой. Сравнимые сроки требуются для испытаний с использованием дрозофилы (2—7 недель) и высших растений.

Несмотря на высокую разрешающую способность всех перечисленных тест-систем, наибольшие возможности для экстраполяции получаемых результатов на человека представляют исследования с млекопитающими *in vivo*: с мышами, крысами, хомячками. Это связано со специфичностью действия мутагенов, с разными мутагенными эффектами на соматических и генеративных клетках, а также с различиями соматических клеток *in vitro* и *in vivo*. Наиболее информативны результаты в тестах на мутагенез в специфическом локусе. Правда, при таком подходе требуется большое число животных, и тем самым резко возрастает стоимость исследований.

С учетом этих обстоятельств встает проблема разработки не только чувствительных *тест-систем*, которых появляется все больше, но и *систем тестов*. Многими исследователями предложены различные варианты ступенчатых систем тестирования мутагенов и промутагенов, основу которых составляет *скрининг*, или просеивание большого числа веществ на системах, позволяющих быстро оценить их генетическую активность. Последующие этапы включают все меньшее число агентов, которые исследуются более подробно. На рис. 21.4 представлен вариант двуступенчатой системы тестов, предложенной Н. П. Бочковым и др., для выявления генетической активности у лекарственных препаратов с учетом характера их применения.

Большое значение для оценки последствий загрязнения окружающей среды генетически активными факторами имеет наблюдение за природными популяциями растений, животных и микроорганизмов. Такой постоянный контроль (*мониторинг*) изменений генетической структуры природных популяций позволяет улавливать изменения и прогнозировать их дальнейшие последствия. Кроме того, в условиях загрязнения многие из перечисленных систем могут быть использованы в качестве чувствительных биологических дозиметров мутагенной опасности, что особенно отно-

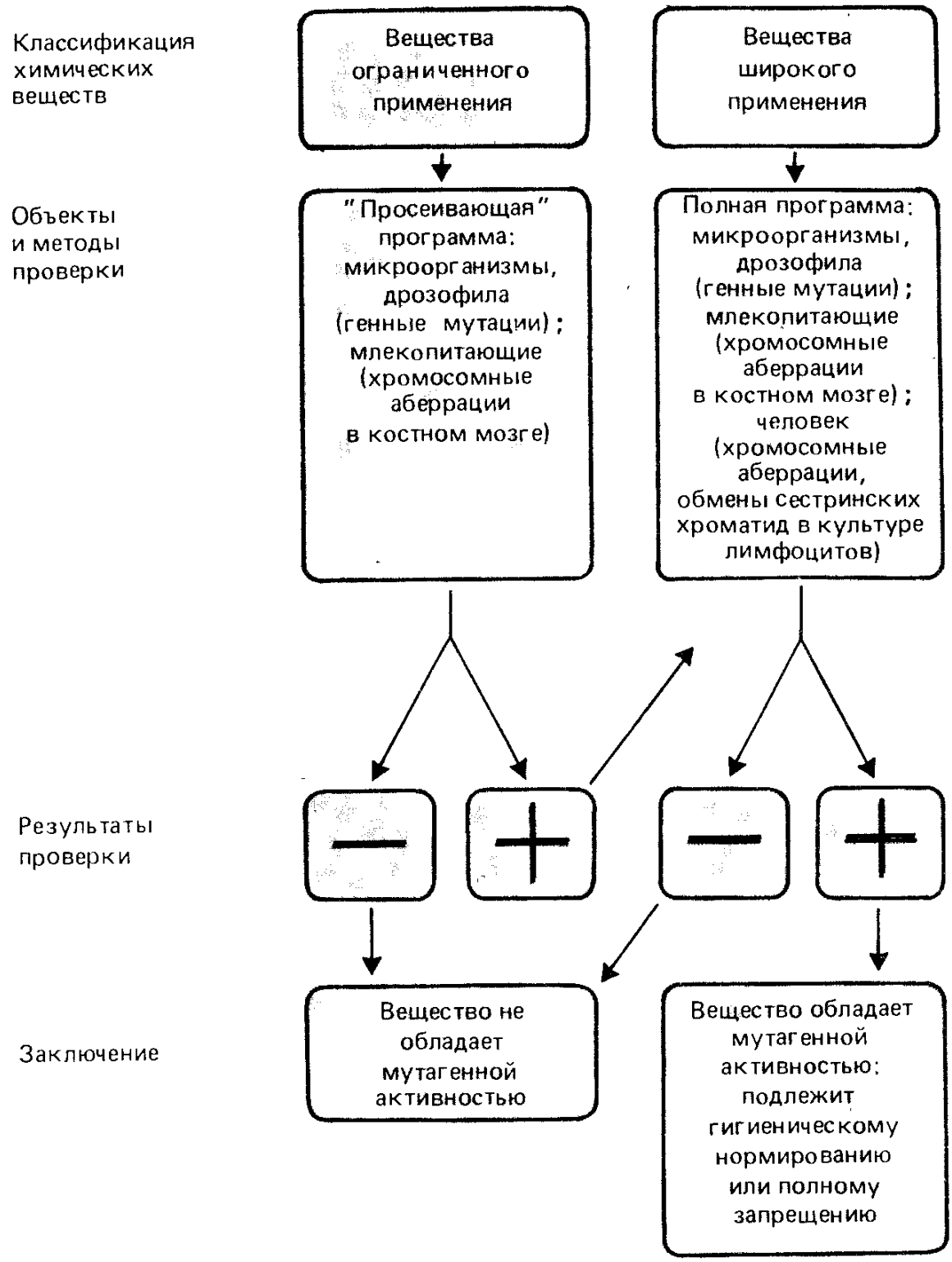


Рис. 21.4. Система тестирования лекарственных препаратов с целью выявления их генетической активности (по Н. П. Бочкову, А. Ф. Захарову, В. И. Иванову, 1984)

сится к культурам микроорганизмов с генетическими нарушениями систем репарации.

21.3. Мутагенез и канцерогенез

Современные представления о причинах злокачественной трансформации клеток — превращении их в раковые — основано на двух группах фактов.

Первая из них — существование *онкогенных вирусов*, или *ретровирусов*, содержащих РНК в качестве генетического материала, ДНК-копии которых могут встраиваться в геном инфицируемой клетки (см. гл. 10). Результатом этого процесса может быть *злокачественное новообразование*. Онкогенные вирусы содержат *онкоген*, экспрессия которого и ответственна за канцерогенез. Этот механизм восходит к *вирусо-генетической теории рака*, предложенной в 1945 г. советским ученым Л. А. Зильбером.

Вторая группа фактов сводится к тому, что разнообразные внешние воздействия на клетки, в большинстве случаев (но не всегда) мутагенные, также могут привести к их превращению в раковые. Наследственные заболевания человека, связанные с нарушениями репарации (см. гл. 20), сопровождаются повышением мутабельности соматических клеток, судя по хромосомным aberrациям, и тоже характеризуются повышенной частотой злокачественных новообразований. Предположения о мутационной природе канцерогенеза высказываются с начала XX в., начиная с работы Т. Бовери (1914).

Таким образом, первая группа фактов побуждает искать причину рака в действии генетического материала, вносимого в клетку извне, а вторая — искать генетические причины рака в самой клетке. Эти подходы объединяют сведения о том, что в нормальных клетках существуют так называемые *протоонкогены* — гены, гомологичные онкогенам ретровирусов. Протоонкогены чрезвычайно консервативны и сходны в геномах человека, мыши, дрожифилы и даже дрожжей. Некоторые из них контролируют нормальное протекание клеточного цикла. Нельзя сказать, что механизм канцерогенеза выяснен, однако наиболее вероятной причиной представляется злокачественная трансформация клетки вследствие нарушения экспрессии некоторых ее генов (онкогенов, протоонкогенов) в результате мутационных или модификационных изменений, а также в результате вирусной инфекции.

В свете этих представлений распространение в окружающей среде генетически активных агентов может приводить не только к повышению частоты мутаций, но и к повышению частоты злокачественных новообразований. В связи с этим программы тестирования химических соединений различных физических и биологических факторов предусматривают выявление среди них потенциальных канцерогенов. Учитывая важность этой задачи, в международном масштабе разрабатываются чувствительные тест-системы выявления канцерогенов, координируемые Всемирной организацией здравоохранения и другими международными организациями. В частности, для выявления канцерогенов используются кратковременные тесты, перечисленные в табл. 21.3, дополненные прямым испытанием химических соединений на их способность вызывать злокачественную трансформацию в культурах клеток животных и человека, а также у животных (мыши, крысы, хомяки). При высоком уровне корреляции (до 90 %) мутагенных и канцерогенных свойств химических препаратов определенные трудности

возникают в связи с тем, что некоторые канцерогены генетически неактивны, а некоторые активные мутагены не являются канцерогенами. Дальнейшее совершенствование систем тестирования мутагенов и канцерогенов должно способствовать не только обеспечению генетической безопасности человека, но и пониманию механизмов канцерогенеза.

21.4. Уменьшение генетической опасности

Все мероприятия по выявлению генетически активных факторов направлены на сведение к минимуму контактов человека с мутагенами. Новые химические соединения и другие генетически активные агенты изымаются из употребления или их применение строго ограничивается. В тех же случаях, когда человек вынужден с ними соприкасаться, необходимо иметь в резерве средства минимизации риска мутационных и канцерогенных изменений. Для этого необходимо знать пути мутагенеза и уметь вмешиваться в этот процесс. Становление мутации — процесс многоэтапный. В упрощенном виде его можно представить так, как это показано на схеме рис. 21.5. Многие мутагены, попадая в организм, включаются в цепи метаболических превращений и затем могут как активироваться, т. е. приобрести или повысить свою генетическую активность, так и инактивироваться, т. е. потерять ее. При этом необходимо учитывать организменные и клеточные барьеры проницаемости и способ попадания соединения в организм: через кожу; дыхательные пути и т. д.

Оказавшись внутри клетки, мутаген взаимодействует с генетическим материалом — с хроматином или непосредственно с ДНК ядра или клеточных органелл. В результате такого взаимодействия в ДНК возникают *первичные изменения*, которые по мнению одних авторов можно считать *предмутационными*, а по мнению других эти изменения должны превратиться в *предмутационные* на следующем этапе.

Большинство *предмутационных изменений* устраняется системами репарации (см. гл. 6.12): конститутивная безошибочная репарация восстанавливает исходную структуру молекулы ДНК, а индуцибельная репарация, склонная к ошибкам, может фиксировать мутационные изменения. Фиксация мутации сопровождается ее фенотипическим проявлением, если мутация доминантна или если она находится в гомозиготе, будучи рецессивной, в отсутствие эпистатирующих генов или супрессоров в условиях, не вызывающих фенкопии нормы. Каждый из рассмотренных этапов может быть разбит на более дробные стадии.

В ряде случаев есть возможность вмешаться в процесс становления и проявления мутации. Если начать с последнего этапа — проявления мутации, то *фенкопирование нормы* — задача медицины и медицинской генетики, которые способны предотвращать развитие болезни во многих случаях наследственных патологий (гл. 20).

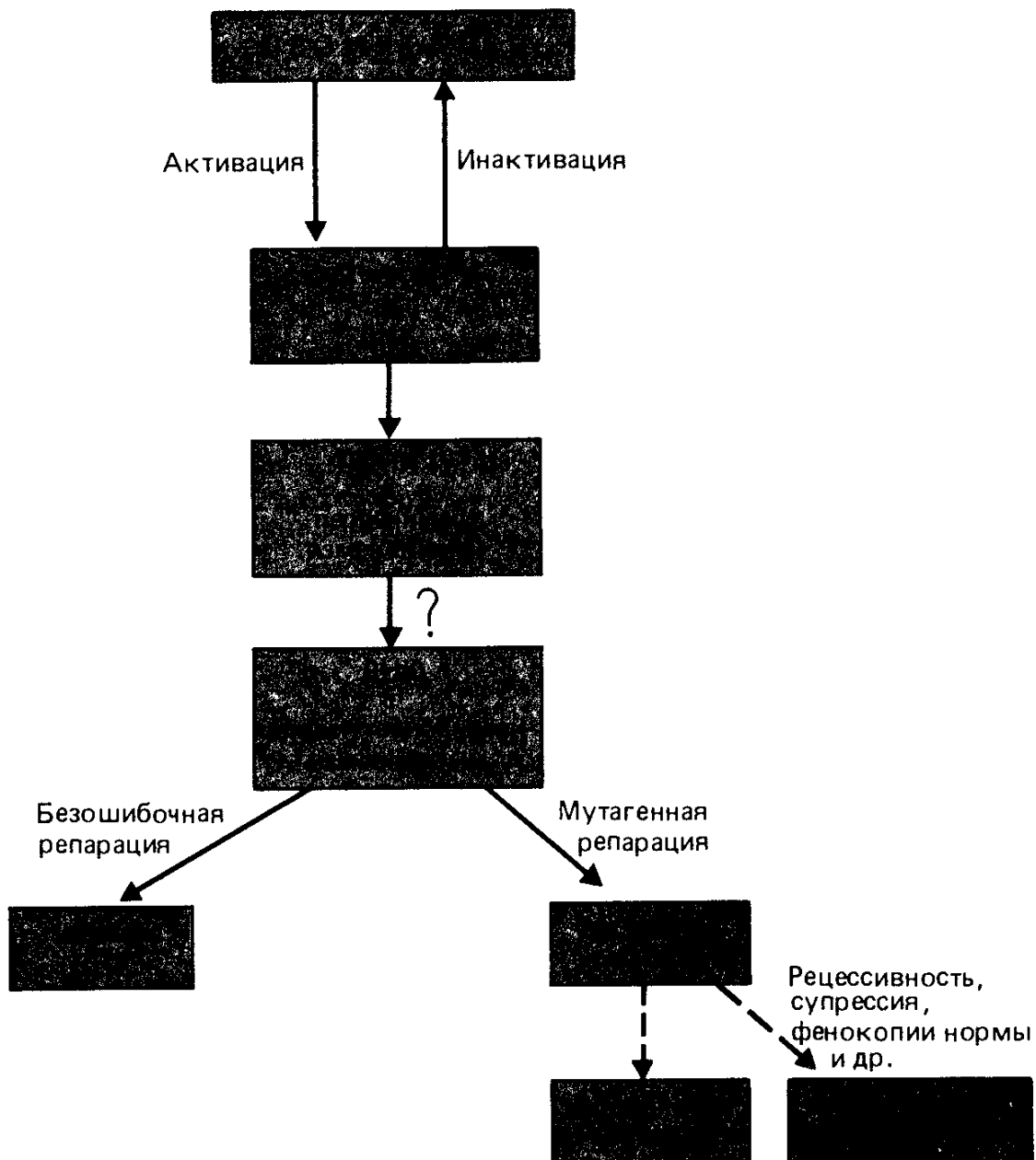


Рис. 21.5. Последовательные этапы возникновения и проявления мутаций. Пояснения в тексте

Развиваются исследования по *антимутагенезу*. Это понятие включает такие воздействия на клетку и организм, которые блокируют или уменьшают вероятность возникновения мутаций. Подобные воздействия могут стимулировать системы инактивации мутагенов или подавлять системы активации промутагенов, могут стимулировать процессы безошибочной репарации или непосредственно модифицировать мутаген, «отвлекать» его от генетического материала (рис. 21.5).

Антимутагенной активностью обладают *радиопротекторы* — соединения, способные уменьшать летальный эффект ионизирующей радиации, прежде всего серосодержащие аминокислоты: цистеин, цистин, метионин и др.

Обычно для каждого конкретного мутагена антимутагенная активность специфична, что затрудняет поиски антимутагенов. Генетическую активность *N'-метил-N'-нитро-N'-нитрозогуанидина*

(МННГ) нейтрализует кровь млекопитающих, в которой основным антимутагеном (анти-МННГ) служит *гемин*. Ненасыщенные жирные кислоты, тонизиновая кислота и катехин, содержащийся в чае и кофе, некоторые витамины, например *α-токоферол*, и другие соединения обладают большей или меньшей антимутагенной активностью по отношению к отдельным мутагенам.

К сожалению, разнообразие исследованных соединений и объектов так велико, что не представляется возможным делать какие-либо обобщения о природе антимутагенных эффектов. Кроме того, исследователи обычно не могут контролировать различные этапы становления мутации (рис. 21.5). Отсутствуют тест-системы, специализированные для поиска антимутагенов.

Обращаясь к проблеме уменьшения генетической опасности, следует помнить, что человеческие популяции гетерогенны по многим признакам (см. гл. 20), в том числе по реакции на различные воздействия внешних факторов. Это обстоятельство уже учитывает *фармакогенетика*, изучающая реакцию различных групп людей на лекарственные вещества. Известно, например, что у некоторых больных сульфаниламидные препараты вызывают гемолиз. Это связано с наследственной недостаточностью *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы*. Есть категория людей с наследственной болезненной реакцией на *глюкокортикоиды*. При применении этих препаратов у них повышается внутриглазное давление. Нестабильность некоторых мутантных форм гемоглобина сопряжена с гемолизом при применении окислителей.

Известна также наследственная чувствительность к действию некоторых мутагенов и канцерогенов. Например, люди с повышенной активностью *арилгидрокарбонгидроксилазы* склонны к заболеваниям раком легких в случае контакта с *полициклическими углеводородами*, которые после гидроксирования указанным ферментом превращаются в *эпоксиды*, обладающие высокой канцерогенной активностью.

Эти обстоятельства необходимо учитывать в разных областях человеческой деятельности: при лечении больных, при профессиональном отборе людей, имеющих дело с различными производственными вредностями.

Итак, меры по обеспечению генетической безопасности человека связаны с решением многих проблем, общих для генетики и экологии, и прежде всего охраны окружающей среды от загрязнения. Генетическая токсикология делает при этом главный акцент на генетически активные факторы. Эта работа, начавшаяся в 60-х годах в связи с ростом темпов научно-технической революции, стала неотъемлемой частью и условием дальнейшего прогресса технологии во всех областях промышленности и сельского хозяйства. Генетическая безопасность человечества должна основываться и на знании популяционной генетики человека, учитывающей полиморфизм человеческих популяций, предрасположенность людей к отрицательным реакциям на различные факторы окружающей природной и производственной среды. При

выявлении мутагенной и канцерогенной активности многих веществ, используемых ныне в сельском хозяйстве, необходима большая осторожность в их применении. Перспектива отказа от использования этих генетически активных веществ связана с разработкой биологических методов борьбы с сорняками, насекомыми-вредителями и т. д. Учет этой перспективы, а также необходимость дальнейшей селекции полезных человеку организмов невозможны без бережного отношения к биологическим природным ресурсам. Особого внимания в этом деле заслуживает сохранение генофонда планеты, который представляет собой постоянный источник полезных форм, а теперь является источником конкретных генов, которые могут быть использованы для создания новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов.

Вопросы к главе 21

1. Какова опасность испытания ядерного оружия с позиций генетики?
2. Что такое генетическая токсикология?
3. Какие факторы генетической опасности вам известны?
4. Что такое генетическая активность факторов окружающей среды?
5. Какие тест-системы для испытания генетической активности химических соединений вам известны?
6. Какова связь между мутагенным и канцерогенным действием генетически активных веществ?
7. Что такое промутагены?
8. Что такое метаболическая активация промутагенов?
9. Почему частота рекомбинации используется как один из показателей генетической опасности?
10. Несмотря на многообразие тест-систем, в большинстве из них генетическая активность веществ анализируется по результату влияния на несколько основных процессов, происходящих в клетке. Что это за процессы?
11. Что такое антимуtagenез?
12. На каких этапах возможно вмешательство в мутационный процесс, изменяющее его результаты?

