



**Филиал федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Астраханский государственный
технический университет» в Ташкентской области
Республики Узбекистан**

Факультет высшего образования

Кафедра ВБиТ

МЕТОДЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ В АКВАКУЛЬТУРЕ

**Методические указания
к практическим занятиям**

Для обучающихся по направлению 35.04.07 Водные биоресурсы и
аквакультура

Ташкентская область, Кибрайский район – 2025

Программу составил(и):
к.б.н., доцент Сергеева Ю.В. _____

Рецензент(ы):
к.с/х.н., доцент Федоровых Ю.В. _____

Методические указания для выполнения практических работ по дисциплине «Методы генной инженерии в аквакультуре»

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании кафедры «ВБиТ»

Протокол от 21.02.2025 г. № 7

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 1 «ВВЕДЕНИЕ. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»

Содержание:

1. Введение в генетическую инженерию. Возможности генной инженерии
2. Методы генной инженерии
3. История генной инженерии

Теоретическая часть

Введение в генетическую инженерию. Возможности генной инженерии.

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в "фабрики" для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.

В настоящее время кишечная палочка (*E. coli*) стала поставщиком таких важных гормонов как инсулин и соматотропин. Ранее инсулин получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока. Для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200 - 250 грамм. Это делало инсулин дорогим и труднодоступным для широкого круга диабетиков. В 1978 году исследователи из компании "Генентек" впервые получили инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. При соединении их дисульфидными связями образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и других примесей, не дает побочных эффектов, как инсулин животных, а по биологической активности

от него не отличается. Впоследствии в клетках *E. coli* был осуществлен синтез проинсулина, для чего на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы синтезировали ее ДНК-копию. После очистки полученного проинсулина его расщепили и получили нативный инсулин, при этом этапы экстракции и выделения гормона были сведены к минимуму. Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

Соматотропин - гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на кг веса три раза в неделю, то за год ребенок, страдающий от его недостатка, может подрасти на 6 см. Ранее его получали из трупного материала, из одного трупа: 4 - 6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат. Таким образом, доступные количества гормона были ограничены, кроме того, гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы. Компания "Genentec" в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков. В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР. При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины.

На технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифичных ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями (например, у человека и курицы). ДНК-зонды также используются в диагностике различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным нетрадиционный подход "белок-ген", получивший название "обратная генетика". При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку. Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомками. Генетическая трансформация животных позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержавшей ген соматотропина быка в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией. Сейчас даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет.

Методы генной инженерии

Генетическая инженерия - конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе - создание искусственных генетических программ (Баев А. А.). По Э. С. Пирузян генетическая инженерия - система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК.

Генетическая инженерия - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства. Речь идет о направленном, по заранее заданной программе конструировании молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определёнными ценными для человека признаками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и

чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;

-клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;

-введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

История генной инженерии

Генная инженерия появилась благодаря работам многих исследователей в разных отраслях биохимии и молекулярной генетики. На протяжении многих лет главным классом макромолекул считали белки. Существовало даже предположение, что гены имеют белковую природу. Лишь в 1944 году Эйвери, Мак Леод и Мак Карти показали, что носителем наследственной информации является ДНК. С этого времени начинается интенсивное изучение нуклеиновых кислот. Спустя десятилетие, в 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик создали двуспиральную модель ДНК. Именно этот год принято считать годом рождения молекулярной биологии.

На рубеже 50 - 60-х годов были выяснены свойства генетического кода, а к концу 60-х годов его универсальность была подтверждена экспериментально. Шло интенсивное развитие молекулярной генетики, объектами которой стали *E. coli*, ее вирусы и плазмиды. Были разработаны методы выделения высокоочищенных препаратов неповрежденных молекул ДНК, плазмид и вирусов. ДНК вирусов и плазмид вводили в клетки в биологически активной форме, обеспечивая ее репликацию и экспрессию соответствующих генов. В 70-х годах был открыт ряд ферментов, катализирующих реакции превращения ДНК. Особая роль в развитии методов генной инженерии принадлежит рестриктазам и ДНК-лигазам.

Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа.

Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы касаются получения гибридов между различными плазмидами. Была доказана возможность создания рекомбинантных молекул с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий, их жизнеспособность, стабильность и функционирование.

Второй этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности.

Третий этап - начало работ по включению в векторные молекулы ДНК (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных.

Формально датой рождения генетической инженерии следует считать 1972 год, когда в Стенфордском университете П. Берг, С. Коэн, Х. Бойер с сотрудниками создали первую рекомбинантную ДНК, содержащую фрагменты ДНК вируса SV40, бактериофага и *E. coli*.

Контрольные вопросы:

1. Соматотропин и его роль в организме человека и животных?
2. Какие методы использует технология рекомбинантных ДНК?
3. Назовите основные этапы развития генной инженерии?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 2 «МАТЕРИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ. МЕНДЕЛИЗМ»

Содержание:

1. Материальные основы наследственности и изменчивости
2. Менделизм. Гибридологический метод Менделя.

Теоретическая часть

Материальные основы наследственности и изменчивости

Генотип – целостная система. Ознакомившись с основными законами генетики, мы можем теперь подвести некоторые итоги и углубить наше представление о гене и генотипе организмов. Реальное существование гена доказывается двумя группами фактов: относительно независимым комбинированием при расщеплении; способностью изменяться – мутировать. К числу основных свойств гена относится и его способность к удвоению при удвоении хромосом. Гены обладают значительной устойчивостью, что и определяет относительное постоянство вида. Между генами осуществляется тесное взаимодействие, в результате чего генотип в целом не может рассматриваться как простая механическая сумма генов, а представляет собой сложную, сложившуюся в процессе эволюции организмов систему.

Носителями материальных основ наследственности – генов служат хромосомы, в состав которых входят ДНК и белки. Основой перечисленных выше свойств гена является способность ДНК к самоудвоению. В основе действия гена в процессе развития организма лежит его способность через посредство РНК определять синтез белков. В молекуле ДНК как бы записана информация, определяющая химическую структуру белковых молекул.

Этот механизм является общим на всех ступенях эволюции от вирусов и бактерий до млекопитающих и цветковых растений. Это указывает на то, что биологическая роль нуклеиновых кислот определилась на очень ранних этапах эволюции жизни, возможно, в самый момент перехода от неживого к живому.

Несмотря на большие успехи в развитии генетики, еще многие вопросы не решены наукой. Так, не вполне ясно, каким образом гены действуют в процессе индивидуального развития организма (онтогенеза). В каждой клетке имеется диплоидный набор хромосом, а следовательно, и весь набор генов данного вида. Очевидно, что в разных клетках и тканях функционируют лишь немногие гены, а именно те, которые определяют свойства данной клетки, ткани, органа. Каков же механизм, обеспечивающий активность определенных генов? Эта проблема сейчас усиленно разрабатывается в науке.