Глава 22

Генетические основы селекции

По прогнозам специалистов к 2000 г. численность населения земного шара превысит 6 млрд. Уже в 1980 г. насчитывалось 4 млрд., из них 50 % людей недоедали или голодали (преимущественно в развивающихся странах). Для решения этой проблемы с учетом роста населения земного шара необходимы научные методы ведения сельского

хозяйства, производства продуктов питания в условиях интенсивного земледелия. Ключевая роль в решении продовольственной проблемы принадлежит селекции растений и животных. В течение послевоенного периода во многих странах развилась также селекция микроорганизмов, обеспечивающая потребности микробиологической промышленности и сельского хозяйства. В последние годы селекция полезных человеку организмов обогатилась достижениями генной и клеточной инженерии, биотехнологии. Роль селекции в обеспечении человека продуктами сельского хозяйства и микробиологической промышленности показана на рис. 22.1. Кроме того, селекция обеспечивает создание сортов и пород, являющихся источником сырья для многих отраслей промышленности.

Наконец, следует учитывать, что при современных промышленных методах освоения биологических ресурсов, например в лесной промышленности, рыболовстве, также требуются знания селекционных закономерностей как для рационального использования, так и для возобновления природных источников.

Селекция - это наука, изучающая биологические основы и методы создания и улучшения пород животных, сортов растений и штаммов микроорганизмов. В понимании Н. И. Вавилова селекция как наука объединяет подходы, характерные для эволюционной биологии и генетики. Исходя из этого, селекция разрабатывает

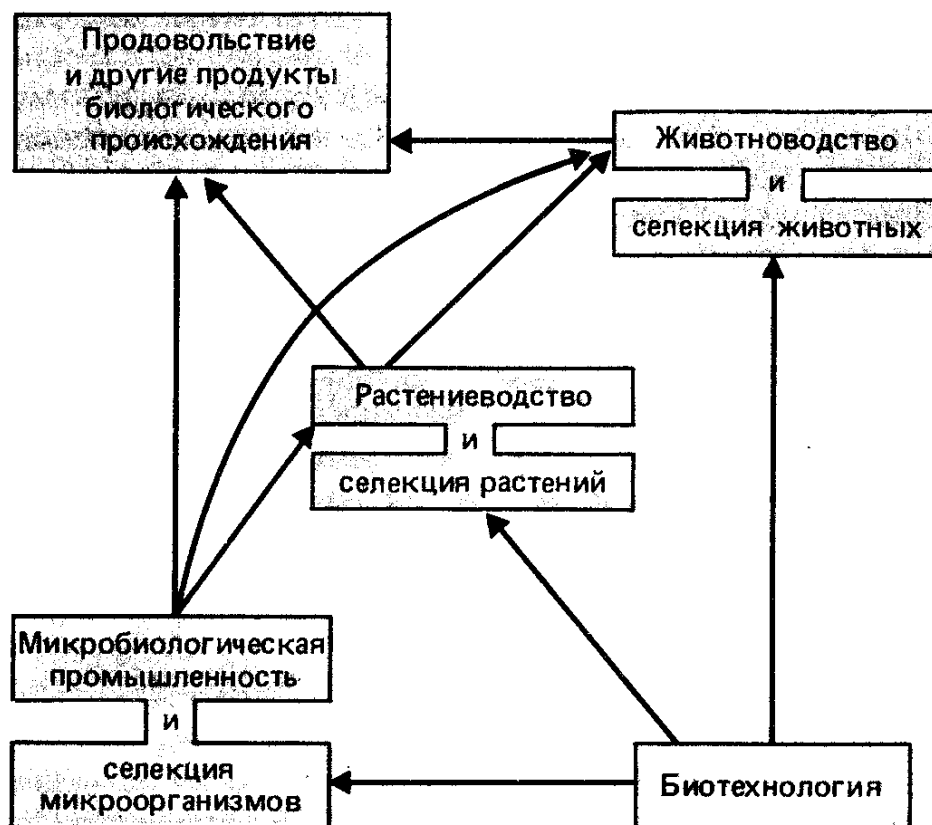


Рис. 22.1. Связь селекции с различными областями, обеспечивающими производство продуктов питания и других материалов биологического происхождения

конкретные приемы и рекомендации, которые находят практическое применение в частной селекции отдельных видов. Точка зрения Н. И. Вавилова актуальна и в наши дни.

Цели селекции обусловлены уровнем агротехники и зоотехнии, уровнем индустриализации растениеводства и животноводства. Например, в условиях дефицита пресной воды уже выведены сорта ячменя, дающие удовлетворительные урожаи при орошении морской водой, выведены породы кур, не снижающие продуктивности в условиях большой скученности животных на птицефабриках. Новый синтетический сорт тритикале можно успешно выращивать на землях с высоким рН и повышенной концентрацией алюминия. Для нашей страны очень важно создание сортов, продуктивных в условиях экологических стрессов: почвенной засухи, засухи в период налива зерна, мороза без снега при ясной погоде, поздних заморозков и т. д.

Все большее значение приобретает селекция полезных насекомых и микроорганизмов, используемых в целях биологической борьбы с вредителями и возбудителями болезней сельскохозяйственных растений.

Селекция должна учитывать и потребности рынка сбыта продукции. Так, мексиканские сорта пшеницы проникли в Индию и Пакистан только потому, что у них окраска зерна изменена на белую, а местное население привыкло печь хлебные лепешки из белого зерна. Для удовлетворения конкретных отраслей промышленности производство сельскохозяйственной продукции должно быть ориентировано на специализированную селекцию. Например, для выпечки высококачественного хлеба необходимы стекловидные (сильные) сорта мягкой пшеницы, макароны вырабатывают из твердой пшеницы, для изготовления сухого печенья высоких сортов нужны хорошие мучнистые (слабые) сорта мягкой пшеницы и т. д. Ярким примером селекции с учетом потребностей рынка служит пушное звероводство, в частности норководство, при котором генотип товарных животных ориентирован на моду в отношении окраски и оттенков меха.

Поскольку свойства живых организмов определяются их генотипом и подвержены наследственной и модификационной изменчивости, развитие селекции должно быть основано на законах генетики как науки о наследственности и изменчивости.

22.1. Модели пород и сортов

Породы животных, сорта растений, штаммы микроорганизмов представляют собой совокупности организмов, характеризующиеся определенной генетической структурой и, следовательно, нормой реакции, которые определяют их специализацию и продуктивность. В то же время сорт (порода, штамм) как биологическое средство

производства отражает уровень развития техники и потребности общества.

В развитых странах современная селекция достигла больших успехов, что затрудняет дальнейшее улучшение существующих пород и сортов. Каждый новый шаг дается все с большим трудом. Поэтому немалое значение приобретает планирование будущей формы — *создание модели породы или сорта*. На рис. 22.2 показан современный мясной тип свиньи в сравнении с диким вариантом, одомашненным типом и другими, полученными в результате селекции.

При создании модели будущего сорта или породы необходимо учитывать их назначение и те компоненты структуры и физиологических показателей, из которых будет складываться продуктивность. На рис. 22.3 представлена одна из возможных моделей сорта яровой пшеницы с карликовым типом роста, крупным колосом и другими параметрами, которые могут обеспечить высокую продуктивность в условиях механизированной технологии выращивания и уборки.

По мнению югославского селекционера С. Бороевича при создании сорта или породы на основе выработанной модели необходимо учитывать реальные возможности, которые складываются из ответов на следующие вопросы.

1. Можно ли с помощью имеющегося материала создать генотипическую изменчивость, которая обеспечит успех селекции?

2. Достаточна ли генотипическая изменчивость создаваемой популяции для комбинирования признаков, по которым ведется селекция?

3. Какие методы отбора в популяции обеспечат наиболее эффективное выделение лучшего потомства и получение нового сорта?

4. Какой должна быть генетическая структура сорта, чтобы она соответствовала агроэкологическим условиям и отвечала потребностям товарного производства, рынка?

5. Как испытывать отобранные линии, гибриды и популяции, чтобы надежно выделять лучшие генотипы?

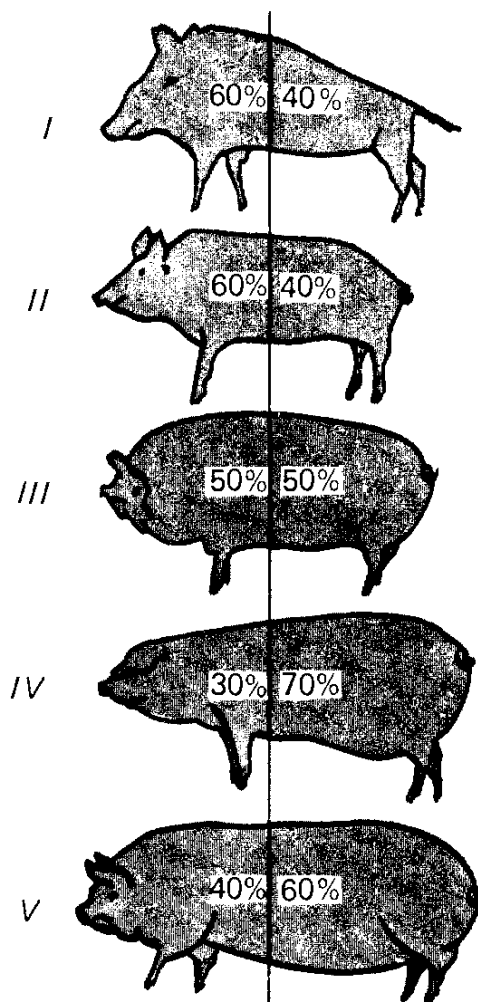


Рис. 22.2. Изменение свиньи в результате селекции и зоотехнии (из С. Бороевича, 1984). I — дикий тип, II — одомашненный тип, III — крупный тяжелый тип, IV — мясной тип, V — современный мясной тип

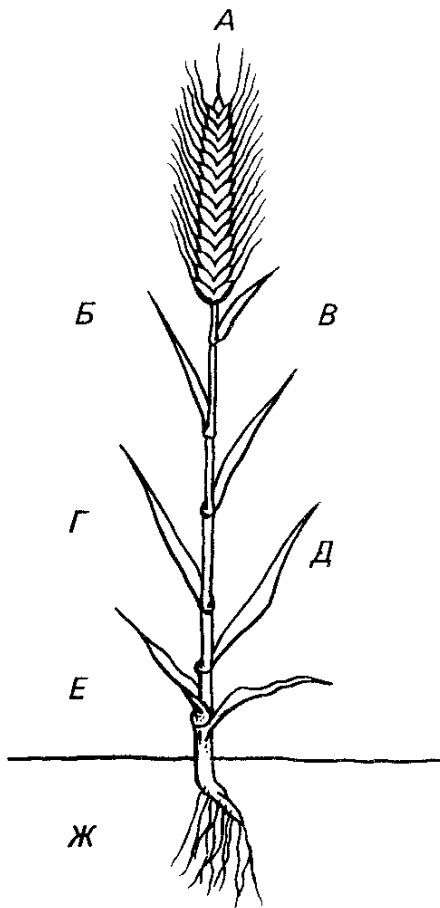


Рис. 22.3. Модель морфологического типа растения современного сорта яровой пшеницы (из С. Боровича, 1984). А — крупный прямой колос с остями и многочисленными цветками; Б — несколько мелких листьев; В — прямостоячие листья; Г — прочный стебель; Д — короткий стебель; Е — стебель без кущения (монополег); Ж — небольшое число зародышевых корешков

Уже простое перечисление этих вопросов показывает, что процесс селекции должен опираться на знание генетических закономерностей наследования признаков, их изменчивости, на знание популяционной генетики, различных способов скрещивания и методов отбора.

22.2. Количественные признаки

В предыдущих главах (см. 3. 18) уже упоминалось об огромном разнообразии вариантов, которое может обеспечить комбинативная изменчивость. Достаточно сказать, что например, гетерозигота по 16 генам при самоопылении образует более 43 млн. генотипов. При изучении наследования так называемых качественных признаков такая степень гетерозиготности исключительно редка. В то же время при изучении генетического контроля признаков продуктивности растений и животных — урожайности, скорости роста — расщепление в потомстве гибридов редко происходит менее чем по 16 генам.

Первая важная особенность элементов продуктивности — их непрерывное варьирование, характерное для всех *количественных*, т. е. мерных, признаков, к которым относятся масса, рост животных, молочность, яйценоскость и др. То же самое справедливо и для мерных признаков растений.

Вторая особенность этих признаков — их зависимость от большого числа взаимодействующих генов. Если упростить проблему и предположить, что расщепление происходит по шести несцепленным генам, то доминантное состояние каждого гена увеличивает проявление изучаемого признака на некую условную единицу измерения. Тогда должно быть семь дискретных классов выражения признака соответственно числу доминантных генов: 0, 1, 2 и т. д. Частоты этих классов нетрудно определить в соответствии с биномиальным распределением: $(\frac{1}{4} + \frac{3}{4})^6$ (рис. 22.4, А). Если имеется гетерозигота не по 6, а по 24 генам, то распределение, подсчитанное тем же способом, было бы таким, как показано на рис. 22.4, Б. При большом числе генов, действующих на один и тот же признак, ошибки измерения часто сопоставимы с различиями

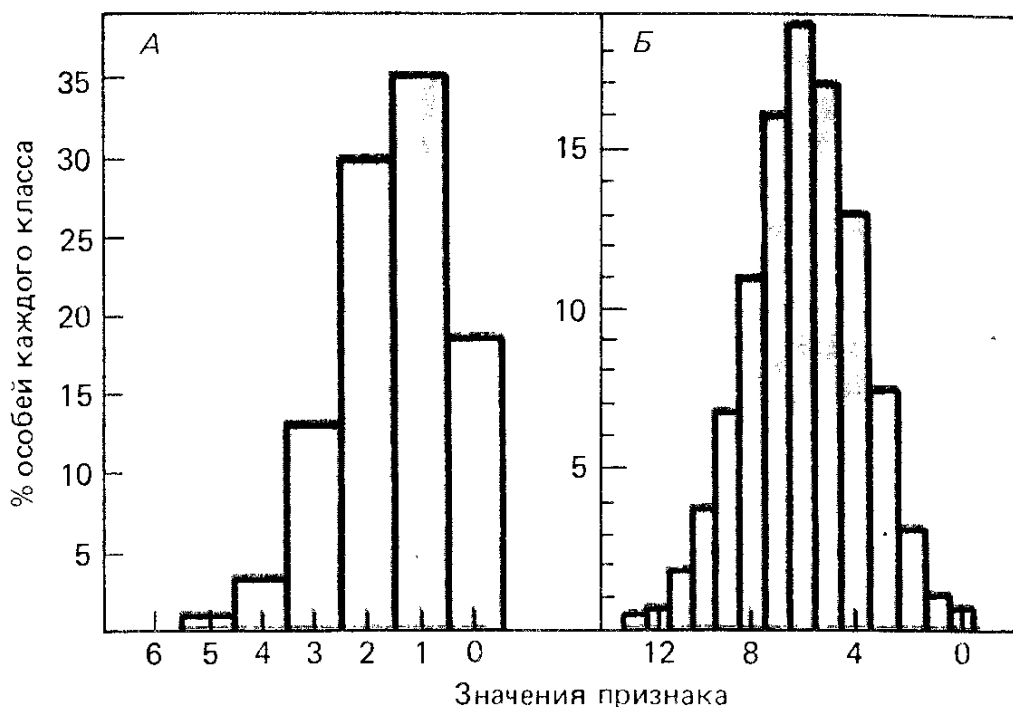


Рис. 22.4. Распределения, ожидаемые при одновременном расщеплении по нескольким генам (Д. С. Фолкнер, 1985). А — расщепление по 6 генам; Б — расщепление по 24 генам. Распределение получено на основе предположения, что по каждому гену наблюдается полное доминирование; что гомозиготность по рецессивной аллели каждого гена уменьшает значение признака на 1 (А) или на 1/4 (Б).

Цифры — число гомозигот по рецессивным аллелям

ями между классами, и дискретное наследование отдельных генов невозможно вычленишь.

Третья особенность количественных признаков заключается в том, что они также подвержены влиянию модификационной изменчивости, результат которой непрерывен, т. е. он еще больше «смазывает» различия между классами. Все вместе это приводит к тому, что изменчивость по количественным признакам оказывается непрерывной.

Таким образом, наследование и изменчивость по количественным признакам нельзя изучать теми же методами, что и по качественным признакам. В последнем случае используют термины *сильный* и *слабый* ген (гены) в зависимости от их влияния на количественный признак. Между сильными и слабыми генами можно наблюдать промежуточные варианты проявлений. Кроме того, вследствие плейотропии один и тот же ген можно рассматривать как сильный по отношению к одним признакам и как слабый по отношению к другим. Изменчивость вследствие расщепления по многим генам называют *полигенной*, а обуславливающие ее слабые гены — *полигенами*.

Собственно первое исследование полигенной изменчивости было сделано Г. Нильсоном-Эле, открывшим полимерное действие генов, или явление кумулятивной полимерии (см. гл. 3).

Изучение наследования количественных признаков сопряжено с их измерениями, результаты которых выражают в виде характе-

ристик получаемых распределений, таких, как средняя арифметическая (\bar{x}), среднее квадратическое отклонение (σ), дисперсия (σ^2), ошибка средней арифметической ($S\bar{x}$) и коэффициент изменчивости. Вычисление этих величин подробно обсуждается в курсах биометрии.

Результатом действия факторов окружающей среды будет изменчивость количественных признаков, которую обозначают общим термином *паратипическая*. Учитывая, что паратипическая изменчивость в значительной степени обусловлена модификациями, необходимо знать, в какой мере их проявление зависит от генотипа. Для этого вычисляют коэффициент наследуемости признака, который показывает, какова доля генотипической изменчивости в наблюдаемых вариациях.

Коэффициент наследуемости (h^2) вычисляют как частное от деления:

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2} = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_P^2},$$

где σ_G^2 — дисперсия, зависящая от генотипического разнообразия, а σ_P^2 — общая фенотипическая дисперсия, складывающаяся из паратипической дисперсии σ_E^2 и генотипической дисперсии (σ_G^2) для данной группы особей.

Труднее всего определить величину σ_G^2 . Практически это делается таким способом. Находят изменчивость признака в генотипически однородной — инбредной группе организмов и сравнивают с изменчивостью того же признака в гетерогенной популяции того же вида. В инбредной линии изменчивость количественного признака почти полностью зависит от условий, а не от варьирования генотипа. В этом случае дисперсия $\sigma_{P_1}^2$ принимают равной σ_E^2 , в то время как в популяции $\sigma_{P_2}^2 = \sigma_G^2 + \sigma_E^2$. Тогда генотипическая дисперсия будет равна $\sigma_G^2 = \sigma_{P_2}^2 - \sigma_{P_1}^2$. Далее величину σ_G^2 подставляют в приведенную выше формулу:

$$h^2 = \sigma_G^2 / \sigma_P^2.$$

Коэффициент наследуемости представляет собой конкретную характеристику признака в данной группе особей. Его величина варьирует не только для разных признаков, но и для разных популяций в зависимости от уровня их гетерозиготности. Величина h^2 нарастает по мере увеличения гетерогенности популяции. Чем более гомогенна популяция, тем ниже коэффициент наследуемости и, следовательно, тем менее перспективен в ней отбор по изучаемому признаку. Коэффициент наследуемости повышается при создании более благоприятных условий для проявления признака. Примеры коэффициентов наследуемости для некоторых признаков приведены в табл. 22.1.

В практической селекции определяют также величину *реализованной наследуемости* по эффективности отбора. Для этого вы-

Таблица 22.1. Коэффициенты наследуемости (h^2) некоторых признаков домашних животных (из С. М. Гершензона, 1983)

Животные	Признак	h^2
Корова	Удой за лактацию	0,0—0,7
	Процент жира в молоке	0,2—0,9
Овца	Масса при рождении	0,2—0,7
	Настриг чистой шерсти	0,4—0,7
	Тонина шерсти	0,4—0,5
Свинья	Плодовитость	0,1—0,2
	Длина тела	0,3—0,9
Курица	Плодовитость	0,1—0,4
	Яйценоскость	0,1—0,4
	Возраст начала яйценоскости	0,1—0,5
	Масса яйца	0,1—0,8

Примечание. Представлены минимальные и максимальные значения по данным разных авторов.

числяют различия между парами родителей (S) по какому-либо признаку и их потомством (R). Отношение $R:S$ показывает, какая доля различия между группами родителей сохранилась в потомстве. Тогда $h^2 = R/S$. Определять наследуемость можно и по регрессии «родители — потомки». Для этого вычисляют коэффициент регрессии (b), т. е. выясняется, насколько изменяется признак потомков при изменении признака родителей на единицу. При этом обычно пользуются уравнением прямолинейной регрессии: $y = a + bx$, где x и y — средние значения признака у родителей и потомков, a — постоянная величина, отражающая общее различие в выражении признака между поколениями, b — коэффициент регрессии. Если оперировать средними значениями признака у родителей, то $h^2 = b$; если учитывать проявление признака только одного родителя, то $h^2 = 2b$.

Существуют и другие способы определения коэффициента наследуемости.

22.3. Типы отбора

Как было показано, в популяции, не испытывающей влияния отбора, возможны лишь очень медленные изменения за счет мутационного процесса или случайные флуктуации частот аллелей вследствие генетико-автоматических процессов. Значение искусственного отбора по достоинству оценил Ч. Дарвин. Собственно успехи селекционеров, владевших приемами отбора, и натолкнули Ч. Дарвина на идею естественного отбора. Сходство между эволюционным процессом и селекцией дало Н. И. Вавилову основание назвать селекцию эволюцией, направляемой человеком.

Наряду со сходством естественного и искусственного отбора между ними есть и существенные различия.

Искусственный отбор проводят при определенных условиях,

избранных селекционером. Например, отбор по устойчивости растений к патогенным микроорганизмам может вестись в теплице при определенной температуре, влажности, освещенности. Следует подбирать такие условия, в которых селектируемый признак выражается наиболее полно. Известен пример отбора крыс по устойчивости к бактериям, вызывающим кариес зубов. Когда искусственный отбор вели среди животных, получавших корма тонкого помола, наблюдали незначительный эффект. Когда же эксперимент повторили при кормлении крыс пищей грубого помола, устойчивость к кариесу возросла в 7 раз через 11 поколений, поскольку пища грубого помола — лучший провокационный фон для проявления признака, по которому вели отбор в положительную сторону. В этих условиях отбор наиболее восприимчивых животных в каждом поколении также привел к ощутимому снижению устойчивости крыс к кариесу (отбор в отрицательную сторону).

Этот пример одновременно иллюстрирует еще одно отличие искусственного отбора от естественного. Искусственный отбор экспериментатор ведет совсем не обязательно в сторону адаптивного проявления признака. Так, в модельных экспериментах с дрозофилой Л. З. Кайданов отселектировал линию НА с явно инадаптивными свойствами — пониженной половой активностью самцов (рис. 22.5). В то же время при естественном отборе преимущество в оставлении потомства почти всегда имеют более приспособленные генотипы. Исключение составляют некоторые

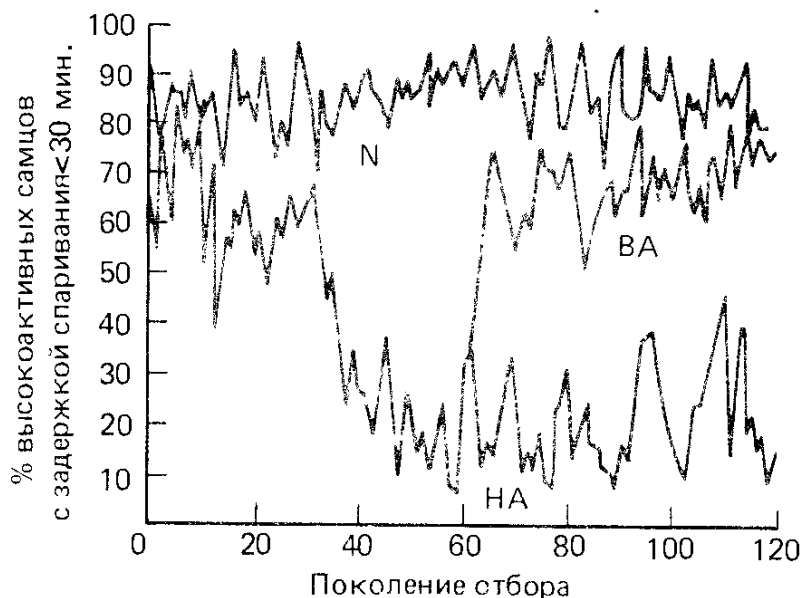


Рис. 22.5. Ход отбора на различия по половой активности самцов *D. melanogaster* в течение первых 120 поколений (Л. З. Кайданов, 1982).

По оси абсцисс — поколение отбора, по оси ординат — процент высокоактивных самцов с задержкой спаривания менее 30 мин. НА — инбредная низкоактивная линия; ВА — инбредная высокоактивная линия, полученная обратной селекцией из НА; N — аутбредная неселектируемая линия

мутантные аллели, обуславливающие в гомозиготе инадаптивные признаки, но дающие преимущество их гетерозиготным носителям, как было показано на примере серповидноклеточной анемии у человека (см. гл. 20).

Наконец, естественный отбор идет в условиях преимущественно случайных скрещиваний, обеспечивающих то или иное приближение к панмиксии, в то время как искусственный отбор проводят при строго контролируемых скрещиваниях небольшого числа особей.

Необходимо помнить, что время селекционера ограничено, ограничена и выборка (популяция), с которой он работает. Этим искусственный отбор также отличается от естественного. Поэтому искусственный отбор нельзя вести сразу по всем признакам: приходится отбирать, например, животных, лучших по определенным признакам, но средних по другим или всем остальным.

В селекции принято различать два основных типа отбора: массовый и индивидуальный.

Массовый отбор проводится по внешним, фенотипическим характеристикам в направлении, избранном селекционером. Генетический эффект отбора зависит от того, насколько точно селекционер может различать нужные генотипы. Наследуемость количественных признаков часто низка, поэтому ориентация только на фенотип особи ненадежна. Так, отбор лучших несушек без учета их родословных редко приводит к улучшению яйценоскости. На этот признак большое влияние оказывает среда и его коэффициент наследования низок. Например, если при массовом отборе $h^2 = 0,25$, то дочери лучших и худших матерей несли в среднем примерно одинаковое количество яиц в месяц. В то же время дочери матерей, несших более крупные яйца, также несли более крупные яйца, а дочери матерей, несших мелкие яйца, тоже наследовали этот признак. Объяснение заключается в том, что коэффициент наследуемости массы яиц выше, чем для яйценоскости, и в рассмотренном случае равняется 0,75. Следовательно, массовый отбор может дать результаты только при достаточно высоком коэффициенте наследуемости.

Массовый отбор эффективен в отношении признаков, контролируемых одним или немногими генами, т. е. для качественных признаков. Количественный анализ результатов селекции «моногенных» признаков проводят на основе закономерностей популяционной генетики, которые были рассмотрены в гл. 18.

Массовый отбор редко бывает успешным по полигенным признакам с низким коэффициентом наследования. В этом случае необходимо применять индивидуальный отбор.

Индивидуальный отбор основан на оценке генотипа растения или животного, используемого в селекционном процессе. Для этого необходимо получить потомство отбираемого организма и оценить его показатели. При индивидуальном отборе популяцию делят на семьи или изучают потомство от самоопыления отдельных расте-

ний (инбридинг или инцухт), где это позволяет система несовместимости. У животных ведут инбридинг посредством близкородственных скрещиваний для повышения уровня гомозиготности. На последующих этапах отбора используют тех особей, которые дали наибольшее число потомков с высокими показателями. Учитываются также данные родословных и сведения о продуктивности *сибсов* (братьев и сестер) и их потомков.

Одним из вариантов оценки потенциалов селекционируемых организмов является *сиб-селекция*, которая заключается в закладке индивидуальных семей или проведении индивидуальных скрещиваний и разделении полученного потомства на две части в каждой семье. Половину каждого потомства проверяют по выбранному показателю и таким образом выявляют наилучшую семью. Далее оставшуюся часть потомства лучшей семьи размножают, получают следующее поколение и всю процедуру повторяют вновь. Такой подход применим к многоплодным животным, например к насекомым, а также к растениям. Он не применим ко многим сельскохозяйственным животным. Неудобство, которое сопряжено с проверкой производителей по потомству, — это длительность времени, необходимого для получения результата, и его неизбежная потеря для использования, наконец, оцененного по достоинству производителя. В настоящее время эта проблема в принципе решена благодаря разработке методов искусственного осеменения и практически неограниченно долгого хранения спермы производителей.

Индивидуальный отбор затруднен при работе с перекрестно опыляемыми растениями. В этом случае невозможна закладка индивидуальных самоопыляющихся линий. Однако знание генетического контроля *несовместимости* и получение самосовместимых мутантов позволяет преодолеть эту трудность. Такой метод предложен В. Г. Смирновым для создания исходного селекционного материала у ржи. Различные формы ржи скрещивают с одной и той же самосовместимой формой и в полученном потомстве проводится самоопыление, закладываются линии, которые далее могут быть оценены по показателям продуктивности и другим хозяйственно важным признакам. Данный прием позволяет резко повысить гомозиготность растений и перейти к методам индивидуального отбора в селекции видов со строго перекрестным опылением.

Селекцию по количественным признакам можно облегчить, если в виде косвенного показателя продуктивности использовать какие-либо качественные маркеры — сигнальные, или *сигналы*, как их называл А. С. Серебровский. В последнее время большие надежды возлагают на изозимные спектры, которые могут быть применены в качестве сигналов. Этот подход успешен, если наследование определенных изозимов коррелирует с наследованием признаков продуктивности благодаря совпадению условий их максимальной экспрессии либо благодаря сцеплению между теми и другими генами. Так, было показано, что четыре катодные фрак-

ции эстеразы E_1 коррелируют с размерами и массой зерновок риса. При этом две из четырех фракций лучше проявляются у тонкозерных сортов, а две другие — у крупнозерных. Средний урожай зерна у гибридов кукурузы коррелирует с разнообразием в исходном материале изоферментов эстеразы, кислой фосфатазы, пероксидазы и алкогольдегидрогеназы.

Полиморфизм по белкам используют и в животноводстве для контроля родословных. Породы животных различают по частоте встречаемости аллелей многих полиморфных локусов, кодирующих ферменты. Однако вопрос о возможности отбора более продуктивных животных по изозимным спектрам белков остается спорным.

22.4. Типы скрещиваний в селекции

Отбор в селекции сочетается с различными способами разведения растений и животных. Отбор достаточно эффективен только в сочетании с определенными типами скрещиваний. Все разнообразие типов скрещиваний сводится к инбридингу и аутбридингу. Инбридинг — это близкородственное, а аутбридинг — неродственное скрещивание. Разновидность аутбридинга — *кроссбридинг*, или межпородное скрещивание.

Инбридинг применяют для разложения популяции на гомозиготные линии, что легче всего достигается у растений-самоопылителей, как это показал В. Иогансен (см. гл. 17). Для организмов с перекрестным размножением необходимы близкородственные скрещивания: брат — сестра, отец — дочь, мать — сын, двоюродные братья — сестры и т. д. Последствия инбридинга иллюстрирует рис. 22.6, на котором показано изменение соотношения гомо- и гетерозигот в потомстве исходной гетерозиготной формы при принудительном самооплодотворении или при скрещиваниях особей только одинаковых генотипов. Видно, что при моноген-

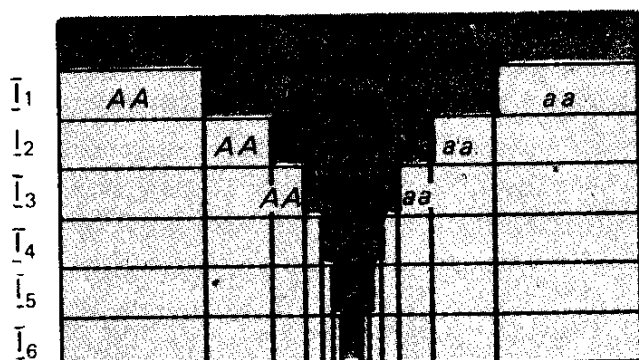


Рис. 22.6. Изменения частот генотипов при инбридинге в популяции, основанной гетерозиготной формой Aa (по М. Е. Лобашеву, 1967).

I_1, I_2 и т. д. — поколения инбридинга

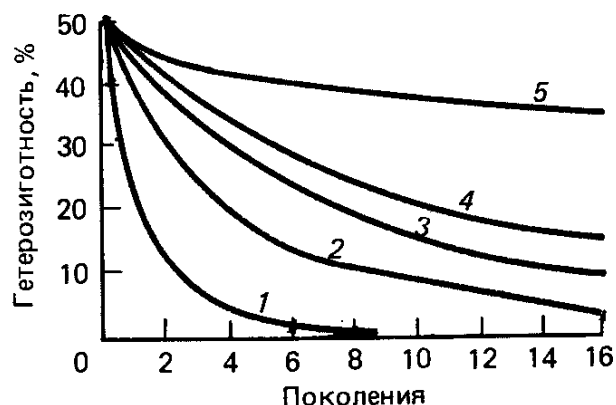


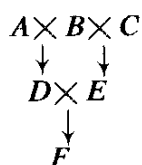
Рис. 22.7. Снижение гетерозиготности в популяции в зависимости от степени инбридинга:

1 — самооплодотворение, 2 — братья \times сестры, 3 — полубратья \times полусестры, 4 — двоюродные братья и сестры с двумя общими предками и 5 — с одним общим предком

ном наследовании признака в популяции очень скоро становится гомозиготным большинство особей.

Гомозиготизация по генам, контролирующим изучаемый признак, происходит тем быстрее, чем более близкородственные скрещивания используют при инбридинге (рис. 22.7). Если признак контролируют несколько генов, то гомозиготизация идет медленнее (если не применяют самооплодотворение). Поскольку в большинстве случаев рецессивные аллели, находящиеся в гетерозиготном состоянии в популяции, оказывают отрицательное влияние на организм, следствием инбридинга будет постепенное вырождение, или *инбредная депрессия*, обусловленная гомозиготизацией рецессивных аллелей. Одновременно инбридинг приводит к выравниванию линий, делает их гомогенными по большинству признаков. Это не означает, что путем инбридинга можно получить абсолютно гомозиготные линии. Они всегда будут гетерозиготны по половым хромосомам и по крайней мере по тем аллелям, которые есть в X- и Y- или Z- и W-хромосомах. Разрушает гомозиготность и мутационный процесс.

Для характеристики степени инбридинга служит *коэффициент инбридинга (F)*. Уже рассматривался частный вариант — вычисление *коэффициента инбридинга* (гл. 18) для популяции, в которой часть особей размножается путем самооплодотворения. В более общей форме величина *F* позволяет определить вероятность того, что две аллели любого гена данной особи идентичны по происхождению, т. е. были получены от общего предка. $F = \left(\frac{1}{2}\right)^n$, где *n* — число особей в линии родословной, идущей от инбредного потомка к общему предку и обратно. Например, в родословной



животное *F* имеет коэффициент инбридинга $(1/2)^3$, поскольку в линии к общему предку — *B* — три особи: *E*, *B* и *D*. Если общий предок (например, *A*) сам инбредный, то на его коэффициент инбридинга делают поправку:

$$F = \left(\frac{1}{2}\right)^n \cdot (1 + F_A),$$

где F_A — коэффициент инбридинга общего предка *A*.

Итак, инбридинг разлагает популяцию на множество индивидуальных, отличных друг от друга линий, гомозиготных по большинству генов.

К противоположному эффекту приводит *аутбридинг* или неродственное скрещивание. Как было показано в гл. 18, отсутствие родства между особями одного вида — понятие весьма условное. Чаще всего понятие «аутбридинг» применяют по отношению к скрещиванию особей из разных популяций. Аутбридинг повышает

ет уровень гетерозиготности потомства и гетерогенности популяции.

В F_1 при скрещивании выровненных инбредных линий гибридные потомки обычно также представляют выровненный материал, что соответствует закону Г. Менделя о единообразии гибридов F_1 . Последующее расщепление создает гетерогенность.

22.5. Гетерозис

Гетерозис — гибридная мощьность, проявляющаяся в превосходстве гибрида над обоими родительскими формами. Это явление было описано еще И. Г. Кельрейтером, одним из первых предшественников Г. Менделя. Свои результаты по изучению гибридов между «Виргинским» и «Перувианским» табаками он опубликовал в «Трудах Вольного экономического общества» Санкт-Петербурга (1772).

Гетерозис широко используется в селекции растений и животных, но механизм гибридной мощьности до сих пор до конца не ясен.

Депрессия, связанная с инбридингом, — явление, противоположное гетерозису. Существование первого обычно служит гарантией второго и, если инбредную депрессию связывают с гомозиготизацией линий, то гетерозис — с резким повышением гетерозиготности. Еще И. Г. Кельрейтер отмечал, что мощьность гибридов связана со степенью генетического различия их родителей. Кроме того, он отметил, что гибридная сила имеет особое значение в естественных, природных условиях. Оба наблюдения в дальнейшем получили многочисленные подтверждения. Значение перекрестного оплодотворения подробно обсуждал Ч. Дарвин (1876) в своем труде «Действие перекрестного опыления и самоопыления в растительном мире», где отметил, что перекрестное оплодотворение обычно полезно, а самооплодотворение вредно. При этом Ч. Дарвин не оставил без внимания и самоопыляющиеся растения, благополучно существующие в условиях инбридинга.

Все это подчеркивает сложность проблемы гетерозиса. Характерная его черта — постепенное затухание в ряду поколений (см. рис. 22.8). По данным В. Шелла, урожайность зерна гетерозисных гибридов кукурузы в F_2 в среднем снижается на 35 %, а в F_3 — на 50 % по сравнению с урожайностью в F_1 . Многочисленные попытки «закрепления» гетерозиса пока не привели к существенным результатам, за исключением тех случаев, когда материал можно размножить вегетативно. Пути закрепления гетерозиса видят в переводе гибридов к размножению посредством апомиксиса (см. гл. 8) или полиплоидизации с использованием колхицина или некоторых мутантов с нарушениями мейоза (см. гл. 4), например мутанта кукурузы типа *elongate*, у которого образуются нередуцированные — диплоидные яйцеклетки. Очевидно, полиплоидизация не закрепляет гетерозис, а замедляет снижение

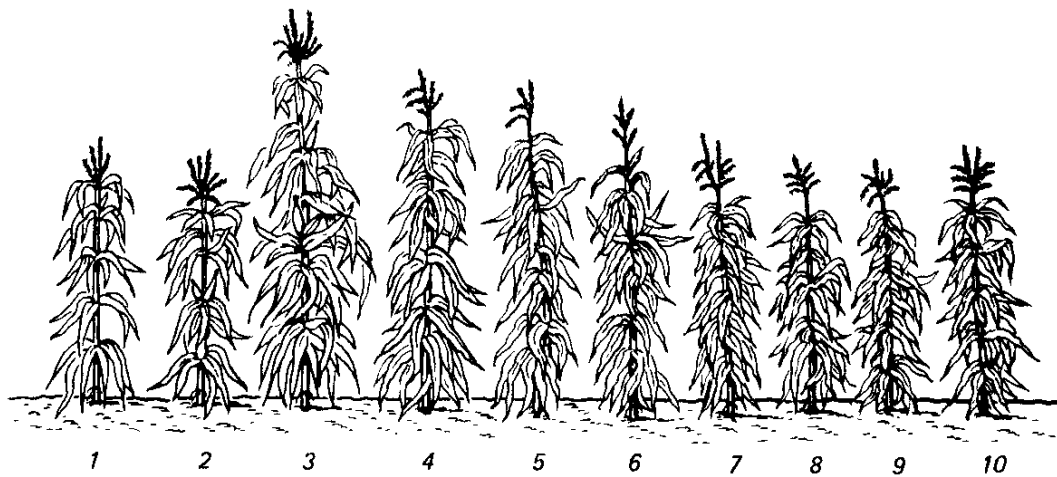


Рис. 22.8. Проявление гетерозиса в различных поколениях гибридной кукурузы (из Г. В. Гуляева, 1977):
1, 2 — исходные родительские формы, 3 — гибриды F_1 , 4—10 — гибриды последующих поколений

его эффекта в последующих поколениях благодаря нарушению принципа чистоты гамет (см. гл. 14).