Цитоплазматическая наследственность. Все данные современной генетики подтверждают ведущую роль хромосом в наследственности. Хромосомная теория основывается на огромном количестве фактов. Но и в цитоплазме существуют структуры, которые наряду с хромосомами ядра играют роль в наследственности, они определяют цитоплазматическую наследственность.

У растений пластиды (в том числе и хлоропласты) размножаются путем деления. Эти органоиды, так же как и клеточное ядро, обладают способностью к самовоспроизведению. У цветковых растений в яйцеклетке содержатся пластиды, которые передаются следующему поколению. Через пыльцевую трубку передача пластид тоже возможна, но в небольшом количестве и не всегда. У ряда растений описаны наследственные изменения (мутации), касающиеся свойств хлоропластов. Одним из таких изменений является потеря (полная или частичная) хлоропластами способности к синтезу хлорофилла. Если это изменение затронет только часть клеток, то получается характерная картина пестролистности: отдельные части листа и других зеленых органов растений лишены хлорофилла и оказываются светлыми. Кроме хлоропластов, самовоспроизводящимися органоидами клетки являются митохондрии. В них так же, как и в хлоропластах, обнаружена ДНК. В настоящее время главным образом у одноклеточных организмов (дрожжи, простейшие) найдены мутации, связанные с

изменением ДНК митохондрий. У многоклеточных организмов, размножающихся половым путем, характерная черта цитоплазматической наследственности передача наследственной информации по материнской линии. Это объясняется тем, что яйцеклетка богата цитоплазмой, а сперматозоид почти лишен ее.

Все это позволяет говорить не только о хромосомной, но и о цитоплазматической наследственности, играющей, однако, второстепенную, подчиненную роль.

Менделизм. Гибридологический метод Менделя.

Развитие современной генетики началось с открытия Грегором Менделем закономерностей наследования признаков, с установления того факта, что признаки в потомстве гибридов не исчезают, а перекомбинируются и передаются в определенных численных соотношениях следующим поколениям. Перед описанием и анализом опытов, проведенных Менделем на горохе в небольшом монастырском садике, дадим краткую биографическую справку. Грегор Мендель (1822-1884) родился в Силезии в семье крестьянина и так же, как и его отец, был искусным садоводом. Чин монаха католического монастыря ордена августинцев не помешал Менделю получить образование в Венском университете и активно участвовать в работе Общества естествоиспытателей г. Брюнна (ныне Брно). В 1865 г. Мендель доложил на заседании этого общества, а 1866 г. опубликовал в его трудах работу «Опыты над растительными гибридами». Через три года Мендель был назначен настоятелем Брюннского монастыря и вследствие большой занятости оставил свои эксперименты по гибридизации. Изучая наследование признаков у гибридов гороха, Мендель опирался на опыт своих предшественников, особенно И.Г. Кельрейтера, Т.Э. Найта, О. Сажрэ и Ш. Нодэна. Из предложенных ими методических приемов он выбрал наиболее прогрессивные (полукастрация цветков, реципрокные и возвратные скрещивания, отбор растений с альтернативными признаками) и усовершенствовал гибридологический метод, дополнив его количественным

учетом расщепляющихся форм и математическим анализом полученных результатов. Все последовательные этапы экспериментальной работы Менделя были им тщательно продуманы и обоснованы. Гибридологический метод Менделя. Объектом исследования Г. Мендель выбрал горох *Pisum sativum*, поскольку это самоопыляющееся растение имеет много культурных сортов, стабильно сохраняющих свои признаки в потомстве, и обладает таким строением цветков, которое позволяет легко удалять пыльники и наносить пыльцу других сортов на рыльце полукастрированных цветков. В течение двух лет Мендель испытывал 34 сорта гороха. Убедившись в течение нескольких циклов самоопыления в константности выбранных признаков, он выбрал 22 сорта с их контрастирующими парами. Всего в опытах Менделем было проанализировано наследование семи пар контрастных (альтернативных) признаков. Скрещивания, в которых родительские формы отличаются друг от друга по одной, двум и трем парам альтернативных признаков, позднее стали называться соответственно моно-, ди- и тригибридными. Во всех скрещиваниях Мендель проводил точный количественный учет всех форм второго поколения, различающихся по отдельным признакам: потомство от каждого растения анализировалось им индивидуально, а затем подсчитывалась суммарная численность по каждому признаку по всей выборке растений. В опытах Менделя использовались большие выборки растений. В дальнейшем их репрезентативность, т.е. достаточность для получения достоверных результатов, была подтверждена статистическими методами. Усовершенствование гибридологического метода позволило Г. Менделю выявить ряд важнейших закономерностей наследования признаков у гороха, которые, как оказалось впоследствии, справедливы для всех диплоидных организмов, размножающихся половым путем. Описывая результаты скрещиваний, сам Мендель не интерпретировал установленные им факты как некие законы. Но после их переоткрытия и подтверждения на растительных и животных объектах, эти повторяющиеся

при определенных условиях явления стали называть законами наследования признаков у гибридов.

Контрольные вопросы:

1. Что является материальной основой гена?
2. Объясните подробно, как вы понимаете выражение «наследственная информация записана в последовательности нуклеотидов молекулы ДНК».
3. Одинакова или различна наследственная информация, записанная в ДНК хромосом нервной и эпителиальной клеток одного и того же организма? Подробно аргументируйте ваш ответ.
4. Что представляет собой цитоплазматическая наследственность? Приведите примеры.
5. Расскажите о закономерностях наследования признаков?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 3 «ГЕНЕТИКА ПОЛА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛА»

Содержание:

1. Теория определения пола
2. Хромосомная теория определения пола
3. Балансовая теория определения пола
4. Бисексуальность организмов
5. Явление фримартинизма
6. Патологии по половым хромосомам
7. Наследование признаков, сцепленных с полом.
8. Проблема регуляции пола.

Теоретическая часть

Теории определения пола. Одной из важнейших проблем в биологии всегда была загадка рождения организмов разного пола. Сотни гипотез о природе этого явления были опубликованы в прошлых веках и особенно в 19 веке. Вот некоторые из них. Аристотель полагал, что зачатие мальчиков происходит чаще в ту пору, когда дуют северные ветры, тогда как зачатие девочек естественно связано с дуновением южных зефиров. Некоторые ученые считали, что дети должны быть того же или противоположного пола, что старший или младший из родителей. По нашим данным, пишет Лавровский в статье " Тайна снеговой воды", в потомстве животных, пьющих снеговую воду, должны преобладать самцы. Гарантирована почти 100% вероятность рождения мальчика, если мама на 5 см переросла папу, и появление на свет девочки, если мама гораздо ниже папы, (Длигач Д.Л., 1972). Но довольно об этом, поговорим о наследовании пола с научной точки зрения.

Хромосомная теория определения пола. В 1901 году при изучении хромосомных наборов половых клеток самцов и самок было установлено, что они различаются одной парой хромосом. Хромосомы этой пары были

названы половыми, а остальные хромосомы, одинаковые у самцов и самок, аутосомами. У большинства организмов, в том числе животных и человека, в кариотипе самок содержится две одинаковые хромосомы, которые обозначают буквой X. У самцов имеется X-хромосома и отличная от нее хромосома, обычно меньшего размера, которая обозначается буквой Y. Таким образом, генотип самок по половым хромосомам будет XX, а генотип самцов - XY.