Для использования явления гибридной мощности приходится вновь получать гетерозисные гибриды. Именно с этим была связана разработка системы скрещиваний для получения двойных межлинейных гибридов кукурузы на основе цитоплазматической мужской стерильности, которая рассматривалась в гл. 10.

Гетерозис может касаться отнюдь не всех признаков растения или животного. А. Густафссон предложил следующую классификацию типов гетерозиса у растений:

1) *репродуктивный гетерозис*, который выражается в лучшем развитии органов размножения, приводит к повышению урожайности плодов и семян;

2) *соматический гетерозис*, приводящий к мощному развитию вегетативной массы;

3) *приспособительный, или адаптивный, гетерозис*, который выражается в общем повышении жизнеспособности. Выделение этого типа гетерозиса связано с тем, что более мощное развитие у гибридов каких-либо отдельных признаков еще не означает повышения адаптивной ценности организма. Особенно наглядно это показано для культурных растений, у которых развитие хозяйственно ценных признаков обычно не совпадает с биологической пользой. Крупноколосые и крупнозерные сорта злаков обычно менее морозостойки и менее засухоустойчивы, увеличение длины стебля ведет к полеганию растений и т. д.

Проявление гетерозиса зависит от направления скрещивания и может наблюдаться только в одном из реципрокных скрещиваний. Большое значение имеют также условия выращивания гибридов F_1 . Признаки высокой продуктивности могут в полной мере проявиться только при благоприятных условиях.

Наилучшие результаты дает гетерозис при скрещивании определенных линий, поэтому необходимо предварительно проверять

их на *комбинационную способность*, т. е. на способность образовывать продуктивные гибриды.

Теории гетерозиса подразделяют на следующие основные группы.

Теория доминирования объясняет гетерозис подбором у гибрида благоприятных доминантных аллелей разных генов, утраченных при инбридинге. Если скрещиваемые линии гомозиготны по рецессивным аллелям разных генов, то гибриды окажутся полигетерозиготами, в которых доминантные аллели будут взаимодействовать по комплементарному типу. Если учесть, что количественные признаки наследуются полигенно, то подбор большего числа аддитивно действующих доминантных генов должен привести к более мощному проявлению этих признаков. Эта теория была предложена в 1908 г. Г. Девенпортом и развита в 1917 г. Д. Джонсом. Последующее развитие популяционной генетики, особенно установление гетерозиготности особей из природных популяций по многим рецессивным аллелям, оказывающим в гомозиготе отрицательное влияние на жизнеспособность (см. гл. 18), заставило пересмотреть эту теорию.

Теория сверхдоминирования связывает гибридную мощьность с преимуществом гетерозиготного состояния ($AA < Aa > aa$). При этом эффект сверхдоминирования в гетерозиготе может наблюдаться даже в том случае, когда рецессивная аллель в гомозиготе летальна или приводит к снижению жизнеспособности. Преимущество гетерозиготности хорошо демонстрирует пример повышения устойчивости гибридов льна к ржавчине. Этот признак контролируют несколько генов, каждый с серией аллелей. При этом в конкретном гене разные аллели определяют устойчивость к разным расам паразита. Гетерозигота по гену устойчивости (M^1M^2) оказывается невосприимчивой к обоим расам ржавчины, иммунитет к которым определяют аллели, находящиеся в гетерозиготе.

В рассмотренном примере очевидно преимущество гетерозиготности, обусловленное независимым действием аллелей. Известно, что аллели по меньшей мере половины изученных генов могут взаимодействовать по типу межаллельной комплементации (см. гл. 2). Образование гибридных белков-мультимеров в естественных условиях показано для большого числа изозимов (см. гл. 18). У гибридов описано повышение активности ферментов и расширение их изозимных спектров. Так, у гибридов кукурузы выявлено повышение активности и стабильности *алкогольдегидрогеназы*, а у дрозофилы — *октанолдегидрогеназы* по сравнению с аналогичными показателями скрещиваемых линий.

Значение аллельных взаимодействий в проявлении гибридной мощьности подтверждают примеры так называемого *моногенного гетерозиса*. Так, С. Даскалов получил гетерозисные гибриды томата, преимущество которых по продуктивности было связано с гетерозиготностью по одной хлорофильной мутации *xantha* (летальной в гомозиготе!).

Синтез представлений об аллельных и неаллельных взаимодей-

ствиях, обеспечивающих гетерозис, предложил В. А. Струнников в своей теории *компенсаторных комплексов*. Этот термин обозначает комплекс генов и их аллелей, который подбирается при получении инбредных линий. Компенсаторный комплекс генов нивелирует отрицательные эффекты высокого уровня гомозиготности, а при гибридизации дает тот самый эффект в выражении признаков, который и обуславливает гетерозис. Существенно дополняет теорию гетерозиса В. А. Струнникова его гипотеза о стабилизации действия генов у гибридов F_1 в условиях гетерогенной окружающей среды и об уменьшении влияния спонтанных факторов модификации (см. гл. 17).

22.6. Полиплоидия и отдаленная гибридизация

Эффект *автополиплоидии*, заключающийся в увеличении размеров клеток и всего растения вследствие умножения числа наборов хромосом (см. гл. 14), широко применяют при создании новых сортов растений. При этом учитывают, что лучшие результаты получаются у видов с меньшим, нежели у видов с большим исходным числом хромосом, у перекрестноопыляющихся, а не у самоопылителей и, наконец, у растений, используемых для получения массы вегетативных органов в сравнении с растениями, выращиваемыми для получения семян.

Успешно завоевывают посевные площади тетраплоидные сорта ржи, выращиваемой на зерно. Недостатки тетраплоидов ржи заключаются в пониженной фертильности (на 10—15 % более высокая череззерница) по сравнению с диплоидной рожью, а также в недостаточной устойчивости к неблагоприятным условиям, например к вымоканию или поражению снежной плесенью.

При получении полиплоидных форм нельзя надеяться на то, что они сразу же окажутся готовыми сортами, даже если они происходят от перспективных диплоидных сортов. Необходим этап селекции, в ходе которой может быть повышена фертильность, отобраны формы, образующие с большей частотой тетраваленты в мейозе, повышена устойчивость растений к неблагоприятным условиям. Большое значение при создании сорта имеет его оптимальная популяционная структура, обеспечивающая адаптивную ценность. Этот момент был, в частности, учтен В. С. Федоровым, В. Г. Смирновым и другими при получении тетраплоидного сорта ржи «Ленинградская тетра», основой для которого послужила синтетическая популяция, созданная из нескольких полиплоидных форм ржи, имевших различное происхождение. Это позволило не только обеспечить новому сорту — популяции — адаптивные свойства, но и повысить его фертильность. В. В. Сахаров получил продуктивный сорт тетраплоидной гречихи на основе селекционной работы с исходной формой, возникшей под действием колхицина. У исходного тетраплоида тоже снижалась фертильность. Плодовитость была повышена в ходе дальнейшей селекции тетраплоида.

Как уже упоминалось (гл. 14), у ряда растений триплоиды по вегетативной массе оказываются урожайнее диплоидов и тетраплоидов. Это в частности, относится к сахарной свекле, триплоидные гибриды которой широко применяются в производстве. Поскольку триплоиды стерильны, необходимо каждый раз получать гибридные семена от скрещивания диплоидной и тетраплоидной форм. Успешному применению этой процедуры способствовало открытие мужской стерильности у свеклы. Стерильность триплоидных гибридов может приобретать и положительное значение, например для арбуза, винограда, образующих бессемянные плоды.

Ценные результаты дает использование в селекции явления *аллополиплоидии*. Основой этого подхода служит метод отдаленной гибридизации. Он широко применяется при получении новых форм плодовых растений, которые можно размножить вегетативно. Методы восстановления фертильности у отдаленных гибридов и способы получения форм, *дополненных или замещенных по отдельным хромосомам* (см. гл. 14), позволяют объединять и перекombинировать ценные качества растений разных видов.

В результате гибридизации пшеницы и ржи получен целый ряд форм, объединенных общим названием *тригикале*. Тригикале обладают хорошей урожайностью, зимостойкостью и устойчивы ко многим болезням пшеницы. В нашей стране эта работа была начата Г. К. Мейстером, а затем продолжена А. Ф. Шулындиным и В. Е. Писаревым. На основе гибридизации пшениц и пырея Н. В. Цициным получены ценные формы — пшенично-пырейные гибриды, устойчивые к полеганию и обладающие высокой урожайностью.

22.7. Использование мутационного процесса в селекции

Спонтанные мутанты находят применение преимущественно в селекции растений. Так, на основе мутанта желтого люпина, лишенного алкалоидов, получен ряд сортов сладкого люпина, которые выращивают на корм скоту. Люпин, содержащий алкалоиды, для этой цели непригоден, так как животные его не едят. Большое число мутантов известно у плодовых культур. Эти мутанты используют непосредственно как новые сорта или в гибридизации с другими формами. Благодаря возможности вегетативного размножения плодовых у них оказывается перспективной многоступенчатая селекция мутантов. Особенно часто используют мутантов в декоративном цветоводстве.

Широкую известность приобрел спонтанный мутант кукурузы *ораче*, отличающийся высоким процентом лизина в зерне. Он используется для создания так называемых высоколизиновых гибридов кукурузы.

С открытием мутагенного эффекта радиации и химических веществ развернулись работы по получению индуцированных мутантов. Индуцированные рентгеновскими лучами мутанты ячменя

получены А. Густафссоном. Среди них отобраны формы с повышенной урожайностью зерна, а также ставший теперь знаменитым мутант с укороченным стеблем. Аналогичные мутанты были выделены затем у многих злаков. Они отличаются устойчивостью к полеганию и дают большие преимущества при машинной уборке. Кроме того, короткая и твердая соломина дает возможность вести дальнейшую селекцию на увеличение размера колоса и массы семян без опасения, что повышение семенной продуктивности приведет к полеганию растений.

С помощью мутагенов получают и мутации мужской стерильности, используемые далее в селекционных программах, при получении гетерозисных гибридов сахарной свеклы, риса и других культур. Под руководством И. А. Рапопорта в СССР широко развернуты работы по применению химического мутагенеза в селекции растений и животных.

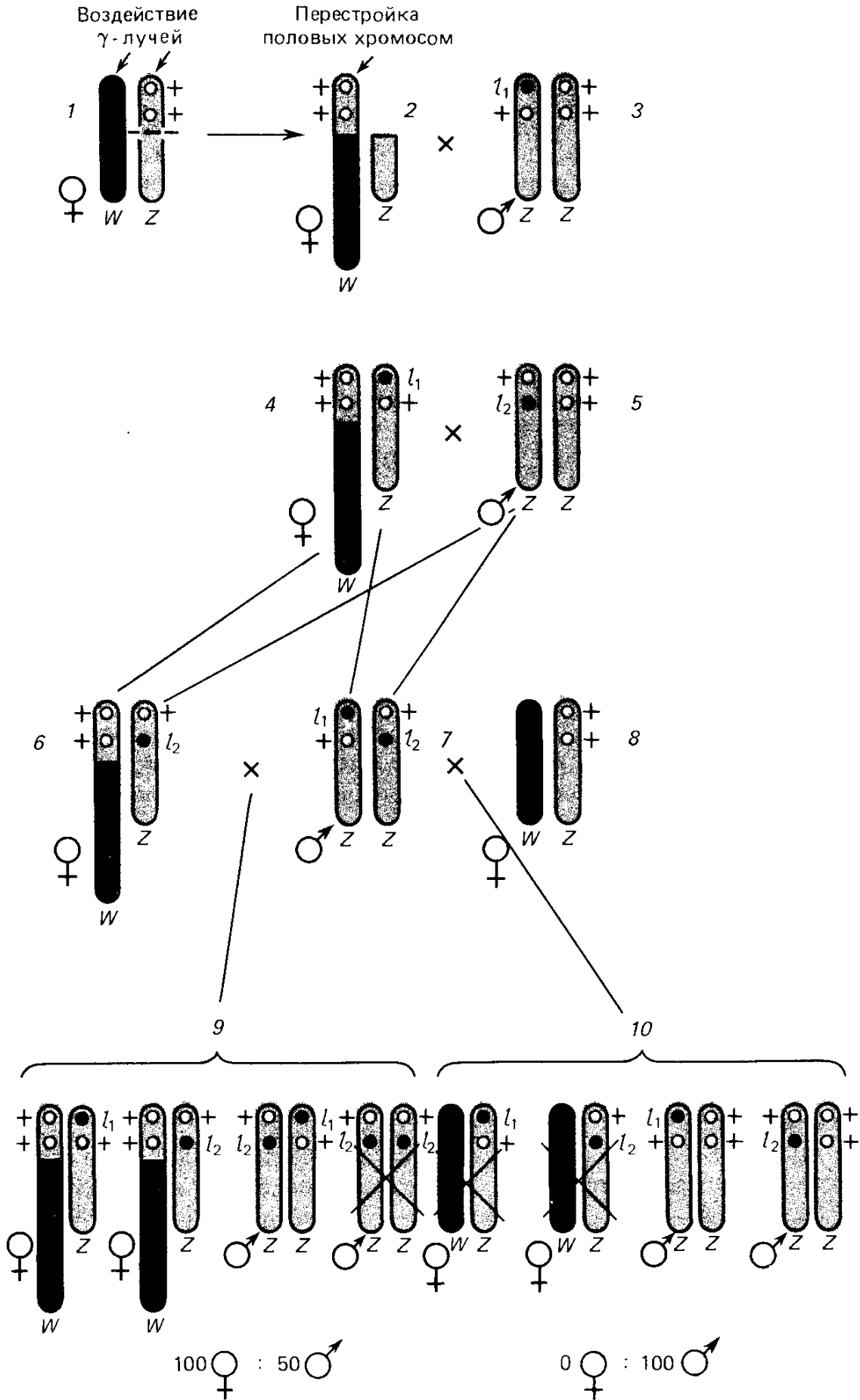
Индукцированные γ -лучами перестройки хромосом успешно использовал В. А. Струнников в селекции шелкопряда. Известно, что самцы шелкопряда образуют коконы на 25—30 % более продуктивные, чем коконы самок. Поэтому выгоднее выкармливать только самцов. Как известно, у шелкопряда гетерогаметный пол — женский (ZW), а гомогаметный — мужской (ZZ). В 10-й хромосоме у шелкопряда локализован ген (W), доминантная аллель которого обуславливает темную окраску яиц, а рецессивная — белую.

Благодаря индуцированной транслокации доминантная аллель темной окраски яиц была перенесена на W -хромосому и передавалась непосредственно от матерей дочерям. В результате уже на стадии оплодотворенных яиц можно отбирать только будущие мужские особи. Облегчает такую работу использование автомата с фотоэлементом.

В дальнейшем В. А. Струнников разработал еще более изящный способ получения чисто мужского потомства у шелкопряда. С помощью индуцированного мутагенеза выведена линия, у которой обе половые хромосомы маркированы рецессивными летальными мутациями. При скрещивании таких дигетерозиготных самцов с любыми нормальными самками все женское потомство погибает, поскольку при структуре ZW либо одна, либо другая летальность оказывается в гемизиготе. Таким образом выкармливают почти исключительно самцов. Лишь в редких случаях появляются самки с частотой 1:500, 1:1000 вследствие кроссинговера в Z -хромосоме у исходного самца. Система скрещиваний, использованная при выведении линии и получении чисто мужского потомства, показана на рис. 22.9.

Рис. 22.9. Получение линий тутового шелкопряда, самцы из которых дают только мужское потомство при скрещивании с любыми нормальными самками (В. А. Струнников, 1983).

Рецессивные летали l_1 и l_2 — черные кружки, их нормальные аллели — светлые кружки. 1 — исходная самка, 2 — самка с транслокацией части Z -хромосомы на W , 3 — самец и 4 — самка, гетерозиготные по летали l_1 , 5 — самец и 6 — самка, гетерозиготные по летали l_2 , 7 — самец, дигетерозиготный по леталам l_1 и l_2 , 8 — нормальная самка, 9 — потомство, получаемое при скрещивании самца сконструированной линии с любой нормальной самкой



Особенно успешно применяют индуцированный мутагенез в селекции микроорганизмов. В нашей стране целый ряд продуцентов антибиотиков получен под руководством С. И. Алиханяна путем обработки актиномицетов мутагенами физической и химической природы, а также при помощи комбинированных воздействий.

Рассмотренные в этой главе генетические методы и закономерности показывают, что селекция представляет собой область наиболее полного практического воплощения результатов, получаемых генетикой. Все традиционные разделы генетики — гибридизация, мутационный процесс, хромосомные перестройки и полиплоидия, генетика популяции и т. д. — находят применение в селекции. Развивающиеся в последнее время методы генной и клеточной инженерии, биотехнология обещают в ближайшее время обогатить генетические основы селекции новыми подходами, главное содержание которых — сокращение сроков получения исходного материала для селекции и направленность в изменении генов и хромосом.

Разработаны методы увеличения потомства ценных животных — производителей посредством гормональной стимуляции *суперовуляции*, т. е. одновременного созревания нескольких яйцеклеток, которые извлекают после оплодотворения и пересаживают приемным матерям менее ценных пород или менее продуктивным женским особям той же породы.

Принципиально решена проблема *трансформации животных и растений* с использованием клонированных генов. Достигнуты первые успехи в переносе генов между разными видами животных. Получены мыши, трансформированные вектором, содержащим ген гормона роста крысы и человека. Осуществляется межвидовой и межродовой перенос генов, кодирующих хозяйственно ценные белки у растений.

Большие надежды связывают с направленным изменением генов в составе плазмид *in vitro*. На основе этого метода ведутся работы по так называемой *белковой инженерии*, позволяющие изменять в нужном направлении ферменты, кодируемые этими генами. Стало актуальным применение методов генной инженерии при создании продуцентов для микробиологической промышленности.

Широко распространяются приемы размножения клеточной массы высших растений для производства ценных веществ, например алкалоидов женьшеня и раувольфии. Разрабатываются методы клеточной селекции высших растений. Большое внимание привлекает пока загадочное явление *соматоклональной изменчивости* растений — высокий уровень наследственной изменчивости, наблюдаемый при размножении растений с помощью регенерации из соматических клеток, выращиваемых в культуре.

То, что эти методы обогатят селекцию в ближайшее время, не вызывает сомнения. При этом необходимо помнить, что главным источником успеха в селекции, растениеводстве и животноводстве будет овладение механизмами эволюционного процесса.

Только при этом условии выводимые человеком породы животных и сорта растений смогут успешно противостоять многочисленным естественным врагам.

Вопросы к главе 22

1. Что такое полигены?
2. Чем отличаются подходы к изучению количественных и качественных признаков?
3. В каких случаях эффективен массовый отбор?
4. Укажите положительные и отрицательные стороны инбридинга у домашних животных.
5. В каких случаях возможно закрепление гетерозиса?
6. Почему мужская стерильность оказывается полезной при селекции некоторых культур?
7. Почему триплоидные сорта некоторых видов растений считаются более ценными, чем диплоидные?
8. Каково значение спонтанных и индуцированных мутаций в селекции:
а) высших растений; б) животных; в) микроорганизмов.
9. При каких исследованиях в селекции животных целесообразно пользоваться методом анализа однойцевых двоен?
10. При скрещивании двух чистых родительских линий, различающихся некоторыми размерными характеристиками, в поколении F_1 изменчивость обычно такая же, как у родительских линий, а в F_2 — значительно больше. Почему?
11. Искусственный отбор часто перестает действовать, если используется на протяжении многих поколений. Когда скрещиваются независимо друг от друга отобранные линии, в которых искусственный отбор уже перестал действовать, в потомстве от такого скрещивания отбор вновь оказывается эффективным. Чем можно объяснить это явление?
12. Приведите пример использования метода сбалансированных летелей в селекции.

Приложение

О ПРИРОДЕ ГЕНОВ¹

Т. Х. Морган. Что такое гены?²

Какова природа элементов наследственности, которые Мендель постулировал как чисто теоретические единицы? Что представляют собой гены? Имеем ли мы право, после того как мы локализовали гены в хромосомах, рассматривать их как материальные единицы, как химические тела более высокого порядка, чем молекулы? Откровенно говоря, все эти вопросы очень мало занимали внимание генетиков-экспериментаторов, если не считать тех беспочвенных спекуляций о природе постулируемых единиц, которые время от времени высказывались ими в печати. Среди генетиков нет согласия во взглядах на природу генов, — являются ли они реальными или абстракцией, потому что на уровне, на котором находятся современные генетические опыты, не представляет ни малейшей разницы, является ли ген гипотетической или материальной частицей. В обоих случаях эта единица ассоциирована со специфической хромосомой и может быть локализована там путем чисто генетического анализа. Поэтому если ген представляет собой материальную единицу, то он есть кусочек хромосомы; если же ген — абстрактная категория, то он должен быть отнесен к определенному месту в хромосоме, причем к тому же самому, что и при первой гипотезе. Поэтому в практической генетической работе безразлично, какой точки зрения придерживаться.

Между признаками, которыми оперируют генетики, и генами, которые постулируются их теорией, лежит целое поле эмбрионального развития, в котором присущие генам свойства проявляются в протоплазме клеток. Здесь мы затрагиваем физиологическую проблему, которая является новой и чуждой для классических курсов физиологии.

Мы приписываем генам некоторые общие свойства отчасти на основании генетических данных, отчасти же исходя из микроскопических наблюдений. Мы можем сейчас рассмотреть эти свойства.

Так как хромосомы делятся таким образом, что весь ряд генов расщепляется (каждая дочерняя хромосома получает точно половину исходного ряда), то мы едва ли можем избежать вывода, что гены делятся на точно равные части. Но как это происходит — неизвестно. Аналогия с клеточным делением заставляет предполагать, что и ген делится таким же образом; однако мы не должны забывать, что относительно грубый процесс клеточного деления может оказаться несовершенным для объяснения исключительно точного разделения гена на две равные части. Так как мы не знаем сколько-нибудь сравнимых явлений деления органических молекул, то мы должны, следовательно, быть осторожными в приписывании гену простой молекулярной структуры. С другой стороны, образование в органическом веществе сложной цепи молекул может дать нам со временем возможность лучше представить молекулярную или сложную структуру гена и укажет путь к пониманию способа его деления...

Дж. В. Бидл. Место генетики в современной биологии³

В известном смысле генетика выросла сиротой. Вначале ботаники и зоологи были к ней часто равнодушны, а иногда и враждебны. Нередко говорили: «Генетика имеет дело лишь с внешними признаками». В ее детстве ей мало внимания уделяли также и биохимики. Они, особенно медицинские биохимики, знали

¹ По: И. Гершкович. Генетика. М., 1968.

² «Значение генетики для физиологии и медицины». Нобелевская лекция, 1934.

³ «Гены и химические реакции у нейроспоры». Нобелевская лекция, 1958.

о Гарроде, о врожденных нарушениях обмена и, несомненно, оценили их и с биохимической точки зрения, и как болезни. Но биологический мир был недостаточно подготовлен к тому, чтобы полностью оценить значение исследований Гаррода и его идей. Надо сказать, что и генетики стремились в основном заниматься механизмами передачи генетического материала от поколения к поколению.

К счастью, сейчас ситуация сильно изменилась. Генетика занимает прочное место в современной биологии. Биохимики признают генетический материал неотъемлемой частью изучаемых ими систем. Наши быстро развивающиеся познания об архитектуре белков и нуклеиновых кислот делают возможным — впервые в истории науки — обсуждение генетиками, биохимиками и биофизиками основных проблем биологии на общем языке молекулярной структуры. По моему мнению, это самое ободряющее и важное.

Дж. Д. Уотсон. Пролог¹

Я прибыл в Кембридж осенью 1951 г. Хотя до этого я увлекался главным образом генетикой, Лурия устроил меня на работу к Джону Кендрию. Это было время, когда, разочаровавшись в исследованиях, касающихся фагов, я захотел побольше узнать о подлинных структурах молекул, о которых генетики говорили с такой страстностью. В то же время Джон нуждался в сотруднике и надеялся, что я помогу ему в рентгеноструктурном исследовании миоглобина. Так я стал сотрудником колледжа Клер, а Джон моим руководителем.

Однако почти немедленно после того, как я попал в Кевендишскую лабораторию, я понял, что никогда не могу стать хорошим помощником Джону. Ведь тогда уже начались наши беседы с Френсисом Криком. Возможно, что и без Френсиса миоглобин мне бы быстро наскучил. Но после разговоров с Френсисом моя судьба была решена. Мы быстро поняли, что в биологии мы намереваемся идти одинаковым путем. Центральной проблемой биологии был ген и контролируемый им метаболизм клетки. Главной задачей было понять репликацию гена и путь, которым гены контролируют синтез белков. Было очевидно, что приступить к решению этих проблем можно лишь после того, как станет ясной структура гена. А это означало выяснение структуры ДНК. В то время эта цель казалась генетикам недостижимой. А мы, сидя в нашей темной, холодной Кевендишской лаборатории, думали, что эту работу можно сделать, причем за несколько месяцев. Наш оптимизм был отчасти основан на успехе Лайнуса Полинга, пришедшего к выводу о существовании α -спирали, исходя, главным образом, из законов теоретической химии, так убедительно изложенных в его классической «Природе химической связи». Мы знали также, что Морис Уилкинс располагал рентгенограммами кристаллоподобной ДНК. Следовательно, ДНК должна иметь упорядоченную структуру; таким образом оставалось кому-то получить ответ.

В течение последующих 18 месяцев, до тех пор, пока не прояснилась двуспиральная структура ДНК, мы часто обсуждали неизбежность того, что правильная структура должна обладать способностью саморепликации. Находясь в пессимистическом настроении, мы часто беспокоились, не окажется ли истинная структура «неинтересной»; не будет ли она чем-то инертным, вроде коллагена. Поэтому открытие двойной спирали принесло нам не только радость, но и облегчение. Это было невероятно интересно и сразу позволило нам сделать важное предположение о механизме дубликации генов. Кроме того, наша схема репликации ДНК предусматривала участие вполне понятных обычных химических сил. Ранее некоторые физики-теоретики, среди которых был Паскаль Йордан, предполагали, что многие биологические явления (особенно репликация генов) могут базироваться на еще не открытых силах «дальнего действия», возникающих вследствие резонансных квантово-механических взаимодействий. Полингу очень не нравилось это предположение, и он твердо настаивал на том, что уже познанные силы «ближнего действия» между комплементарными поверхностями могут быть основой биологической репликации.

Установление структуры ДНК подтвердило наше мнение о правильности аргументов Полинга о том, что силы «дальнего действия», или любые другие мистические силы подобного рода, могут и не участвовать в синтезе белка. Однако одно выясне-

¹ «Роль РНК в синтезе белков». Нобелевская лекция, 1962.

ние структуры ДНК не давало в то время никакого представления о процессе репликации белков. Тем не менее, это нас не тревожило, так как предполагалось, что в синтезе белка участвует не ДНК, а РНК.

М. Уилкинс. Как поняли, что генетическим материалом является чистое химическое вещество¹.

Между 1946 и 1950 гг. накопилось много данных, указывающих на то, что генетическим веществом является ДНК, а не белок и не нуклеопротеин. Было открыто, например, что содержание ДНК в наборе хромосом постоянно и что, хотя последовательность нуклеотидов в молекулах ДНК очень сложна, состав ДНК у данного вида тоже постоянен. Было высказано предположение, что генетическая информация содержится в сложной последовательности четырех нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Теперь все признали огромное значение трансформации бактерий, а открытие Херши и Чейз того факта, что фаговая ДНК переносит генетическую информацию вируса от родителя к потомству, помогло завершить этот довольно серьезный переворот в мышлении.

Когда стало известно, что генетическим веществом является ДНК, обладающая в высокой степени упорядоченной химической структурой, а не малоупорядоченный нуклеопротеин, надежда на объяснение генетической функции на основе молекулярной структуры значительно возросла. Многие данные указывали на простоту и регулярность структуры ДНК. Химики показали, что ДНК представляет собой полимер, в полинуклеотидной цепи которого регулярно чередуются связанные 3' — 5'-связями фосфатная группа и дезоксирибоза. Чаргафф открыл важную закономерность: хотя последовательности оснований в полинуклеотидных цепях сложны и состав оснований в разных ДНК сильно различается, в любой ДНК количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина всегда равно количеству цитозина. В электронный микроскоп ДНК была видна как однородная неразветвленная нить с диаметром около 20 Å. Измеряя двойное лучепреломление в потоке, Сингер, Касперссон и Хаммарстен показали, что плоскости оснований в ДНК почти перпендикулярны длине нитевидной молекулы. Проведенные ими измерения ультрафиолетового дихроизма дали тот же результат и показали параллельность расположения оснований ДНК в головках сперматозоидов. Ранее Шмидт и Паттри оптическим методом показали замечательное упорядочение генетического материала в головках спермиев. Первые исследования диффракции рентгеновых лучей на нитях ДНК провел Астбери. Он показал большую упорядоченность ДНК и правильно объяснил сильный рефлекс при 3,4 Å тем, что плоскости оснований уложены в стопку. Проведенное Гулландом и Иорданом исследование методом потенциометрического титрования показало, что основания связаны друг с другом водородными связями, и Гулланд предположил, что полинуклеотидные цепи могут быть связаны этими водородными связями и образовывать таким путем многонитчатые мицеллы.

Таким образом, замечательный вывод о том, что чистое химическое вещество обладает чрезвычайно важной биологической активностью, совпал с углублением разносторонних познаний о природе этого вещества.

А. Корнберг. Подход к воспроизведению ДНК с энзимологической точки зрения²

Хотя Уотсон и Крик и предложили механическую модель воспроизведения ДНК, мы должны поставить перед собой следующий вопрос: каков тот химический механизм, который осуществляет синтез этой супермолекулы в клетке? Около 60 лет назад сбраживание сахара дрожжами считали «жизненным» процессом, неотделимым от живой клетки; однако благодаря открытию Бухнером процесса брожения в экстрактах и благодаря успехам энзимологии в первой половине XX в. мы теперь рассматриваем дрожжевое брожение как определенную, известную нам последовательность химических реакций, составляющих единое целое.

¹ «Молекулярная структура нуклеиновых кислот». Нобелевская лекция, 1962.

² «Биосинтез дезоксирибонуклеиновой кислоты». Нобелевская лекция, 1959.

Пять лет назад синтез ДНК тоже рассматривали как «жизненный» процесс. Некоторые исследователи придерживались тогда того мнения, что биохимики должны исследовать процесс сгорания вещества в клетке, но не вмешиваться в генетический аппарат клетки, поскольку это может привести лишь к путанице. Однако эти мрачные предсказания не подтвердились, так же как не оправдалась пессимистическая точка зрения относительно исследования клеточной структуры и ее специализированной функции.

Я убежден сейчас, как и раньше, что для плодотворного подхода к проблеме биосинтеза нуклеиновых кислот важно понимать механизм биосинтеза простых нуклеотидов и коферментов и хорошо владеть этими данными и связанной с ними методологией. Именно на основании исследований такого рода мы приобрели уверенность в том, что основными биосинтетическими строительными единицами нуклеиновых кислот являются активированные нуклеозид-5'-фосфаты. Как известно, все основные пути биосинтеза пуринов и пиримидинов приводят к образованию нуклеозид-5'-фосфатов; свободные основания или нуклеозиды обычно не образуются, если не считать некоторых специальных случаев. Нам известны также 2'- и 3'-изомеры этих нуклеотидов, однако они, вероятно, образуются в результате каких-то процессов ферментативного распада нуклеиновых кислот. Изучение биосинтеза коферментов, являющихся самыми простыми продуктами конденсации нуклеотидов, показало, что при конденсации аденозинтрифосфата (АТФ) с никотинамидмононуклеотидом образуется дифосфопиридиннуклеотид, с рибофлавинфосфатом — флавинадениндинуклеотид (ФАД), с пантотеинфосфатом — предшественник кофермента А и т. д. Затем были открыты идентичные механизмы активирования жирных кислот и аминокислот, а также показано, что уридиновые, цитидиновые и гуанозиновые коферменты образуются аналогичным образом из соответствующих трифосфатов этих нуклеозидов.

Указанный механизм, в котором нуклеофильное воздействие нуклеозидмонофосфата на активированную пирофосфатную группировку аденилового соединения приводит к образованию кофермента, был принят в качестве рабочей гипотезы для изучения синтеза цепочки ДНК (...) Мы предположили, что основной строительной единицей служит дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат, с которым взаимодействует 3'-гидроксильная группа растущего конца полидезоксирибонуклеотидной цепочки; при этом отщепляется неорганический пирофосфат и цепочка удлиняется на одну единицу. Результаты, полученные нами при исследовании синтеза ДНК (...), согласуются с таким типом реакции.

Список рекомендуемой литературы

Учебники и пособия общего характера:

Актуальные вопросы современной генетики/Под ред. С. И. Алиханяна. Изд. МГУ, 1966.

Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернил Л. С. Общая генетика. М., 1985.

Биологический энциклопедический словарь. М., 1986.

Ватти К. В., Тихомирова М. М. Руководство к практическим занятиям по генетике. М., 1979.

Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев, 1983.

Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Гуляев Г. В. Генетика. М., 1977.

Дубинин Н. П. Генетика. Кишнев, 1985.

Иванов О. А. Генетика. М., 1974.

Лобашев М. Е. Генетика. Изд. ЛГУ, 1967.

Лобашев М. Е., Ватти К. В., Тихомирова М. М. Генетика с основами селекции. М., 1979.

Мюнтцинг А. Генетика общая и прикладная. М., 1967.

Натали В. Ф. Основные вопросы генетики. М., 1967.

Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. Минск, 1978.

Серебровский А. С. Генетический анализ. М., 1970.

Филипченко Ю. А. Генетика. Госиздат, 1929.

Яблоков А. В., Юсуфов А. Г. Эволюционное учение. М., 1981.

Глава 1

Астауров Б. Л., Рокицкий П. Ф. Николай Константинович Кольцов. М., 1975.

Бальдыш Г. М. Посев и всходы. Страницы жизни академика Н. И. Вавилова. М., 1983.

Бобков В. В. Московская школа эволюционной генетики. М., 1985.

Вилкинс М. Молекулярная структура нуклеиновых кислот. Нобелевская лекция, 1962//Приложение IV в кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Ватти К. В. и др. М. Е. Лобашев и проблемы современной генетики. Изд. ЛГУ, 1978.

Володин Б. Г. Боги Грегора Менделя//В кн.: На пути к невероятному. М., 1967.

Выдающиеся советские генетики/Под ред. Д. К. Беляева и В. И. Иванова. М., 1978.

Гайсинович А. Е. Зарождение и развитие генетики. М., 1988.

Медведев Н. Н. Юрий Александрович Филипченко. М., 1978.

Уотсон Дж. Двойная спираль. М., 1969.

Шреддингер Э. Что такое жизнь? М., 1972.

Рейвин А. Эволюция генетики. М., 1967.

Главы 2, 3

Богданов Е. А. Менделизм или теория скрещивания. Книгоиздательство студентов Московского сельскохозяйственного института, 1914.

Гайсинович Л. Е. Зарождение и развитие генетики. М., 1988.

Мендель Г. Опыты над растительными гибридами. М., 1965.

Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973.

Финчем Дж. Генетическая комплементация. М., 1968.

Глава 4

- Босток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. М., 1981.
Де-Робертис Э., Новинский В., Сазс Ф. Биология клетки. М., 1973.
Заварзин А. А., Харазова А. Д. Общая цитология. Изд. ЛГУ, 1983.
Мэзия Д. Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963.
Свенсон К., Узбстер П. Клетка. М., 1980.
Суонсон К., Мерц Т., Янг В. Цитогенетика. М., 1969.
Цитология и генетика мейоза/Под ред. В. В. Хвостовой, Ю. Ф. Богданова. М., 1975.

Глава 5

- Захаров И. А. Генетические карты высших организмов. Л., 1979.
Медведев Н. Н. Беседы по биологии пола. Минск, 1972.
Морган Т. Структурные основы наследственности. Москва — Петроград, 1924.
Морган Т. Значение генетики для физиологии и медицины. Нобелевская лекция, 1934//В кн.: Гершкович И. Генетика. Приложение II. — М.: Мир, 1968.

Глава 6

- Инге-Вечтомов С. Г. Введение в молекулярную генетику. М., 1983.
Конберг А. Биосинтез дезоксирибонуклеиновой кислоты. Нобелевская лекция 1959//В кн.: Гершкович И. Генетика. Приложение V. М., 1968.
Конберг А. Синтез ДНК. М., 1977.
Краевский А. Л., Куханова М. К. Репликация ДНК у эукариот//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 22. — М.: ВИНТИ, 1986.
Ратнер В. А. Молекулярная генетика: принципы и механизмы. Новосибирск, 1983.
Смит К., Хэнзолт Ф. Молекулярная фотобиология. М., 1972.
Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. М., 1981.
Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М., 1978.

Глава 7

- Горденин Д. А., Кваша В. В. Внутригенная рекомбинация и методы построения генных карт у грибов//В сб.: Исследования по генетике. Вып. 7. Изд. ЛГУ, 1976.
Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. М., 1985.
Кушев В. В. Механизмы генетической рекомбинации. Л., 1971.

Глава 8

- Генетические коллекции микроорганизмов/Под ред. С. Г. Инге-Вечтомова//Итоги науки и техники. Сер.: Общие проблемы биологии. Т. 1. Модели и объекты биологических исследований. — М.: ВИНТИ, 1982.
Генетические коллекции растений/Под ред. Н. В. Глотова//Итоги науки и техники. Сер.: Общие проблемы биологии. Т. 2. Модели и объекты биологических исследований. — М.: ВИНТИ, 1983.
Генетические коллекции животных/Под ред. Н. В. Глотова//Итоги науки и техники. Сер.: Общие проблемы биологии. Т. 3. Модели и объекты биологических исследований. — М.: ВИНТИ, 1984.
Захаров И. А. Курс генетики микроорганизмов. Минск, 1978.
Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. Сб. методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л., 1984.
Левитин М. М., Федорова И. В. Генетика фитопатогенных грибов. Л., 1972.
Медведев Н. Н. Практическая генетика. М., 1968.
Проблемы генетики в исследованиях на дрозофиле/Под ред. В. В. Хвостовой, Л. И. Корочкина, М. Д. Голубовского. Новосибирск, 1977.
Райков И. Б. Ядро простейших. Морфология и эволюция. Л., 1978.
Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М., 1975.
Уильямс У. Генетические основы и селекция растений. М., 1968.
Фадеева Т. С., Соснихина С. П., Иркаева Н. М. Сравнительная генетика растений. Изд. ЛГУ, 1980.
Юдин А. Л. Ядерно-цитоплазматические взаимоотношения и клеточная наследственность у амёб. Л., 1982.