Кроме такого типа определения пола, в природе встречаются и другие. Например, у птиц генотип самцов XX, а у самок содержится на одну хромосому меньше. Их генотип записывают обычно XO или X-. У пчел, ос и близких им видов пол зависит от количества хромосом. Самки имеют диплоидный набор хромосом – $2n$, а самцы - гаплоидный n . У особей женского пола в процессе гаметогенеза образуется только один сорт гамет, несущий X-хромосому. Поэтому этот пол называют гомогаметным, у самцов образуется два типа гамет, несущих X и Y-хромосомы, и такой пол называется гетерогаметным. В связи с этим пол потомства будет зависеть от гетерогаметных особей, которыми у животных и человека являются самцы. Эта теория наглядно объясняет одинаковую вероятность рождения в природе самцов и самок.

Схема наследования пола у млекопитающих

P ♀ XX × ♂ XY

Гаметы: X X Y

F ♀ XX ♂ XY

50% самок 50% самцов

Балансовая теория определения пола. Исследования на дрозофиле, проведенные учеником Т.Моргана К. Бриджесом, показали, что простой, на первый взгляд механизм определения пола в действительности сложнее. Несомненно, что X-хромосома направляет развитие особи в сторону женского пола, однако Y-хромосома у дрозофилы не влияет на пол. О том, что Y-

хромосома не оказывает никакого влияния на развитие пола у дрозофил, свидетельствует следующий факт. Можно получить мух с набором половых хромосом XXУ; такие мухи будут настоящими плодовитыми самками, несмотря на наличие У-хромосомы. К.Бриджес скрещивал триплоидных (XXX) самок с нормальными самцами. В результате этого скрещивания он получил разнообразное потомство, наряду с нормальными самками и самцами были особи с отклонениями в формировании их половой системы.

Половые типы дрозофилы согласно балансовой теории

Число X-хромосом	Число наборов аутосом	Половой индекс(X: A)	Пол организма
3	2	1,5	сверхсамка
2	2	1,0	норм. самка
2	3	0,67	интерсекс
1	2	0,5	норм. самец
1	3	0,33	сверхсамец

На основании опытов Бриджес пришел к выводу, что признаки женского пола контролируются X-хромосомой, а признаки мужского пола - аутосомами. Пол же особи зависит от баланса между X-хромосомами и аутосомами. Это следует из того, что все особи с балансом хромосом 1 и более представляют собой самок, соотношение 0,5 определяет самцов; баланс от 1 до 0,5 определяет промежуточное развитие пола.

У дрозофилы и у некоторых других насекомых иногда появляются так называемые гинандроморфы, у которых одни участки тела несут признаки женского пола, другие - мужского. Причины такой мозаичности легко объяснить. В начале своего развития животное обладает двумя X-хромосомами и начинает развиваться как самка, однако при первом дроблении оплодотворенного яйца по тем или иным причинам происходит утрата одной из X-хромосом. В результате образуются клетки, содержащие только одну X-хромосому. Если эти клетки продолжают делиться, то формируются ткани, характеризующиеся чисто мужскими признаками.

Бисексуальность организмов. Многочисленные опыты на животных и растениях позволяют считать, что организмы обладают бисексуальностью, то есть способностью при определенных условиях формировать женский или мужской пол. Подтверждением этого является изменение пола в онтогенезе. Один из примеров переопределения пола получен на аквариумных рыбках Т.Якимото. Для опыта были отобраны белые и красные медаки. Гетерогаметным полом у этих рыбок является мужской. Доминантный ген красной окраски R находится в Y-хромосоме, а его рецессивный аллель r - в X-хромосоме. Следовательно, белые самки имеют генотип X X, а красные самцы - X Y. В этом случае самцы всегда будут красными, поскольку в Y-хромосоме находится доминантный ген R. При таком типе наследования сыновья всегда будут нести признаки отца. Вылупившихся из личинок мальков разделили на две группы, в первой группе кормление было обычным, а во второй мальки получали добавку женского полового гормона, в результате оказалось, что все красные рыбки во второй группе, генетически определяемые как самцы, по фенотипу были самками с нормально развитыми яичниками и выраженными вторичными половыми признаками. Они были способны скрещиваться с нормальными красными самцами,

Явление фримартинизма. У крупного рогатого скота иногда рождаются разнополые двойни. В этом случае бычки развиваются нормально, а телочки оказываются бесплодными. Таких животных называют фримартинами. Это обусловлено тем, что на ранних этапах эмбрионального развития между плодами устанавливаются анастомозы кровеносных сосудов. Мужские половые гормоны начинают вырабатываться несколько раньше и, попадая в организм телочки, они нарушают нормальное развитие ее половой системы. Кроме этого у телок-фримартинов был обнаружен химеризм по половым хромосомам. Присутствие Y-хромосомы в генотипе таких телок приводит к изменению признаков в сторону мужского пола,

У кур функционирует только левый яичник. Если же он в силу возрастных изменений или болезни редуцируется, зачаток правой гонады

превращается в семенник, в котором могут формироваться нормальные спермии. Половое поведение и внешние признаки птицы становятся характерными для особей мужского пола, Генетически женская особь превращается в петуха.

Патологии по половым хромосомам. У человека и животных обнаружены нарушения в группе половых хромосом. Более детально эти нарушения описаны у человека. Основной причиной этих аномалий является нерасхождение половых хромосом в результате мейоза и митоза.

Синдром Клайнфельтера характеризуется недоразвитием гонад. У организмов с такой аномалией генотип ХХУ. Возникновение синдрома Клайнфельтера связано с нерасхождением половых хромосом в мейозе. Животные с синдромом Клайнфельтера имеют признаки мужского пола, но стерильны. Такой дефект описан у человека, собак и кошек.

Синдром Тернера характеризуется женским фенотипом. У организмов с этим дефектом вместо двух половых хромосом - одна (ХО). Эта аномалия описана у человека, козы и домашней мыши. У организмов с этим синдромом недоразвиты яичники, нет четко выраженных вторичных признаков женского организма и в большинстве случаев наблюдается бесплодие.

У животных встречаются и другие нарушения в группе половых хромосом, например трисомия (ХХХ), мозаицизм (ХХ/ХУ/ХХУ) и др. Этих животных нужно своевременно выделять в группы откорма, так как в большинстве случаев у них нарушены воспроизводительные способности.

Наследование признаков, сцепленных с полом. Половые хромосомы, так же, как и аутосомы, несут гены, контролирующие те или иные признаки. Признаки, гены которых локализованы в половых хромосомах, наследуются сцепленно с полом. Сцепленное с полом наследование было открыто Т.Морганом. Для своих опытов он использовал линию дрозофил с белыми глазами (white). Когда белоглазых мух скрещивали с красноглазыми, то полученное потомство не согласовывалось с менделевскими законами наследования. Если красноглазыми были самки, а белоглазыми самцы, то в

F1 все мухи имели красные глаза, что соответствует гипотезе о доминантности этого признака. При скрещивании между собой мух из F1 три четверти потомства в F2 было красноглазым, а одна четверть - белоглазой. Однако все полученные самки были красноглазыми, а среди самцов половина потомков имели красные глаза и половина - белые. Это не совпадало с положениями законов Менделя.