Глава 9

- Брода П.* Плазмиды. М., 1982.
- Генетические коллекции микроорганизмов/*Под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. Сер.: Общие проблемы биологии//Итоги науки и техники. Т. 1. Модели и объекты биологических исследований. — М.: ВИНТИ, 1982.
- Глазер В. М., Каменева С. В., Митронова Т. Н.* Большой практикум по генетике микроорганизмов. Изд. МГУ, 1977.
- Захаров И. А.* Курс генетики микроорганизмов. Минск, 1978.
- Захаров И. А., Мацелюх Б. П.* Генетические карты микроорганизмов. Киев, 1986.
- Ледерберг Дж.* Обзор генетики. Нобелевская лекция, 1959//В кн.: Гершкович И. Генетика. Приложение VIII. М., 1968.
- Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
- Скавронская Л. Г.* Теоретические и экспериментальные основы генетического анализа бактерий. М., 1976.
- Фаг лямбда/*Под ред. А. Херши. М., 1975.
- Френкель-Конрат Х.* Химия и биология вирусов. М., 1972.

Глава 10

- Бил Дж., Ноуз Дж.* Внеядерная наследственность. М., 1981.
- Джинкс Дж.* Нехромосомная наследственность. М., 1966.
- Молекулярная генетика митохондрий/*Под ред. С. А. Нейфаха, А. С. Трошина. Л., 1977.
- Сэджер Р.* Цитоплазматические гены и органеллы. М., 1975.
- Хагеман Р.* Плазматическая наследственность. М., 1962.
- Хесин Р. Б.* Непостоянство генома. М., 1984.
- Шугалий А. В.* Организация митохондриального генома//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 19. — М.: ВИНТИ, 1982.

Глава 11

- Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. Киев, 1982.
- Генетическая инженерия/*Под ред. А. А. Баева//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 12. Ч. 1, 1979, Ч. 2. — М.: ВИНТИ, 1980.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М., 1984.
- Матвиенко Н. И.* Методы генной инженерии//Итоги науки и техники. Микробиология. Т. 10. — М.: ВИНТИ, 1979.
- Пирузян Э. С., Андрианов В. М.* Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
- Рингерц Н., Сэвидж Р.* Гибридные клетки. М., 1979.
- Рыбчин В. Н.* Основы генетической инженерии. Минск, 1986.
- Щелкунов С. Н.* Клонирование генов. Новосибирск, 1986.
- Эфрусси Б.* Гибридизация соматических клеток. М., 1976.

Глава 12

- Ауэрбах Ш.* Проблемы мутагенеза. М., 1978.
- Вавилов Н. И.* Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Л., 1987.
- Жестяников В. Д.* Генетика репарационных процессов у микроорганизмов//Итоги науки и техники. Микробиология. Т. 15. Генетика микроорганизмов. — М.: ВИНТИ, 1985.
- Лобашев М. Е.* Физиологическая гипотеза мутационного процесса//В кн.: Исследования по генетике. Вып. 6. Изд. ЛГУ, 1976.
- Мёллер Г.* Образование мутаций. Нобелевская лекция. 1946//Приложение III в кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.
- Надсон Г. А., Филиппов Г. С.* О влиянии рентгеновских лучей на половой процесс и образование мутантов у низших грибов (Mycogaceae)//В кн.: Классики советской генетики. Л., 1968.

Рапорт И. А., Шихаева М. Х., Ахматуллина Н. Б. Химический мутагенез: проблемы и перспективы. Алма-Ата, 1980.

Сойфер В. Н. Молекулярные механизмы мутагенеза. М., 1969.

Томилин Н. В. Генетическая стабильность клетки. Л., 1983.

Глава 13

Грант В. Видообразование у растений. М., 1984.

Ильин Ю. В. Мобильные диспергированные гены эукариот//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 18. — М.: ВИНТИ, 1982.

Константинов А. В. Цитогенетика. Минск, 1971.

Моррис Е. Р., Сирс Э. Р. Цитогенетика пшеницы и родственных форм//В кн.: Пшеница и ее улучшение. М., 1970.

Родс М. Цитогенетика кукурузы//В кн.: Кукуруза и ее улучшение. М., 1957.

Серебровский А. С. О новом возможном методе борьбы с вредными насекомыми//В сб.: Классики советской генетики. Л., 1968.

Суонсон К., Мерц Т., Янг У. Цитогенетика. М., 1969.

Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1984.

Эллиот Ф. Селекция растений и цитогенетика. М., 1968.

Глава 14

Астауров Б. Л. Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. М., 1977.

Карпеченко Г. Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* × *Brassica alarcea*//В кн.: Классики советской генетики. Л., 1968.

Константинов А. В. Цитогенетика. Минск, 1971.

Полиплоидия. Сборник статей. М., 1956.

Полиплоидия у растений//Тр. МОИП. Т. V. М., 1962.

Савченко В. К. Генетика полиплоидных популяций. Минск, 1976.

Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В. Гаплоидия и селекция. М., 1976.

Глава 15

Бидл Дж. В. Гены и химические реакции у нейроспоры. Нобелевская лекция, 1958. Приложение VI в кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. М., 1980.

Гены эукариот//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 19. — М.: ВИНТИ, 1982.

Инге-Вечтомов С. Г. Введение в молекулярную генетику. М., 1983.

Ичас М. Биологический код. М., 1971.

Крик Ф. К вопросу о генетическом коде. Нобелевская лекция, 1962. Приложение X//В кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Молекулярная генетика//Сб. переводов под ред. И. Л. Кнунянца, С. И. Алиханяна. М., 1963.

Морган Т. Г. Теория гена. — Л.: Сеятель, 1927.

Ратнер В. А. Молекулярная генетика: принципы и механизмы. Новосибирск, 1983.

Серебровский А. С., Дубинин Н. П. Искусственное получение мутаций и проблема гена//В кн.: Классики советской генетики. Л., 1968.

Спирин А. С. Структура рибосом и биосинтез белка. Научный центр биологических исследований. Пущино, 1984.

Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. М., 1981.

Структурная организация и функция генома эукариот//Итоги науки и техники. Биологическая химия. Т. 16. — М.: ВИНТИ, 1982.

Татум Э. Л. История одного биологического исследования. Нобелевская лекция, 1958. Приложение VII//В кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Уотсон Дж. Роль РНК в синтезе белков. Нобелевская лекция, 1962. Приложение IX//В кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М., 1978.

Глава 16

Генетика развития животных//Итоги науки и техники. Общая генетика. Т. 6. — М.: ВИНТИ, 1979.

Гердон Дж. Регуляция генов в развитии животных. М., 1977.

Грен Э. Я. Регуляторные механизмы репликации РНК-содержащих бактериофагов. Рига, 1974.

Жакоб Ф. Генетика бактериальной клетки. Нобелевская лекция, 1965. Приложение XI//В кн.: Гершкович И. Генетика. М., 1968.

Корочкин Л. И. Взаимодействие генов в развитии. М., 1977.

Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития. М., 1977.

Нейфах А. А., Лозовская Е. Р. Гены и развитие организма. М., 1984.

Регуляция активности генов у бактерий//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 13. — М.: ВИНТИ, 1977.

Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция. М., 1986.

Сойдла Т. Р. Оперон//В кн.: Инге-Вечтомов С. Г. Введение в молекулярную генетику. М., 1983.

Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. М., 1978.

Глава 17

Бляхер Л. Я. Проблема наследования приобретенных признаков. М., 1971.

Лозовская Е. Р., Евгеньев М. Б. Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 20. — М.: ВИНТИ, 1984.

Филипченко Ю. А. Изменчивость и методы ее изучения. М., 1978.

Шмальгаузен И. И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. М., 1982.

Глава 18

Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. М., 1984.

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М., 1983.

Грант В. Эволюция организмов. М., 1980.

Дарвин Ч. Происхождение видов. М., Л., 1935.

Левонгин Р. Генетические основы эволюции. М., 1978.

Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М., 1974.

Медников Б. М. Дарвинизм в XX веке. М., 1975.

Солбриг О., Солбриг Д. Популяционная биология и эволюция. М., 1982.

Тимофеев-Ресовский Н. В., Яблоков А. В., Глозов Н. В. Очерк учения о популяции. М., 1973.

Четвериков С. С. Проблемы общей биологии и генетики. Новосибирск, 1983.

Шмальгаузен И. И. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. М., 1968.

Глава 19

Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М., 1985.

Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М., 1973.

Ратнер В. А., Жарких А. А., Колчанов Н. А., Родин С. Н., Соловьев В. В., Ша-мин В. В. Проблемы теории молекулярной эволюции. Новосибирск, 1985.

Структура и эволюция геномов//Итоги науки и техники. Молекулярная биология. Т. 2. — М.: ВИНТИ, 1985.

Эволюция генома/Под ред. Г. Доувера., Р. М. Флейвелла. М., 1986.

Глава 20

Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика. М., 1984.

Мак-Кьюсик В. Генетика человека. — М.: Мир, 1967.

Основы цитогенетики человека/Под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской. М., 1969.

Справочник по клинической генетике/Под ред. Л. О. Бадаляна. М., 1971.

Стивенсон А., Дэвидсон Б. Медико-генетическое консультирование. М., 1972.
Тосиюки Я. и др. Биохимия наследственности. М., 1979.
Эфроимсон В. П. Введение в медицинскую генетику. М., 1964.

Глава 21

Алекперов У. К. Антимутагены и проблемы защиты генетического аппарата. Баку, 1979.
Бочков Н. П., Захаров А. Ф., Иванов В. И. Медицинская генетика. М., 1984.
Генетические последствия загрязнения окружающей среды/Под ред. Н. П. Дубинина. М., 1977.
Гончарова Р. И. Антимутагенез. Минск, 1974.
Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М., 1978.
Моссэ И. Б. Проблема химической защиты в радиационной генетике. Минск, 1974.

Глава 22

Бороевич С. Принципы и методы селекции растений. М., 1984.
Бриггс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений. М., 1972.
Вавилов Н. И. Пути советской селекции//В сб.: Классики советской генетики. Л., 1968.
Гаплоидия и селекция/Под ред. В. А. Крупнова. М., 1976.
Левитский Г. А. Цитологический метод в селекции//В сб.: Классики советской генетики. Л., 1968.
Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М., 1985.
Теория отбора в популяциях растений/Под ред. Л. В. Хотылевой, З. С. Никоро, В. А. Драговцева. Новосибирск, 1976.
Уильямс У. Генетические основы и селекция растений. М., 1968.
Фолконер Д. С. Введение в генетику количественных признаков. М., 1985.
Харт Ф. Генетика животных. М., 1969.

Именной указатель

- Алиханян С. И. 4, 564
Аллисон А. 511
Алтухов Ю. П. 463, 465
Альбертс Б. 130
Андерсон Т. 115, 151, 152, 201
Арбер В. 222
Аристотель 9, 280
Астауров Б. Л. 181, 349, 447
Астрачан Ф. 383
Ауэрбах Ш. 294
Баев А. А. 288
Байер 59
Балкашина Е. П. 460
Бальбиани Е. 67
Барнетт Л. 391
Баур Э. 225
Беллинг Дж. 148, 158, 362
Ван Бенеден Е. 10, 11, 55
Блексли А. 362
Беляев Д. К. 52, 451, 470
Беквит Дж. 268
Белозерский А. Н. 18
Бензер С. 375, 444
Бертани Г. 222
Бидл Дж. 14, 374, 566
Бовери Т. 11, 59, 86, 225, 540
Бородин П. М. 451
Бороевич С. 547
фон Борстел Р. 309, 314
Бочков Н. П. 499, 509, 512, 521, 538, 539
Бреннер С. 391, 400
Бриджес К. 13, 90, 91, 92, 93, 145, 148, 151, 152
Бутенко Р. Г. 263
Бэтсон У. 7, 10, 30, 96, 292, 455
Вавилов Н. И. 13, 21, 292, 484, 546
Вайнберг В. 455, 458, 459
Вальдейер В. 11, 55
Ватти К. В. 296
Вейсман А. 3, 12, 74, 440
Викар Г. 522, 523
Вильсон Э. 55
Винге О. 361
Винклер Х. 148, 157
Вирхов Р. 55
Висконти Н. 219
Виттман Х. 394
Волкин Э. 383
Вольман Е. 204
Вуд У. 423
Гальтон Ф. 9, 501
Гарен А. 400
Гарсиа-Беллидо А. 498
Гаузе Г. Ф. 452
Гвоздев В. А. 252, 341
Гейзер Л. 11
Гердон Дж. 412
Георгиев Г. П. 252
Гертвиг О. 10, 11, 55
Гершензон С. М. 4, 294, 460, 502, 530
Гилберт У. 484
Гиньяр Л. 11
Гиппократ 8, 9
Гирер А. 119
Глеба Ю. Ю. 261
Глотов Н. В. 449
Говард-Фландерс П. 138
Горденин Д. А. 403
Горини Л. 444, 448
Госс Дж. 9
Грин М. 374
Гриффит Ф. 113
Гудков А. В. 197
Горожанкин Н. Н. 10
Гоффман 9
Густафссон А. 558, 562
Давиденков С. Н. 497
Дарвин Ч. 9, 21, 438, 454, 455, 551
Даревский И. С. 180
Дарлингтон С. 145, 170
Даскалов С. 559
Девенпорт Г. 559
Дельбрюк М. 219, 295, 298
Демокрит 19
Дженкин Ф. 455
Джеон К. 249
Джонс Д. 559
Джукс Т. 488
Добжанский Ф. Г. 4, 20, 109, 454, 461, 510
Догель В. А. 481
Дрейк Дж. 315
Дриш Г. 409
Дубинин Н. П. 4, 373, 471, 497, 528
Еголина Н. А. 536
Жакоб Ф. 204, 415, 476, 479
Заварзин А. А. 292
Захаров И. А. 4, 245, 314
Захаров А. Ф. 499, 509, 512, 536, 539
Зильбер Л. А. 540
Зиндер Н. 209
Ильинских Н. Н. 530
Ингрэм Дж. 199
Иоганнсен В. 30, 292, 370, 439, 455, 555
Иолос В. 445
Кайданов Л. З. 341, 552
Камилова Т. О. 166
Карпеченко Г. Д. 14, 360, 361

Кейфер Г. 189
Кельрейтер И. Г. 9, 19, 557
Керкис Ю. Я. 530
Кимура М. 488, 490
Кинг Дж. 488
Кольцов Н. К. 14, 112, 113
Корана Г. 9, 270, 394
Коржинский С. И. 12, 291
Корнберг А. 127, 130
Корнберг Т. 127
Корогодин В. И. 132
Корренс К. 10, 11, 94, 225
Крейтон Х. 145, 148
Крик Ф. 14, 16, 122, 125, 162, 309, 385
Кэйрнс Дж. 204
Кэмпбелл А. 213
Кюэно Л. 10
Ламарк Ж. Б. 438
Ларионов В. Л. 252
Ледерберг Дж. 199, 245
Ледерберг Э. 158, 212
Лежен Ж. 518
Леннокс Е. 210
Линдерген К. 157
Лобашов М. Е. 4, 5, 294, 296, 497, 500, 526
Лон Р. 522, 523
Лотси Ж. 455
Лурия С. 222, 298
Лучникова Е. М. 166
Льюис Е. 374, 379
Мазер Г. 109, 357, 359
Майер Э. 472
Мак-Леод К. 14, 114
Мак-Карти М. 14, 114
МакКлинток Б. 145, 148, 337
Маньи К. 314
Марголиаш Е. 486
Маттей Дж. 394
Мезельсон М. 122, 123, 125, 136, 148
Мейсель М. Н. 294
Мейстер Г. К. 561
Меллер Дж. 13, 294, 526
Мендель Г. 8, 9, 10, 11, 17, 18, 19, 39, 144, 178, 181, 455
Мерриам Дж. 428
Меррил Дж. 523
Мессинг Дж. 285
Минамори С. 251
Мирский А. 118
Моно Ж. 415, 479
Морган Л. В. 92
Морган Т. Х. 12, 86, 97, 371, 526
Морзе М. 212
Мортимер Р. 157
Навашин С. Г. 177
Надсон Г. А. 13, 294
Найт Т. Э. 9
Нильссон-Тилгрэн Т. 260
Нильссон-Эле З. 49, 549
Ниренберг М. 394
Новик А. 315
Новиков С. Н. 451
Нэгели К. 180, 438
Оказаки Р. 128
Оливер К. 374
Осипов Д. В. 249
Очоа С. 394
Пайнтер Т. 68
Пауэр Дж. 263
Пеннет Р. 40, 96, 458
Петтиджон Д. 136
Писарев В. Е. 561
Планта Р. 252
Полинг Л. 488
Понтекорво Г. 189
Рабль К. 11
Райан Ф. 315
Райт Р. 245
Райт С. 471
Раппопорт И. А. 294, 325, 443, 562
Рапп У. 138
Ратнер В. А. 491
Резник М. 448
Рис Х. 118
Ритосса Ф. 446
Рич А. 17
Робсон Дж. 294
Робертсон У. Р. 334
Родс М. 232
Рокитский П. Ф. 3, 460
Ромашов Д. Д. 460, 471
Ру В. 10, 55, 409
Руперт К. 132
Сажрэ О. 10
Сахаров В. В. 294, 526, 560
Свердлов Е. Д. 284
Серавин Л. Н. 197
Серебровский А. С. 3, 13, 334, 343, 372, 554
Сидоров Б. Н. 335
Синг Л. 435
Смирнов В. Г. 308, 554
Смирнов Ф. А. 294
Смит Е. 280
Сойдла Т. Р. 493
Соколов Н. Н. 331
Солбриг О. 468, 469, 497
Соснихина С. П. 308
Спирин А. С. 388, 415
Стадлер Дж. 13, 294
Стент Г. 122, 414
Сталь Ф. 122, 123, 125, 136
Стейниер Р. 199
Стертевант А. 12, 100, 188, 322, 335, 428
Стивенсон А. 513
Стразерн Дж. 431
Страсбургер Б. 10, 55
Струнников В. А. 181, 560, 562
Сциллард Л. 315
Сэджер Р. 230
Сэттон У. 12, 74, 86, 96