При скрещивании белоглазых самок с красноглазыми самцами результаты были другими. Не все потомство от такого скрещивания было красноглазым, как следовало бы ожидать на основе закона Менделя, исходя из доминирования признака "красные глаза". Напротив, лишь половина потомства составляли мухи с такими глазами, тогда как вторая половина имела белые глаза; кроме того, все красноглазые мухи были самками, а белоглазые - самцами.

Морган показал, что эти результаты можно объяснить, если предположить, что ген, определяющий цвет глаз у дрозофил, находится в X-хромосоме. Продемонстрируем схемы этих скрещиваний ниже.

w WW W w w

1. P ♂ X Y x ♀ X X 2. P ♂ X Y x ♀ X X

белогл. красног. красног. белогл.

w W W w

Гаметы: X Y X X Y X

W w W Ww w

F1 ♀ X X ♂ X Y ♀ X X ♂ X Y

красног. красног. красног. белогл.

Описанное Морганом сцепленное наследование признаков было обнаружено у многих видов животных и человека. У кур сцепленно с полом наследуется поперечно-полосатая окраска оперения. Это явление используется в птицеводстве для разделения по полу цыплят в суточном возрасте. При скрещивании петушков, имеющих сплошную окраску оперения, с поперечно-

полосатыми курами в потомстве петушки будут поперечно-полосатыми, а курочки - со сплошной окраской оперения.

В птицеводстве оказалась полезной рецессивная, сцепленная с полом мутация карликовости. Карликовые куры отличаются от нормальных лучшей оплатой корма продукцией, для них требуется меньшая площадь содержания, они резистентны к отдельным болезням. В бройлерном производстве разработана технология, где в качестве родительского стада используются «мини-куры». Для получения бройлеров используют карликовых курочек и петушков нормального роста. Следует отметить, что у кур гомозиготным является мужской пол. Схема получения бройлеров с использованием карликовых кур показана ниже.

Dw Dw dw

P ♂ X X x ♀ X O

Ген Признак норм. рост карлики

Гаметы: Dw dw

DW X X O

X нормальн. рост

dw Dw dw Dw

X карлики F X X X O

норм. рост норм. рост

У человека известно около 150 признаков, сцепленных с полом. Характер наследования одной из форм дальтонизма - от матери к ее сыновьям - известен уже сотни лет. Другим примером сцепленного с полом признака у человека может служить гемофилия - тяжелое заболевание, для которого характерна неспособность крови свертываться. У нормальных людей при небольшом повреждении тканей кровотечение довольно быстро останавливается вследствие образования сгустков крови. У людей, больных гемофилией, даже небольшое кровотечение остановить невозможно без применения препаратов, усиливающих свертывание крови. Гемофилией страдают в основном особи мужского пола, так как у них имеется одна X- хромосома, и

если в ней окажется дефектный ген, то болезнь сразу проявляется. У женских особей две X-хромосомы и вероятность нахождения дефектного гена в обеих хромосомах очень мала.

От признаков, сцепленных с полом, следует отличать признаки, ограниченные полом, которые развиваются только у особей одного пола, например молочная продуктивность коров, яйценоскость кур и т.д. Гены подобных признаков могут быть локализованы в любой паре хромосом, самцы и самки в одинаковой степени передают их как дочерям, так и сыновьям.

В практике животноводства ограниченные полом признаки могут подвергаться селекции, как по линии самцов, так и через самок. Например, повышение молочности, многоплодия, яйценоскости осуществляется путем селекции обоих родителей.

Проблема регуляции пола. Регуляция пола, имеет важное практическое значение. Так, в яичном птицеводстве желательно получать больше курочек, а в мясном - петушков. В молочном скотоводстве нужны телочки, в мясном - бычки. У тутового шелкопряда самцы дают на 25-30% больше шелка, чем самки, поэтому их преимущество очевидно.

Пол потомка зависит от гетерогаметного пола родительской особи, образующего два сорта гамет с X и Y-хромосомами. В зависимости от того, какая из гамет будет участвовать в оплодотворении, и будет определяться пол потомства. Так как у млекопитающих и человека гетерогаметным является мужской пол, то для регуляции пола потомства нужно разделить сперматозоиды на содержащие X и Y хромосомы. Если в оплодотворении яйцеклетки будет участвовать сперматозоид, содержащий X-хромосому, то родится самка, если Y - самец,

Ученые пытались разделить сперматозоиды по размеру, массе, подвижности в электрическом поле и другими методами. Опыт по разделению спермы кроликов с помощью электрофореза проводила В.Шредер, Осеменяя кроликов анодной или катодной спермой, ей удалось изменить соотношение

самцов и самок до 75%. Однако повторное проведение подобных опытов не подтвердило этих результатов.

Исследования Г.Паршунина и других показали, что избыток аминокислот в рационе кур приводит к существенному изменению в соотношении полов. Установлено, что метионин и глицин содействуют формированию курочек, а аспарагин – петушков.

Лавровский считает, что пол потомства зависит от тайн снеговой воды. По данным, полученным в его опытах, в потомстве животных, пьющих снеговую воду, должны преобладать самцы.

Несмотря на большое число проведенных опытов, проблема регулирования пола у млекопитающих путем разделения сперматозоидов до настоящего времени не решена. В то же время, сегодня разработан способ раннего определения пола. Барр, при исследовании клеток мужского и женского организма, обнаружил в клетках женского организма скопление хроматина под оболочкой ядра. Это образование представляет собой инактивированную X-хромосому и названо "тельцем Барра". Таким образом, тельце Барра обнаруживается только в клетках женского организма. Для ранней диагностики пола, берут небольшое количество амниотической жидкости на ранних стадиях беременности. В этой жидкости всегда обнаруживаются клетки эпителия. Размножив эти клетки на питательной среде, без труда можно определить - мужской или женский плод развивается в организме матери. В случаях, когда рождение мальчика нежелательно, например при сцепленных с полом наследственных болезнях, можно прервать беременность.

У животных можно получать организмы желательного пола с использованием биотехнологических приемов, таких как трансплантация и клонирование. Ученые в настоящее время разработали способ разделения эмбрионов на части, У домашних животных эмбрион можно разделить на 4, 8 или большее количество частей. При этом одну из частей эмбриона подсаживают в матку самки, а остальные замораживают и сохраняют

длительное время в жидком азоте. После рождения потомка можно делать пересадки и остальных частей разделенного эмбриона. В этом случае пол потомков будет такой же, как и у рожденного животного.

Решить проблему регуляции пола у тутового шелкопряда с использованием явления партеногенеза удалось Б.Астаурову. У тутового шелкопряда гомогаметным полом является мужской. Для получения самцов, которые дают на 25-30% больше шелка, яйца самок (грену) подвергали температурному шоку или действию рентгеновских лучей. В результате этого ядро разрушалось. Далее яйца подвергали оплодотворению, в результате чего в яйцеклетку проникали сперматозоиды. Два сперматозоида сливались, восстанавливался диплоидный набор хромосом, и из таких яиц развивались только самцы.

В.Струнников и В.Тадзима разработали методику разделения грену тутового шелкопряда по окраске. Окраска яиц у тутового шелкопряда, наследуется сцепленно с полом, причем светлая окраска носит доминантный характер. При скрещивании самок из линии дающей светлую окраску яиц с самцами темноокрашенной линии мы получим грену, которая будет различаться по цвету. Из светлых яиц будут развиваться самцы, а из темных - самки. Сортировать грену можно с помощью фотоэлемента.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите о первых гипотезах рождения организмов разного пола?
2. Что такое аутосомы?
3. Расскажите подробно про опыты, проведенные на дрозофилах и их цель?
4. Явление фримартинизма – это?
5. Открытие Т. Моргана и его результаты?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 4 «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ»

Молекулярные основы наследственности составляют нуклеиновые кислоты — ДНК (у всех микробов, одноклеточных, растительных организмов, насекомых, животных) и РНК (у некоторых вирусов, в частности онкогенных). Именно в этих крупных биополимерах с помощью единого языка, алфавит которого составляют 4 буквы — нуклеозиды, записана генетическая информация живых существ. В ДНК информация изложена чередованием аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц), которые образуют определенные последовательности, связываясь остатками дезоксирибозы и фосфором в одноцепочечных молекулу.

Потом два комплементарные друг другу цепи образуют водородные связи: аденин-тимин (АТ) и гуанин-цитозин (ГЦ), которые закручиваются и образуют двойную спираль, преимущественно правовинтовую, одновременно биологическое и информационную, «змеиные лестница»). Молекула РНК имеет односпиральную структуру. В ее состав вместо тимина входит урацил (У), а вместо остатка дезоксирибозы — рибоза (химически несколько иная пентоза).

Молекула нуклеиновой кислоты (НК) имеет способность к размножению, удвоение или репликации. Размножаются, тиражируются не белки, а нуклеиновые кислоты. При наличии необходимых компонентов и соответствующих ферментов на матрице каждой нити двуспиральной ДНК (после их разъединения) синтезируется комплементарный цепь новой ДНК. Репликация должна полуконсервативной, матричный характер. В каждой двуспиральной молекуле содержится и материнский (старый), и дочерний (новый) цепь нуклеотидов.

На уровне одноклеточных организмов нет смерти от старости. Этот механизм обеспечивает стабильность генетической информации, ее сохранность при процессе передачи потомкам.

При реализации генетической информации происходит декодирование: речь нуклеиновых кислот (четыре буквы А, Т, Г, Ц) должна быть переведена на язык белков (20 аминокислот, условно 20 букв). Это возможно благодаря кодовому принципу: одной аминокислоте соответствует запись из трех нуклеотидов в нуклеиновой кислоте. Например, последовательность аденин, аденин, аденин (ААА) кодирует фенилаланин, а АТТ — лизин. Поэтому генетический код — триплетный. Но с 4 букв (А, Т, Г, Ц) можно получить 64 различные комбинации по 3 буквы ($4^3 = 64$), а в природе существует только 20 аминокислот.

Другие триплеты (кодоны) — сочетание трех нуклеотидов — не лишние. Три из них (АТЦ, АЦТ, АТТ) — терминирующие, они свидетельствуют о конце синтеза, знаки препинания (как в языке — точка, запятая и т.д.). Другие обеспечивают запас прочности генома, так кодирующих те же аминокислоты, что и основные триплеты. Поэтому генетический код — вырожденный: одна аминокислота может быть закодирована в ДНК 2-4 триплетными. В одном гене кодоны расположены друг за другом, как слова в предложении, не перекрываются, что упрощает запись и делает его стабильным.

Генетический код не перекрывается. У всех живых организмов на Земле в генетической программе те же триплеты кодируют те же аминокислоты. Генетический код еще и в н и ве реальный. Имеем запомнить признаки генетического кода / триплетных, вырожденный, не перекрывается, универсальный. Но в каждом правиле существуют исключения. В последние 30 лет исследователи изучали и собирали такие исключения, их оказалось много, возникли новые гипотезы и теории, что и привело к возникновению современной мобильной генетики, которая пришла на смену генетике классической.

Информационные молекулы содержатся в клетках не только в ядре (основная, самая программа), но и в некоторых органеллах цитоплазмы:

митохондриях, плазмидах, других ДНК-или РНК-носителях. Так в митохондриях код отличается от универсального.

Реализация генетической информации, а именно синтез белка, осуществляется в цитоплазматических структурах — рибосомах. Для того чтобы план строения белка донести от ДНК к рибосоме, клетка имеет специальные механизмы и подвижные молекулы. Из того, что знаем сейчас, механизм называется транскрипцией, а молекулы — это различные виды РНК. Транскрипция означает переписывание информации с ДНК на РНК. Главным же в синтезе белка является трансляция — перевод информации с одного языка на другой.

Кодовый запис о структуре белковой молекулы переносится с ДНК на информационную (матричную) РНК (она же РНК-переносчик, лат. «Мессенджер», синонимы: иРНК, мРНК, т-РНК) путем комплементарного, матричного синтеза РНК на ДНК, сравнимый с репликацией (синтез ДНК на ДНК). Молекула РНК копирует весь ген эукариот вместе с незначимыми интроны. Такие временные молекулы называются пре-иРНК.

Молекулы пре-иРНК перемещаются из ядра к цитоплазме, а именно к рибосоме, состоящие из рибосомных РНК (рРНК) и белков. По пути пре-иРНК модифицируются, из них удаляются незначащие участки кода (интроны). Значение интронов, видимо, очень важное, но еще полностью не расшифровано.

Третий вид РНК составляют относительно маленькие (десятки нуклеотидов) молекулы транспортных РНК (тРНК), которые приносят к рибосоме специфические активированные аминокислоты, ставят их на соответствующее место в полипептидной цепи, определенное кодоном иРНК. Только молекула тРНК имеет в своем составе антикодон, комплементарный кодону иРНК.

Мы уже определили, чем РНК отличается от ДНК. Белок синтезируется по плану иРНК, поэтому и триплеты, кодирующие аминокислоты, чаще

записываются комплементарной языке РНК, для фенилаланина это будет УУУ, терминирующие кодоны УАГ, УГА, УАА.

Таким образом процесс реализации наследственной информации от гена к фену (синтез белка — один из них) имеет вид ДНК > РНК > белок. Долгое время эта формула считалась центральной догмой генетики.

В наше время мобильной генетики установлено существование процесса переноса информации от РНК к ДНК. Обратная транскрипция была предусмотрена и открыта С.М. Гершензоном и экспериментально окончательно доказана лауреатом Нобелевской премии Г. М. Темин. Если к этому добавить репликацию ДНК на ДНК и РНК на РНК (возможно, существует в некоторых вирусах), то окончательный запись потока информации будет иметь такой вид:

Синтез нуклеиновых кислот на матрице белка пока не доказан и, наверное, блокирован законами термодинамики. Для его проблематичного существования необходимыми должны быть неизвестны нам энергоснабжающие источники.