Ганяшин В. И. 272
Гаундсен К. 280
Тернер Дж. 516
Тимофеев-Ресовский Н. В. 17, 53, 295, 296
Тихомирова М. М. 296, 449
Тонегава С. 434
Троу 188
Тэйлор Дж. 125, 149, 152, 153
Уилкинс М. 14
Уильямс Р. 421
Уиниуртер 68
Уоллес А. 455
Уотсон Дж. 14, 16, 122, 125, 162, 309, 389
Уоттс-Тобин Р. 391
Уэйгл Дж. 148, 222, 313
Фаминцын А. С. 250
Федоров В. С. 560
Филиппов Г. С. 13, 294
Филипченко Ю. А. 3, 5, 13, 50, 455
Фитч У. 486
Фишер Р. А. 357, 467, 471
Флемминг В. 19, 11, 55
Франклин Р. 14
Френкель-Конрат Г. 119, 421
де Фриз Г. 10, 11, 291, 334, 455
Фогель С. 157
Фоке В. 178
Фоуэлл Р. 245
Хаджинов М. И. 232
Харди Х. 455, 458, 459
Хейс У. 201
Херсковиц А. 431
Херст Д. 157
Херши А. 116, 118, 158, 377
Хесин Р. Б. 345, 382
Хикс Дж. 431
Хогланд М. 385
Хогнесс Д. 252
Холдейн Дж. 97, 187, 188
Хота И. 164
Холлидей Р. 160, 164, 448
Хромов-Борисов Н. Н. 299
Хэнзуолт Ф. 131, 136
Цапыгина Р. И. 451
Циммер К. 295
Цицин Н. В. 561
Цукеркандл Э. 488
Чаргафф Э. 14, 118
Чермак Э. 10, 11
Чейз М. 116, 118, 377
Чеймп С. 444
Четвериков С. С. 14, 52, 459, 460, 466
Човник А. 331
Шапвиль Ф. 385
Шапиро Н. И. 315
Шванн Т. 10
Шелл Дж. 581
Шенк Х. 263
Шерешевский Н. А. 516
Шлейден М. 10
Шмальгаузен И. И. 451, 470
Штерн К. 146, 148, 155, 511
Шулындин А. Ф. 561
Эвери О. 14, 114
Эдельберг Э. 199
Эймз Б. 533
Эмерсон С. 153
Эпикур 19
фон Эренштейн Г. 385
Эфрусси Б. 241
Юдин А. Л. 197
Яновский Ч. 389, 419
Янсенс Ф. 145

Предметный указатель

- Автогамия 193
Автономизация генов 483
Автополиплоидия 438, 560
Адаптация онтогенетическая 449
Адаптивный ответ 443
Адаптор 385
Аддитивности правило 102
Азотистая кислота 295, 309
Азотистый иприт 294
Акридины 295, 391
Активатор (у кукурузы) 337
Активатор катаболизма (белок-рецептор с АМР он же САР) 421
Активация аминокислот 385
— промутагенов 532
Актиномицин 530
Алкаптонурия 513
Алкилирующие соединения (агенты) 295, 529
Алкогольдегидрогеназа 282, 555, 559
Аллелизм множественный 34
Аллелизма критерии 371
Аллель (аллеломорф) 30
Аллополиплоидия 347, 360, 561
Аллостерический центр 415
Альбинизм 513
Альцгеймера болезнь 513
Амбер-кодон 400
Аминоациладенилат 385
Аминоацилирование тРНК 385
Аминоацильный центр (А-центр) 397
Аминогликозидные антибиотики 402, 444
Аминоптерин 530
2-Аминопурин 309
Амниотическая жидкость 521
Амниоцентез 521
Амплификации 321, 325
Амфиплоиды 360
Амфимиксис 180
Аналоги оснований 295
Андрогенез 181
Анемия Фанкони 516
Анизогамия 175
Антигены 433
Антигемофильный глобулин 498, 499
Антикодон 386
Антимутатор 311
Антимутагенез 542
Антиподы 177
Антитела 433
Анэуплоидия 347, 362
Апомиксис 180
Арилгидрокарбонгидроксилаза 543
Ароматические аминокислоты 479
Архебактерии 483
Ассортативное скрещивание 467
Атаксия — телеангиэктазия (синдром Луи Бар) 516
Аттенюация 419
Ауксотроф 183
Аутбридинг 555, 557
Аутосомы 93
Афлатоксин 530, 531, 533
Ахондроплазия 498, 499, 500, 511, 512
Бактериофаги 209, 216, 221
— вирулентные 209—211
— умеренные 209—213
Бальбиани кольца 413
Банки генов 275
Барра тельца 436, 504
Белковая инженерия 561
Бенз(а)пирен 533
Бета-пропиолактон 526
Биваленты 70
Бластогенные изменения 440
Бластодерма 425
Близкородственные браки 496, 511
Близнецовый метод 500, 501
Близнецы однояйцевые (идентичные или монозиготные) 500—502, 504
— разнаяйцевые 500, 501
Болезни обмена веществ 513, 514
Брахидактилия 498
5-Бромдезоксисуридин (БДУ) 536
Бромистый этидий 256
5-Бромурацил 309
Вегетативное ядро (макронуклеус) 193
Векторы 267—269
Винбластин 348
Вирусы везикулярного стоматита 251
— гепатита 530
— гриппа 530
— оспы, кори, ветряной оспы 530
— Сендай 261
— табачной мозаики 119, 394
— эпидемического паротита 530
Вирусная наследственность 250
Вирусно-генетическая теория рака 540
Вторичные перетяжки 64
Волны жизни 472

- Восстановители фертильности 234
 Вставки-мутации 308
 Выпадения-мутации 308
- «Габсбургская губа» 498
 Галактоземия 521
 Гаметофит 175
 Гаплоидизация 189
 Гаплоидия 368
 Гель-электрофорез 461
 Гемизигота 90
 Гемоглобин 487, 490, 514, 515
 Гемоглобинопатии (болезни гемоглобина) 514—515
 Гемофилия 498, 499, 512, 522
 Ген(ы) 30, 370
 — гипостатический 48
 — кластер 481
 — модификатор 50
 — мозаичный 405, 482
 — перекрывающиеся 404, 478, 482
 — регулятор 417
 — сильный 549
 — слабый 549
 — структурный 374
 — супрессор (ингибитор) 48, 400
 Генеалогический метод 498, 500, 507
 Генетики методы 17—18
 Генетическая активность (факторов среды) 526, 527
 Генетическая колонизация 281
 — опасность 526
 — революция 472
 — система 170
 — токсикология 526
 Генетические факторы изоляции 474
 Генетический груз 511, 526
 Генетический материал 257
 — свойства 258
 Генетическое нерасхождение 357
 Генов слияние и разделение 492
 Генная инженерия 221, 267
 Генокопии 452
 Геном 347
 Геномный анализ 361
 Генотерапия 523
 Генотип 27, 30
 Генофонд 466
 Ген-фермент, системы 374
 Гетероаллели 403
 Гетероаллельная комбинация (компунд) 36, 372
 Гетерогенота 212
 Гетеродуплекс 160
 Гетерозигота 25
 Гетерозиготность 464
 — ожидаемая 465
 Гетерозис 234, 460, 557—559
 Гетерокарион 183
 Гетероплоидия 461
- Гетерохроматин 64
 Гибридизация: ДНК-ДНК 126
 — ДНК-РНК 277
 — соматических клеток 261, 505
 Гибридный дисгенез 255
 Гибридомы 264
 Гикантон 530
 Гидроксиламин 295
 6-Гидроксиламинопурин 533
 Гинандроморф(ы) 91, 427
 Гиногенез 181
 Гистидиновый оперон 477, 533
 Гомеологическое спаривание 325
 Гомологических рядов в наследственной изменчивости закон 292, 484
 Гомологичные белки 484
 Глушители 424, 494
 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 543
 Глюкокортикоиды 543
 Голандрическое наследование 94
 Гомеодомен 426
 Гомеологичные хромосомы 362
 Гомозигота 25
 Группа сцепления 102
 Группы крови АВО (у человека) 507
 Гуанидингидрохлорид 256
- Двойная редукция 357
 Двойное оплодотворение 177
 Дегидрогеназы НАД-зависимые 492
 Дезоксирибонуклеотидфосфолиаза 132
 Делеция 318, 319, 343
 Детерминация 424
 Дефишенси 318—320
 Диаминоакридин 314
 Дигетерозигота 39
 Дигидрофолатредуктаза 282, 325
 5'-дидезоксинуклеозидтрифосфат 387
 Диоксин 529
 Дискордантность 501
 Диссоциатор (у кукурузы) 337
 Дитип неродительский 186
 — родительский 186
 Дифференцировка 424
 — лимфоцитов 344
 2,4-Дихлорофеноуксусная (2,4-Д) 529
 Диэпоксиоктан 335
 Диэтилсульфат 526
 ДНК
 — ведущая (лидирующая) цепь 428
 — запаздывающая цепь 128
 — кДНК 271
 — Т-ДНК 280
 — Z-ДНК 143
 — ДНК-зависимая РНК-полимераза 130, 381, 382
 — ДНК-зонды 271, 463
 — ДНК-лигаза 128, 130
 — ДНК-полимеразы 130, 478, 492, 516
 — корректорская функция 128

- рекомбинантная 268
- синтез внеплановый 137
- непопуляционный 136
- «эгоистическая» 477
- Домен 37, 484, 492, 493
- Доминирование (локальное) 37
 - внутримолекулярное 24
 - неполное 27
 - полное 27
- Доминирования теория (гетерозиса) 559
- Донор (при конъюгации бактерий) 201—202
- Дополненные (замещенные) по хромосомам формы 561
- Дрейф генов (генетико-автоматические процессы) 467, 471
- Дрейф нейтральных мутаций 488
- Дробовика метод 287
- Дубликации 318, 321, 343
- Дуплекс 356

- Евгеника 524

- Злокачественные новообразования 540

- Идиограмма 64
- Изменчивость 291, 438
 - комбинативная 290
 - модификационная (ненаследственная фенотипическая) 291, 438, 439
 - мутационная 290
 - наследственная 290
 - неопределенная 438
 - онтогенетическая 291
 - определенная 438
 - паратипическая 550
 - полигенная 549
 - соматическая 561
- Изозимы 461
- Изоляция 474
- β -Изопропиламин дегидрогеназа 277
- Имагинальные диски 425
- Иммигранты 471
- Иммуногенетика 433
- Иммуноглобулины 433—435
- Иммунологический стресс 530
- Импринтинг 497
- Инбредная депрессия 473, 556
- Инбридинг 472, 473, 553, 555
- Инбридинга коэффициент 473, 556
- Инверсии 318, 326, 343
 - парацентрические 326, 329
 - перцентрические 326, 328
- Ингибирование конечным продуктом 415
- Индолилуксусная кислота 280
- Индукция (ферментов) 417, 418
- Индукция бактериофага 209
- Инициация репликации 127, 130
 - транскрипции 381
 - трансляции 397
- Инсерции (вставные последовательности, IS-элементы) 318, 338
- Инсулин 271, 487
- Интеграза 214
- Интерсексы 94
- Интрон 405
- Интрон-экзонная структура генов 405, 482
- Интерференция 102
 - отрицательная 103
 - положительная 103
 - хиазмная 154
 - хроматидная 154
 - хромосомная 154
- Информосомы 415
- Информационная РНК 385
- Инцизия 134
- Инцухт 553

- Камфора 348
- Канцерогенность 533, 539, 540
- Канцеростатики 530
- Капса-частицы 274
- Кариокинез (митоз) 55
- Кариопласты 267
- Кариотип 64
 - дрожжи 87
- Картирование зачатков бластомеры 428
- Каскадная регуляция 424
- Кассетный механизм 431
- Катающегося кольца механизм репликации 207
- Квадриплекс 356
- Кислая фосфатаза 325, 555
- Клеверного листа модель тРНК 386
- Клеточный тип дрожжей 431
- Клонирование 74
 - генов 272—274
- Коварионы 486—487
- Код генетический 389, 393, 395
 - вырожденный 395
 - неперекрывающийся 393
 - триплетный 395
 - квазиуниверсальный 399
- Кодон 386
- Кодоминирование 33
- Коинциденция 102
- Коконверсия (совместная конверсия) 159, 162
- Коллинеарность (ген-полипептид) 389
- Количественные признаки 292, 548—551
- Колхицин 61, 325, 348
- Кольцевые пермутации 220
- Компартментализация 57
- Компаунд (гетероаллельная комбинация) 37, 372

- Компенсаторные комплексы 560
 Компенсация дозы 436
 Компетентность 207
 Комплементарность
 — генов 44
 — молекул 407
 Конвариантная редупликация 258
 Конверсия 148, 157—165
 — направленная 431
 Конкатемеры 220
 Конкордантность 501
 Концевая избыточность 220
 Конъюгативные плазмиды 205, 280
 Конъюгация 193, 199
 — у бактерий 199
 — у простейших 193
 Корепрессор 418
 Корончатый галл 280
 Короткопалость 498
 Коррекция (оснований ДНК) 162
 Кортекс 172
 Котрансдукция 216
 «Кошмар Дженкина» 455
 Ксении 178
 Крисс-кросс наследование 87
 Кроссбридинг 555
 Кроссинговер 98, 100
 — двойной 102, 153
 — механизм разрыв — воссоединение 145, 149, 152, 160
 — митотический 155, 189
 — неравный 322
 Кэп, кэпирование 406
- Лактозный оперон 477
 Ламповые щётки 70
 Лейкоциты (культура) 504
 Летали сбалансированные 305, 562, 563
 Лидерный пептид 522
 Лидерный участок 419
 Лизогения 209
 Лимфоциты 433
 Линкеры 274
 Липкие концы 269
 Литическая реакция 209
 Локальное неспаривание оснований 162
- Макронуклеус (ядро вегетативное) 193
 Макроэволюция 455
 Максама — Гилберта метод секвенирования 284
 Малярия 511
 Материнский эффект 254
 Матрица (для полимеризации ДНК) 127
 Матричные процессы 380
 Мегаспора 175
 Медико-генетическое консультирование 523
 Медулла 172
- Межаллельная комплементарность 37
 Мейоз 68—74
 — генетический контроль 80—84
 — одноступенчатый 197
 Мейотический эффект 314
 Менделевская популяция 456—459
 Менделя законы 24, 25, 39
 Мерозигота 214
 Метаболическая активация промутагенов 531, 533
 Метасамки 94
 Метасамцы 94
 Метатрексат 282, 325
 Метилметансульфонат 295
 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) 543
 Миграция (поток генов) 467, 471
 Мигрирующие элементы 251, 337
 Миелома 433
 Микронуклеус (ядро генеративное) 193
 Микропиле 176
 Микросомная фракция 532
 Микроспора 175
 Микроэволюция 455
 Митоз (кариокinesis) 55
 Митохондрий генетика 236
 Множественные диспергированные гены 252, 339
 Модификации 221
 — адаптивные 443
 — длительные 444
 — нерегулярные 488
 — неспецифические адаптивные 221, 447
 Модулятор 414
 Мозаики 348
 Мониторинг 538
 Молекулярные болезни 513, 514
 Молекулярные часы (эволюции) 488
 Моноклональные антитела 264
 Моносомик(и) 362, 576
 Морфозы 433
 Мосты и фрагменты 343
 Мультипликация 321
 Мутагены эталонные 533
 Мутант(ы) 61
 — petite 238
 — вегетативные 239
 — генеративные 239
 — конститутивные 417
 — суперпродуценты 419
 — условно-летальные 62, 444
 Мутатор 310
 Мутации 467
 — биохимические 374
 — внутригенные супрессорные 392
 — гомеозисные 425
 — индуцированные 295
 — rho⁻ 240
 — roky 242
 — спонтанные 295—296

Мутации с условным проявлением 381
— полярные 417
— точковые 308
— цис-доминантные 417
Мутаций методы учета 93
— double yellow 93, 305
— Меллер-5 303
— в аутосомах дрозофилы 305
Мутационная теория 291
Мутационное давление 470
Мутон 379

Наследование

— нехромосомное (цитоплазматическое) 225
— по материнскому типу 229
— по отцовскому типу 229
Наследуемости коэффициент 550
Наследуемость реализованная 550
Несовместимость 183, 185, 179, 554
Негативной регуляции
— индуцибельная схема 418, 419
— репрессибельная схема 418, 419
Неоднозначного соответствия правило 398
Нерасхождение хромосом 92
Нередуцированные споры 384
Нитратредуктаза 448
Нитриты 529
Нитрозосоединения 529, 533
Нонсенс-кодон (бесмысленный кодон) 396
Нонсенс-супрессия 400, 401
Нопалины 281
Норма реакции 443
Носительство гетерозиготное 523
Нуклеосома 139
Нуклеоид 198
Нуклеотидилтрансфераза 274
Нуклеотидной (видовой) специфичности коэффициент 118
Нуллиплекс 356

Обратная транскриптаза 171, 251

Овальбумин 405

Один ген — один фермент (принцип) 374

Октанолдегидрогеназа 559

Октопины 281

Олигомеризация генов 481, 483

Онкоген 540

Онкогенные вирусы 251, 540

Онтогенетика (генетика индивидуально-го развития) 409

Оогенез 173

Оогонии 174

Оотида 175

Ооцит I порядка 174

Ооцит II порядка 174

Опал-кодон 400

Оператор 417

Оперон 417—419

Определение пола после оплодотворения 440

«Оранжевый реактив» 529

Ориентированный перенос хромосомы 204

Ортодоксальный дарвинизм 455

Основная теория естественного отбора 467

Отбор 467

— дизруптивный (рассекающий) 470

— дестабилизирующий 470

— движущий 470

— стабилизирующий 470

Отбор

— индивидуальный 553

— массовый 553

— коэффициент отбора 467

Охра-кодон 400

Охра-супрессор 401

Ошибка репликации 309

Ошибка включения 309

Палиндромы 491

Панмиксия 456—458

Параллелизма принцип 292

Парамецин 247

Парасексуальная гибридизация 261

Парасексуальный цикл 185

Паромомицин 402, 448

Партеногенез 180

Пенетрантность 52

Пептидильный центр (Р-центр) 399

Переключение типов спаривания у дрожжей 431

Перекрывающихся делеций метод 241, 376, 379

Перенос генов

— вертикальный 252

— горизонтальный 252

Перестройки хромосомные 318

Периплазма 430

Пероксидазы 555

Пестициды 526, 529

Пестролистность 225

Пигментная ксеродерма 515, 516

Плазмиды (челночные или гибридные) 204, 278

Плазмидная, или векторная, трансформация 209, 267

Ti-плазмиды 280, 282

Пластиды 229

Пластом 230

Плейотропия 50

Повторы в ДНК 322, 382, 491

Позиционная информация 428

Пол гетерогаметный 87

— гомогаметный 88

- Полиаденилирование 406
 Полигаплоиды 368
 Полигены 549
 Полилинкер 285
 Полимерия 49
 Полиморфизм 464
 Полинуклеотидкиназа 283, 284
 Полиплоидия 347, 349, 355
 Полиплоидов расщепление 356
 Полипротеин 483
 Полирибосомы (полисомы) 399
 Полихлорбифенилы 529
 Полициклические углеводороды 543
 Половой хроматин 504
 Половые типы простейших 193
 Полухиазма 160
 — изомеризация 164
 — миграция ветвей 164
 — разрешение 164
 Полярное тельце веретена 175
 Полярность рекомбинации 240
 Попадания принцип 295
 Популяции 456
 — балансовая модель 460
 — генетика 455
 — гетерогенность 459
 — классическая модель 460
 Последствия ионизирующего излучения 295
 Постмейотическое расщепление 157
 Пост-трансляционная модификация 415
 Поток генов (миграция особей) 471
 Праймер (затравка) 127
 Преадаптация генотипическая 450
 Преддетерминация цитоплазмы 254
 Предмутационные изменения 313, 541
 Пренатальная диагностика 521
 Промутагены 532
 Последовательности гипотеза 389
 Признаки
 — доминантные 23, 24
 — рецессивные 23, 25
 — качественные 23—25
 — количественные 548
 — первичные половые 72, 435
 — вторичные половые 72, 435
 Провирус 251
 Прогерия (преждевременное старение) 516
 Промотор 382
 Промутагены 532
 Пронуклеус 175
 β -Пропиолактон 533
 Протеазы сериновые 420
 Проонкогены 540
 Профаг 209
 Профлавин 314, 391
 Псевдоаллелизм 374
 Псевдогены 476, 491
 Пшенично-пырейные гибриды 561
 Радиопротекторы 542
 Разрешающая способность генетического анализа 371
 Расщепление 25—27, 39—41
 — при первом (втором) делении мейоза 186
 — хроматидное 356
 — хромосомное 356
 W-реактивация 313
 Редукция по гену 149
 — по центромере 149
 Рекомбинантные сочетания 99
 Регрессии коэффициент 551
 Регуляция позитивная 419
 Рекомбинация нерегулярная 494
 — в связи с мутациями 314
 — реципрокная 157
 — сайт-специфическая 212
 Рекон 379
 Репарация 131, 312
 — пострепликативная 132
 — склонная к ошибка (SOS) 138, 313, 443
 — эксцизионная 132, 515
 Репликатор (ARS) 142
 Репликация 112, 309
 — дифференциальная 419
 Репликон 131, 413
 Реплисома 130
 Репрессия 418
 Репрессор 417
 Ресинтез видов 361
 Рестрикционное картирование 283
 Рестриктирующие эндонуклеазы (рестриктазы) 222, 223
 Рестрикции — модификации системы 221
 Ретровирусы 251, 540
 Ретротранспозоны 253
 Реципиент (в конъюгации) 201
 Рибосома 385, 386
 Рибонуклеаза 487
 Рибосомные РНК 385
 — 5S РНК 385
 — 58S РНК 387
 P_0+ (δ)-фактор РНК-полимеразы 382
 Сайт 376
 Сальтант 294
 Самонесовместимость (автостерильность) 179
 Санбин 282
 Самосборка 421
 Сверхдоминирования теория 559
 Сверхсамки 94
 Сверхсамцы 94
 Сдвиг рамки (сдвиг считывания) 392
 Секвенирование олигонуклеотидов 284—285
 Сексдукция 207

- Селекция 545
 Серповидноклеточная анемия 510, 511, 514
 Сестринских хроматид обмена 536
 Сигма вирус 251
 Сигма (σ)-фактор РНК-полимеразы 382
 Сигналы 554
 Сигнальная наследственность 497
 Симбиогенетического происхождения эукариотической клетки гипотеза 250
 Симплекс 356
 Синдром
 — Блюма 516
 — Дауна 502, 518, 519, 520
 — Клайнфельтера 518
 — «кошачьего крика» 320
 — Луи Бар (атаксия — телеангиэктазия) 516
 — теплового шока 446
 — Шерешевского — Тернера 516, 517, 518
 Синергиды 176
 Синтез белка (см. Трансляция) 385
 Синтез генов 272
 Системы тестов на мутагенез 531, 538
 Синтетическая популяция 560
 Синаптонемный комплекс 70
 Синонимические замены нуклеотидов 462
 Скрещивание анализирующее 29
 — дигибридное 39
 — избирательное (ассортативное) 467
 — моногибридное 30
 — обратное 29
 — полигибридное 41
 — реципрокное 87
 Скрининг мутагенов 531, 538
 Стресс 451
 — феромональный 451
 Соматический эмбриогенез 412
 Соматогенные изменения 440
 Соленоид (укладка нуклеосом) 140
 Сополимеры статистические 394
 Сорт 546
 Сперматиды 174
 Сперматогонии 174
 Сперматогенез 173—174
 Сперматозоид(ы) 168, 174
 Сперматоцит I порядка 174
 Сперматоцит II порядка 174
 Сплайсинг 406
 Спонтанное мутирование у человека 512
 Спорогенез мега- и микро- 175
 Спорофит 175
 Спот-тест 533
 Спутники (хромосом) 64
 Сравнительная генетика 259, 293
 Старение мицелия 243
 Старт клеточного цикла 62
 Стерильность мужская 232
 Стероидные гормоны 414
 Стёрт — единица картирования 428
 Стрептомицин 402, 444, 530
 Сульфаниламидные препараты 520
 Супермутагены 529
 Суперовуляция 561
 Супрессивность 242
 Супрессор 48, 402
 Супрессия: генотипическая 402
 — фенотипическая 402
 Сферопласты 277
 Сцепление генов 97
 — с полом 89
 Сэнгера метод секвенирования 89, 285
 Талассемия 514, 515
 ТАТА-последовательность 382
 Таутомеры 309
 «Тени» эритроцитов 267
 Теория мутаций 291
 Теломера 64
 Терминация транскрипции 381
 — трансляции 396
 Тестостерон 436
 Тестикулярная феминизация 436
 Тест-системы генетической активности 531, 538
 Тетрадный анализ 149, 152, 153, 186
 Тетратип 186
 Тимидинкиназа 538
 Тилакоиды 199
 Тирозиноз 513
 Топоизомеразы 128
 Транзиции 308
 Трансверзии 308
 Трансдетерминация 427
 Трансдукция 199, 209—212
 — абортивная 210
 — общая, или неспецифическая 210
 — специфическая 212
 Транскрипция 381
 — дифференциальная 413
 Транслокации 318, 331, 343
 — робертсоновские 334
 Трансляция (синтез белка) 385
 — дифференциальная 414
 — в митохондриях 399
 — в бесклеточной системе 393
 Трансмиссия генов 240
 Транспозиция 318, 336, 341
 Транспозоны 339
 Транспортные РНК 385, 386
 Трансформация бактерий 113, 199, 208
 — животных и растений 561
 — интегративная 277
 Триваленты 355
 Триптофансинтетаза 390
 Триплекс 356
 Триптофановый оперон 477
 Трисомия 362
 Тритикале 561

- 2,4,5-Трихлорфеноуксусная кислота 529
Тромбопластин 499
Тубулин 348
- Убийцы, дрожжи 247
— парамеции 247
Ультрафиолетовый свет 533
— ближний (длинноволновый) 528
— коротковолновый 528
Учет мутаций у дрозофилы 303
— рецессивных мутаций у высших растений 308
- Фазеолин** 282
Фактор рекомбинации у самцов 324
F-фактор 201
Факторы динамики популяции 467
— трансляции 385, 387
Фармакогенетика 543
Фенилкетонурия 469, 513, 521
Фенокопии 427
— нормы 444, 541
— мутаций 443
Фенотип 30
Фенотипический радикал 27
Фены (элементарные признаки) 31
Фибрин 499
Фибриноген 499
Фибринопептид А 487
Физиологическая гипотеза мутационного процесса 296
Физическое картирование генов 283, 404
Фитогормоны 280
Формально-генетический анализ 45
Фотореактивация 132
Фримартинизм 172
5-Фторурацил 256, 444
- Харди — Вайнберга закон** 458
Хиазмы 70, 144, 145
Химическая экология 475
Хлоропластный геном 229
Холдейна Дж. функция 105
Хромомеры 68
Хромосомы
— акроцентрические 63
— гомологичные 59, 362
— добавочные (В-хромосома) 66, 365
— полицентрические 63
— половые 87
— субметацентрические 63
Хогнесса последовательность 423
Хорея Хантингтона 513
Хроматидные aberrации 318
Хромосомные aberrации 318
— болезни 516
Хромосом окраска дифференциальная 321
- «**Центральная догма**» молекулярной биологии 15, 17, 406, 440
Центромера 59, 63, 142
— локализованная 59, 63, 142
— диффузная 63, 320
Цибриды 267
Цис-транс-тест 379
Цистрон 379
Цитогенетика 55
Цитодукция 244—245
Цитоплазматическая мужская стерильность 232
— тип техасский (Т) 234
— тип молдавский, или USDA (S) 234
Цитоплазматическая наследственность 259
Цитопласты 267
Цитогеты 231
Цитокинины 230
Цитохалазин В 267
Цитохром С 485
— Р-450 532
- Частота аллелей, генов, генотипов** 458, 467
Частота спонтанного мутирования 298
Черепашовые кошки 463
Чистоты гамет правило 30, 356
Чистые линии 292, 439
- Шайн — Далгарно последовательность** 397
Штамм 546
— мужской (F^+) 201
— женский (F^-) 201
- Щелочная фосфатаза** 400
- Эволюции гена, тенденции** 483
Эволюция
— биологическая 454
— нейтральная 488
Экзон 405, 484
Экдизон 414, 474, 526
Экологическая генетика 414, 474, 526
Экологические ниши 474
Экспрессивность 52
Эксцизия 136
Эктопическое спаривание 343
Элементарная эволюционная структура 456
— событие 456
Элементарные признаки (фены) 31
Элонгация полипептида 399
— в транскрипции 381

- Эндомиоз 67
Эндонуклеазы рестрикции (рестрикта-
зы) 268
Эндополиплоидия 347
Эндосперм 177
Энхансеры 424, 494
Эпигеномное наследование 445
Эписома 202
Эпистаз 48
Эпоксиды 543
Эстеразы 554, 555
Эстроген 172
Этиленмин 294, 526
Этилметансульфанат 295, 533
Эухроматин 64
Эффект основателя 472
- Эффект положения 335
— стабильный 335
— нестабильный 335
— мозаичный 335
— последствия 316
- Ядерно-цитоплазматические гибриды
245
Ядерный дуализм 193
Ядрышковый организатор 64
Яйцеклетка 68, 174
Ядро
— вегетативное (макронуклеус) 193
— генеративное (микронуклеус) 193
— пересадка 197
— центральное 177

Оглавление

Предисловие	3
<i>Глава 1</i> — вводная. Генетика и ее место в системе естественных наук	7
1.1. Предмет генетики	7
1.2. Основные этапы развития генетики	8
1.3. ДНК — носитель наследственной информации	14
1.4. Методы генетики	17
1.5. Значение генетики для других наук и практики	19
Вопросы к главе 1	22
Часть I. Наследственность	23
<i>Глава 2.</i> Законы наследования. Моногибридное скрещивание	23
2.1. Генотип и фенотип*	23
2.2. Проверка гипотезы — метод χ^2	27
2.3. Анализирующее скрещивание*	29
2.4. Концепция элементарных признаков	30
2.5. Доминирование и другие взаимодействия аллелей	32
Вопросы к главе 2	38
<i>Глава 3.</i> Законы наследования. Полигибридные скрещивания	39
3.1. Закон независимого наследования признаков*	39
3.2. Взаимодействие генов*	42
3.3. Пенетрантность, экспрессивность, норма реакции	52
Вопросы к главе 3	54
<i>Глава 4.</i> Цитологические основы наследственности	55
4.1. Значение цитологического метода*	55
✓4.2. Митоз*	57
4.3. Генетический контроль клеточного цикла	62
✓4.4. Строение хромосом. Кариотип*	64
4.5. Гигантские (политенные) хромосомы*	68
✓4.6. Мейоз*	69
4.7. Биологическое значение митоза*	74
4.8. Биологическое значение мейоза*	75
4.9. Генетический контроль мейоза*	81
Вопросы к главе 4	84
<i>Глава 5.</i> Хромосомная теория наследственности	85
5.1. Сцепление с полом*	86
5.2. Нерасхождение половых хромосом*	90
5.3. Хромосомное определение пола*	93
5.4. Нарушение закона независимого наследования признаков	96

Примечание*. Звездочкой отмечены главы и разделы, рекомендуемые к проработке на практических и семинарских занятиях

5.5. Сцепление и кроссинговер*	97
5.6. Интерференция*	102
5.7. Хромосомы и группы сцепления*	108
Вопросы к главе 5	111
Глава 6. Молекулярные основы наследственности	112
6.1. Генетическая роль ДНК	113
6.2. Полуконсервативная репликация ДНК	122
6.3. Эпизимология репликации	126
6.4. Репарация ДНК	131
6.5. Компактизация ДНК и структура хроматина	139
6.6. Уникальные и повторяющиеся последовательности в ДНК	141
6.7. Искусственные хромосомы	142
Вопросы к главе 6	143
Глава 7. Механизмы рекомбинации	144
7.1. Цитологическая демонстрация кроссинговера	144
7.2. Кроссинговер на стадии четырех хроматид	149
7.3. Митотический кроссинговер	155
7.4. Предпосылки молекулярной модели кроссинговера	157
7.5. Молекулярный механизм кроссинговера	160
7.6. Факторы, влияющие на кроссинговер	165
Вопросы к главе 7	168
Часть II. Разнообразие и единство генетических механизмов	
Глава 8. Жизненные циклы. Процессы, ведущие к рекомбинации у эукариот	170
8.1. Гаметогенез и оплодотворение у животных*	172
8.2. Цветковые растения*	175
8.3. Несовместимость у растений	178
8.4. Нерегулярные типы полового размножения	180
8.5. Одноклеточные эукариоты*	182
8.6. Грибы	182
8.7. Одноклеточные зеленые водоросли	191
8.8. Простейшие	191
Вопросы к главе 8	197
Глава 9. Жизненные циклы. Процессы, ведущие к рекомбинации у бактерий и бактериофагов	198
9.1. Конъюгация	199
9.2. Трансформация	208
9.3. Трансдукция	209
9.4. Генетический анализ у бактерий	214
9.5. Генетика бактериофагов	216
9.6. Рестрикции и модификации ДНК бактериофагов	221
Вопросы к главе 9	224
Глава 10. Нехромосомное наследование	225
10.1. Генетика хлоропластов	225
10.2. Цитоплазматическая мужская стерильность у растений	232
10.3. Генетика митохондрий	236
10.4. Новый аспект парасексуального цикла. Цитодукция	244
10.5. Наследование паразитов и симбионтов	247
10.6. Наследование вирусов и экстрахромосомные элементы	250
10.7. Преддетерминация цитоплазмы, или собственно цитоплазматическое наследование	252
10.8. Критерии нехромосомного наследования	255
Вопросы к главе 10	256
Глава 11. Свойства генетического материала. Клеточная и геновая инженерия	257

11.1. Закономерности наследования и свойства генетического материала*	257
11.2. Элементы парасексуального цикла и клеточная инженерия . . .	259
11.3. Трансформация и генная инженерия	267
11.4. Получение генов	268
11.5. Клонирование генов. Векторы	272
11.6. Банки генов	275
11.7. Трансформация эукариот	277
11.8. Генная инженерия в природе и векторы для клонирования генов растений	280
11.9. Рестрикционное картирование и секвенирование	283
Вопросы к главе 11	289

Часть III. Изменчивость генетического материала

Глава 12. Мутационный процесс. Генные мутации	290
12.1. Мутационная теория	291
12.2. Классификация мутаций	293
12.3. Спонтанные и индуцированные мутации	294
12.4. Методы изучения мутаций	296
12.5. Причины генных мутаций	308
12.6. Предмутационные изменения генетического материала	315
Вопросы к главе 12	317
Глава 13. Хромосомные перестройки*	318
13.1. Делеции и дефишенсы	319
13.2. Дупликации	321
13.3. Инверсии	326
13.4. Транслокации	331
13.5. Эффект положения	335
13.6. Транспозиции	336
13.7. Рекомбинационный механизм хромосомных перестроек	343
Вопросы к главе 13	346
Глава 14. Полиплоидия и анеуплоидия*	347
14.1. Автополиплоидия	348
14.2. Мейоз у автополиплоидов	354
14.3. Генетический анализ у автополиплоидов	356
14.4. Аллополиплоидия	360
14.5. Анеуплоидия	362
14.6. Замещение и дополнение хромосом	365
14.7. Гаплоидия	367
Вопросы к главе 14	369

Часть IV. Структура и функции гена

Глава 15. Теория гена	370
15.1. Критерии аллелизма*	371
15.2. Противоречия критериев аллелизма	372
15.3. Анализ тонкой структуры гена*	374
15.4. Матричные процессы и действие гена	380
15.5. Транскрипция ДНК	381
15.6. Трансляция иРНК	385
15.7. Генетический код*	389
15.8. Как рибосома считывает генетический код?	396
15.9. Генетический анализ трансляции. Супрессия	400
15.10. Молекулярная биология гена	403
Вопросы к главе 15	407
Глава 16. Генетический материал в онтогенезе	409
16.1. Проблема стабильности генетического материала в онтогенезе	409

16.2. Тотипотентность ядра соматической клетки*	412
16.3. Дифференциальная активность генов	412
16.4. Регуляция транскрипции у бактерий. Оперон	415
16.5. Совсем простые системы. Самосборка	421
16.6. Сигналы регуляции транскрипции у эукариот	423
16.7. Детерминация и дифференцировка	424
16.8. Позиционная информация и картирование бластодермы у дрозофилы*	427
16.9. Значение цитоплазмы	430
16.10. Перестройки генетического материала при детерминации клеточных типов у дрожжей	431
16.11. Перестройки генетического материала при дифференцировке лимфоцитов	433
16.12. Пол как генетическая модель индивидуального развития*	435
Вопросы к главе 16	437
Глава 17. Модификации	438
17.1. Модификации — ненаследуемые изменения	438
17.2. Модификации — изменения организма в пределах нормы реакции	440
17.3. Типы модификационных изменений	443
17.4. Механизмы модификаций	445
17.5. Взаимосвязь модификационной и наследственной изменчивости	449
17.6. Значение модификаций	451
Вопросы к главе 17	453
Часть V. Генетика и эволюция	
Глава 18. Генетические основы эволюции. Генетика популяций*	454
18.1. Популяция — единица эволюционного процесса	456
18.2. Частоты генотипов и частоты аллелей	457
18.3. Закон Харди — Вайнберга	458
18.4. Проблема генетической гетерогенности природных популяций	459
18.5. Оценка генетической гетерогенности популяций	461
18.6. Элементарное эволюционное событие — изменение частот аллелей в популяции	467
Вопросы к главе 18	475
Глава 19. Эволюция гена	476
19.1. Сравнительная молекулярная биология гена	476
19.2. Некоторые тенденции в эволюции гена	483
19.3. Роль генных мутаций в эволюции гомологичных генов и белков	484
19.4. Коварионы	486
19.5. Концепция нейтральной эволюции	487
19.6. Как возникают новые гены?	490
19.7. Эволюция систем регуляции	493
Вопросы к главе 19	495
Часть VI. Генетика для нас	
Глава 20. Генетика человека	496
20.1. Биосоциальная сущность человека	496
20.2. Человек как объект генетики	498
20.3. Методы генетики человека	498
20.4. Медицинская генетика	513
20.5. Значение диагностики и лечение от наследственных болезней	520
20.6. Медико-генетическое консультирование	523
Вопросы к главе 20	524
Глава 21. Проблемы генетической безопасности	525
21.1. Генетическая токсикология	526
21.2. Тест-системы и система тестов генетической активности*	531
21.3. Мутагенез и канцерогенез	539

21.4. Уменьшение генетической опасности	541
Вопросы к главе 21	544
<i>Глава 22. Генетические основы селекции</i>	<i>544</i>
22.1. Модели пород и сортов	546
22.2. Количественные признаки*	548
22.3. Типы отбора	551
22.4. Типы скрещиваний в селекции	555
22.5. Гетерозис	557
22.6. Полиплоидия и отдаленная гибридизация	560
22.7. Использование мутационного процесса в селекции	561
Вопросы к главе 22	565
Приложение	566
Список рекомендуемой литературы	570
менной указатель	576
Предметный указатель	579

Учебное издание

Инге-Вечтомов Сергей Георгиевич

Генетика с основами селекции

Редактор *Н. А. Соколова*. Младшие редакторы *Е. В. Бу-
рова, Е. И. Попова*. Художник *В. Н. Хомяков*. Художест-
венный редактор *Т. А. Коленкова*. Технический редактор
Т. Д. Гарина. Корректор *С. К. Завьялова*

ИБ № 7161

Изд. № Е-543. Сдано в набор 15.04.88. Подп. в печать
14.02.89. Т—07741. Формат 60×90¹/₁₆. Бум. офс. № 1.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Объем 37,0 усл.
печ. л. 74,0 усл. кр.-этт. 39,94 уч. изд. л. Тираж 21 000 экз.
Зак. № 1305. Цена 1 р. 70 к.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4,
Неглинная ул., д. 29/14.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при
Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль,
ул. Свободы, 97.