В конце XX в. стало известно, что в геноме человека содержится 50-100 тыс. различных генов. Они кодируют продукты, необходимые для существования клетки (кухонные гены), организму (гены роскоши), или, по нашему мнению, не кодирующие ничего. Последние сейчас называются эгоистичными генами, избыточной генетической информацией, который может содержать или память о прошлой эволюции, или быть резервом (планом) будущей эволюции.

Весь объем генетической информации находится под строгим контролем регуляторных механизмов. Все гены взаимодействуют между собой, образуя единую систему. Регуляция их активности происходит как за относительно простой схеме — продукт гена изменяет активность того или иного гена, так и путем сложного многоуровневого механизма. Он включает процессы регуляции активности генов на этапах транскрипции (до, во время и после нее), трансляции (до, во время и после нее), согласованной,

каскадной групповой регуляции трудовой генов (их экспрессия), участия в этом процессе гормонов (общие сигнальные вещества), химической модификации ДНК и других общих модификаторов экспрессии генов. Экспрессия отдельного гена зависит от того, в каком составе (генотипе) этот ген находится. Поэтому существует разная пенетрантность (проявка) и экспрессивность (выражение) генов как нормальных (дикий тип), так и мутантных аллелей.

Эти понятия впервые введены в генетику М.В.Тимофеевичем-Ресовский. Конкретный генотип человека определяет степень пенетрантности и экспрессивности определенных болезней, даже в отсутствии клинической картины патологии при наличии, казалось бы, необходимого количества мутантных генов.

Контрольные вопросы:

1. Что составляет молекулярные основы наследственности?
2. ДНК – это?
3. РНК – это?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 5 «НЕХРОМОСОМНОЕ (ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ) НАСЛЕДОВАНИЕ»

Содержание:

1. Особенности нехромосомного наследования
2. Генетический материал полуавтономных органоидов

Теоретическая часть

Особенности нехромосомного наследования. Для того, чтобы какая-либо структура могла выполнять функции материального носителя наследственности и обеспечивать количественные закономерности наследования, она должна содержать нуклеиновые кислоты, обладать способностью к самовоспроизведению и точно распределяться по дочерним клеткам при делении. Всем трем условиям полностью соответствуют только хромосомы. Наследование, определяемое хромосомами, получило название ядерного или хромосомного.

Полуавтономные органоиды цитоплазма – митохондрии и пластиды – содержат ДНК и обладают способностью к саморепродукции. В тех случаях, когда эти органоиды являются материальной основой наследования, оно называется нехромосомным или цитоплазматическим.

В отличие от хромосом, митохондрии и пластиды не распределяются при делении в дочерних клетках с абсолютной точностью. Ядро содержит ограниченное и характерное для каждого вида число хромосом. В цитоплазме же обычно большое количество митохондрий и пластид, и число их непостоянно. Ядро в большинстве случаев не способно исправить и заместить возникшие дефекты хромосом. Поврежденные и неспособные к размножению органоиды цитоплазмы могут быть замещены путем размножения одноименных неповрежденных структур.

В настоящее время используют следующие критерии, позволяющие отличить цитоплазматическую наследственность от хромосомной:

1. различия в результатах реципрокного скрещивания;

2. наличие связи между наследованием определенных признаков и переносом в клетку определенной цитоплазматической ДНК;

3. невозможность выявить сцепленность определенных генов с хромосомными генами;

4. отсутствие типичного количественного расщепления признаков в потомстве в соответствии с законами Менделя, зависимо от расхождения гомологичных хромосом в мейозе;

5. независимость проявления признака от замены ядер в клетках.

Приведенные особенности обуславливают различия в закономерностях наследования, определяемых этими элементами клетки. Поскольку и у растений, и у животных яйцеклетка содержит много цитоплазмы, а мужская гамета ее практически лишена, следует ожидать, что цитоплазматическое наследование, в отличие от хромосомного, должно осуществляться по материнской линии.

Генетический материал полуавтономных органоидов. Генетический материал митохондрий включает несколько десятков кольцевых и линейных двуспиральных правозакрученных молекул ДНК, которые отличаются по нуклеотидному составу от ядерной ДНК (яДНК) и не связаны с гистонами. Длина одной молекулы митохондриальной ДНК (мтДНК) – 15-75 тп, что позволяет кодировать несколько десятков белков. В мтДНК закодированы транспортные и рибосомальные РНК и некоторые ферменты. Этого недостаточно, чтобы обеспечить существование и функционирование митохондрий, поэтому часть белков (ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, белки митохондриальных рибосом, субъединицы дыхательных ферментов) поступает в готовом виде из цитоплазмы или в виде соответствующих иРНК, закодированных в яДНК. Митохондриальная ДНК человека представлена кольцевой молекулой длиной 16569 нп и содержит 13 белковых генов, 22 гена тРНК и 2 гена рРНК. Кодировующие последовательности разделены короткими межгенными некодирующими участками, для которых характерен

высокий уровень полиморфизма, обусловленный заменами, потерями и вставками нуклеотидов.

Генетический материал хлоропластов включает несколько десятков кольцевых двуспиральных правозакрученных молекул ДНК, которые являются копиями друг друга. ДНК хлоропластов (хлДНК) также отличается по нуклеотидному составу от яДНК и не связана с гистонами, однако имеются и черты сходства с яДНК (некоторые гены тРНК имеют интронно-экзонную структуру). Длина одной молекулы хлДНК – несколько сотен тп, что примерно в 10 раз больше, чем одиночная молекула мтДНК. ДНК хлоропластов кодирует часть тРНК и рРНК и некоторые белки. Большая часть белков хлоропласта закодирована в яДНК.

Генетическая информация, закодированная в полуавтономных органах, в наибольшей степени наследуется через цитоплазму, т.е. по материнской линии. Считается, что мтДНК и хлДНК в наименьшей степени подвержены действию естественного отбора. Это обстоятельство используют в микросистематике для выявления родственных связей между группами организмов.

Однородность мтДНК человека позволяет предположить, что современное человечество происходит от немногих особей женского пола. Существует гипотеза, согласно которой некоторые гены способны переходить из одних типов ДНК в другие, например, из хлДНК в мтДНК. Кроме этого, генетический код полуавтономных органоидов обладает специфичностью, например, триплет АУА в яДНК кодирует изолейцин

Контрольные вопросы:

1. Критерии отличия цитоплазматической наследственности от хромосомной?
2. Объясните подробно про генетический материал полуавтономных органоидов?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 6 «МУТАЦИИ И РЫБ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУТАГЕНЕЗА В СЕЛЕКЦИИ РЫБ»

Под индуцированным (искусственно вызываемым) мутагенезом понимают возникновение наследственных изменений в результате воздействия на организм особыми агентами-мутагенами. В зависимости от природы мутагена различают радиационный и химический мутагенез. Как известно, частота естественных мутаций невелика и составляет примерно 10^{-5} (в расчете на 1 ген за одно поколение). Индуцированный мутагенез позволяет значительно повысить частоту мутаций. Таким образом, с помощью данного метода удастся обеспечить одно из наиболее важных условий успешной селекции - повышение наследственной изменчивости селекционируемого материала.

Открытие явления индуцированного мутагенеза в 20-30-х годах нашего столетия связано с именами крупных советских и зарубежных ученых: Г.А. Надсона, Г.С. Филиппова, В.В. Сахарова, М.Е. Лобашева, И.А. Раппопорта (СССР), Г. Меллера, Л. Стадлера (США) и Ш. Ауэрбах (Англия). Позднее, как в области теоретических достижений, так и практического применения данного метода на культурных растениях и микроорганизмах, были достигнуты значительные успехи.

Основной целью применения индуцированного мутагенеза в селекции рыб, так же как в селекции растений, является увеличение генетической изменчивости за счет новых (индуцированных) в том числе и полезных мутаций. Речь идет в первую очередь о мутациях генов, влияющих на проявление признаков продуктивности: роста, выживаемости, устойчивости к заболеваниям и др. При этом не исключается возможность возникновения каких-то качественных мутаций, что ведет к появлению особей с новыми, представляющими интерес для селекционера свойствами. На рыбах уже используется метод химического индуцированного мутагенеза. Разработка этого метода была начата в СССР в середине 60-х годов по

инициативе В.С. Кирпичникова, а в дальнейшем успешно продолжена Р.М. Цоем.

Основные сведения, касающиеся закономерностей химического мутагенеза у рыб, получены в работах по селекции казахстанского карпа; объектами исследований являлись также пелядь, радужная форель, белый амур, белый толстолобик, буффало. В работах с рыбами в качестве мутагенов были использованы различные алкилирующие соединения с высокой биологической активностью (супермутагены); этиленимин (ЭИ), нитрозоэтил мочевины (НЭМ), диметилсульфат (ДМС) и др. Эти соединения, избирательно воздействуя на ДНК хромосом, повреждают ее, что может привести к возникновению мутаций. Для получения индуцированных мутаций обычно обрабатывают половые клетки (икру, сперму) или ранние зародыши рыб. Генетический эффект тем выше, чем доступнее ядро клетки действию мутагена. С этой точки зрения более эффективна обработка мутагеном зрелых спермиев. При обработке спермиев снижается также вероятность накопления мутагена в цитоплазме половой клетки и его последующего влияния на развивающийся зародыш. Мутагенный эффект алкилирующих соединений доказан на примере генов чешуйного покрова у карпа. Так, при обработке спермы карпа НЭМ обнаружены мутации аллеля $n > N$ и аллеля $S > s$; при обработке спермы карпа ДМС эти две мутации обнаружены одновременно. Средняя частота возникновения доминантной мутации N среди потомков, полученных с использованием НЭМ и ДМС, составила $1,1 \times 10^{-3}$ (45 мутантных особей среди 40 323 шт. сеголетков) и была более чем на два порядка выше частоты естественного мутирования.

Другим подтверждением возможности мутагенного эффекта алкилирующих соединений является повышение частоты хромосомных перестроек (разрывов хромосом, слипаний и др.), что легко регистрируется при анализе эмбриональных митозов (рис. 22).

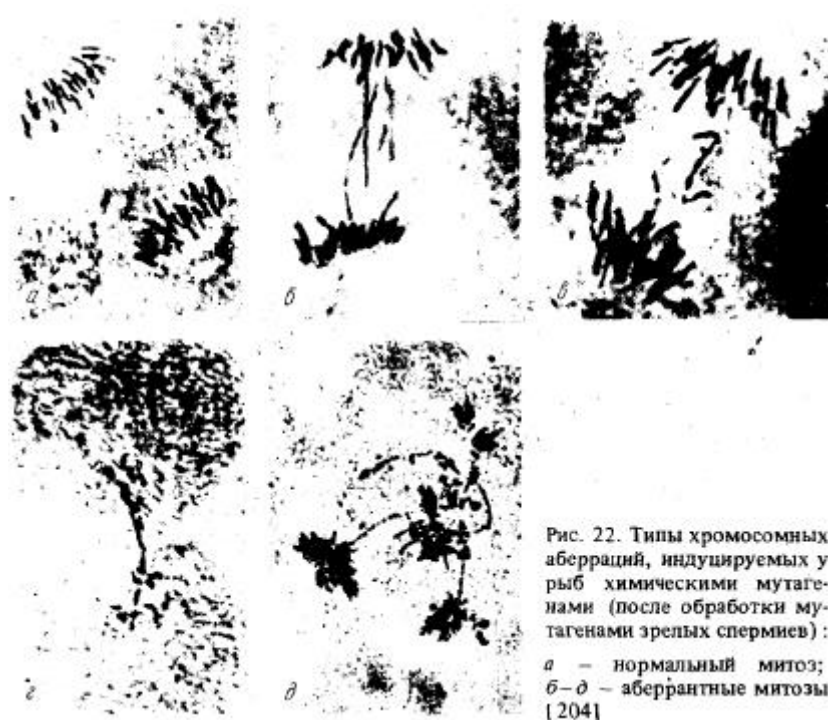


Рис. 22. Типы хромосомных aberrаций, индуцируемых у рыб химическими мутагенами (после обработки мутагенами зрелых спермиев):
а – нормальный митоз;
б–е – aberrантные митозы [204]

Установлена определенная специфичность мутагенов по характеру вызываемых ими мутаций. Так, например, при обработке спермы карпа НЭМ чаще возникают точковые (генные) мутации, а при обработке спермы ДМС - хромосомные перестройки.

Косвенным подтверждением мутагенного действия химических соединений является увеличение фенотипической изменчивости различных признаков. У разных видов рыб чувствительность к одному и тому же мутагену может быть различной. При одинаковых дозах воздействия НЭМ на спермин (концентрация мутагена 0,0025-0,02 %) выживаемость эмбрионов в мутагенных потомствах составила (в % от контроля): 36,5-0,0 (белый толстолобик), 63,8-0,0 (белый амур) и 111,3-26,1 (каrp). Эти данные свидетельствуют о меньшей чувствительности к мутагену у полиплоидных видов (каrp), чем у диплоидных (белый амур и белый толстолобик). Многие мутагены активны в широком диапазоне концентраций, но наиболее эффективными являются концентрации мутагена, близкие к полuleгальным. Сравнительная оценка многих алкилирующих соединений с использованием цитогенетического и других тестов позволила выявить наиболее эффективные мутагены. Ими оказались НЭМ и ЭИ.

Мутагенные потомства первого поколения характеризуются пониженной выживаемостью и повышенным числом уродливых особей, что является следствием индуцированных вредных, в том числе летальных доминантных мутаций. Основная гибель особей - носителей таких мутаций - происходит в эмбриогенезе, начиная с поздней бластулы; значительная часть потомков погибает в период вылупления. Среди жизнеспособной части потомства встречаются разнообразные уроды. Например, в мутагенных потомствах карпа обнаружено 23 типа уродств. Разные мутагены индуцируют различный спектр аномалий. Наиболее частыми нарушениями (встречающимися при использовании практически всех мутагенов) оказались искривление позвоночника, уродства головы и рта. При высоких дозах мутагенов уроды могут составлять в потомстве 20-30 %.

Как показали работы с казахстанским карпом, в мутагенном потомстве первого поколения наблюдается повышенная фенотипическая изменчивость по многим количественным признакам, в том числе и по важнейшему показателю продуктивности - массе тела. В отдельных потомствах коэффициент вариации массы тела возрастал в два-три раза по сравнению с контролем, а среди потомков появлялись особи, превышающие по темпу роста лучших контрольных рыб более чем в два раза. К сожалению, данных о "вкладе" генетических факторов в повышение фенотипической изменчивости и появление такого рода рекордистов пока еще не имеется. Получение второго и последующих поколений селекции осуществляют обычно без применения мутагенеза. Важнейшей задачей является элиминация индуцированных вредных мутаций в селекционируемом материале. В отношении доминантных мутаций это достигается интенсивным отбором. Гораздо сложнее обстоит дело с вредными рецессивными мутациями, которые при обычном разведении остаются в скрытом состоянии в течение многих поколений. Для ускоренной элиминации рецессивных мутаций целесообразно применение индуцированного геногенеза. У карпа, по имеющимся данным, уже во

втором геногенетическом поколении 80-90 % всех генов переходит в гомозиготное состояние, что приводит к фенотипическому проявлению многих рецессивных мутаций. Одновременно таким же путем могут быть выявлены и полезные мутации.

Таким образом, использование индуцированного геногенеза позволяет резко ускорить мутагенную селекцию. В этой связи индуцированный геногенез был включен в программу селекции казахстанского карпа. Сравнительно недавно на рыбах были начаты исследования по радиационному мутагенезу с использованием в качестве мутагена ультрафиолета.

Применение индуцированного мутагенеза особенно целесообразно при сильном истощении генетической изменчивости в селекционируемом стаде (что может быть результатом предшествующей интенсивной селекции), когда обычные методы селекции становятся неэффективными.

Контрольные вопросы:

1. Раскройте понятие индуцированный мутагенез?
2. С какими учеными связано открытие явления индуцированного мутагенеза?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 7 «ЦЕЛИ И МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ»

Содержание:

1. Понятие селекции
2. Особенности селекционно-племенной работы в рыбоводстве

Теоретическая часть

Понятие селекции.

Селекция животных - это наука о методах создания новых пород и гибридов сельскохозяйственных животных. Селекция разрабатывает способы и методы воздействия на сельскохозяйственные растения и животных с целью изменения их наследственных качеств в нужном для человека направлении.

Селекционная работа в животноводстве - это комплекс мероприятий, направленных на выведение новых пород, внутривидовых типов, линий, и гибридов сельскохозяйственных животных, отличающихся определёнными хозяйственно-полезными признаками и их поддержание на достигнутом уровне.

Племенной работой в животноводстве называется комплекс мероприятий по совершенствованию пород сельскохозяйственных животных.

Селекционная работа с карпом в нашей стране была начата в 30-е годы XX столетия. В настоящее время создан ряд культурных пород, приспособленных к интенсивному выращиванию в конкретных эколого-климатических условиях. Приблизительно в это же время появляются первые труды отечественных ученых в области генетики и селекции прудовых рыб. Большое значение для совершенствования селекционной работы имеют исследования по генетике чешуйного покрова карпа, проведенные в довоенные годы В.С. Кирпичниковым, К.А. Головинской и В.И. Балкашиной.

В послевоенные годы были организованы работы по селекции ропшинского, белорусского и парского карпов, открыто явление естественного гиногенеза у серебряного карася.

В 60-70 годах XX века вопросы селекции и племенного дела в рыбоводстве интенсивно разрабатывали ведущие отраслевые научно-исследовательские институты. Были начаты работы по созданию ряда районированных пород карпа - краснодарского, среднерусского, казахстанского, сарбоянского и других. В эти годы были проведены исследования по частной генетике карпа: изучение окраски В.Я. Катасоновым и биохимические исследования К.А. Трувелером, Л.И. Москочкиным и другими. Отечественными учеными были разработаны специальные генетические методы селекции в рыбоводстве: индуцированный гиногенез и полиплоидия, генетическое и гормональное регулирование пола, индуцированный ультрафиолетовый и химический мутагенез.

Значительный вклад в становление генетики и селекции рыб внесли А.И. Кузема, В.С. Кирпичников, К. А. Головинская, Д.П. Поликсенов, Ю. П. Боброва, Р.М. Цой, В.Я. Катасонов, Н.Б. Черфас, В.А. Коровин, Ю.И. Илясов и многие другие отечественные исследователи и селекционеры.

Особенности селекционно-племенной работы в рыбоводстве.

Рыбы являются более удобным объектом для селекции, чем сельскохозяйственные животные, благодаря высокой плодовитости, относительно небольшим размерам, наружному оплодотворению и сравнительно небольшим затратам на выращивание производителей. Плодовитость рыб исчисляется тысячами и миллионами личинок. Это позволяет вести высокоинтенсивный отбор, в десятки и сотни раз превышающий возможности отбора на сельскохозяйственных животных. Небольшие размеры и невысокая стоимость производителей в сочетании с высокой плодовитостью позволяют концентрировать селекционную работу в ряде хозяйств, что значительно расширяет возможности целенаправленной селекции. Благодаря наружному оплодотворению появляется возможность

прямого экспериментального воздействия на половые клетки и эмбрионы. Это существенно расширяет возможности селекции и делает возможным применение специальных генетических методов (индуцированный мутагенез, индуцированный гиногенез, андрогенез, индуцированная полиплоидия и др.), что при работе с сельскохозяйственными животными весьма затруднительно, а в большинстве случаев - практически неосуществимо.

Однако, наряду с преимуществами, селекционная работа с рыбами имеет ряд трудностей. Большинство видов рыб довольно поздно созревают. Обитание рыб в водной среде делает невозможным непосредственный контроль объектов селекции.

В селекционной работе с сельскохозяйственными животными при отборе учитывают индивидуальные признаки (удой, живая масса, настриг шерсти и др.). В отличие от этого в селекции рыб большое значение имеют групповые показатели (выход продукции с единицы площади прудов, затраты корма на центнер привеса и т.д.).

В животноводстве селекционная работа, как правило, включает в себя лишь небольшую долю племенных мероприятий. Объясняется это разными требованиями, предъявляемыми к работе с селекционируемым материалом и производителями, предназначенными для промышленного воспроизводства. При селекции недопустимо применение каких-либо оптимизирующих факторов, т.к. это может привести к закреплению качеств, неприемлемых для промышленной технологии. При проведении племенной работы для производителей создаются максимально благоприятные условия, обеспечивающие хороший нагул, способствующий улучшению воспроизводительной способности.

В рыбоводстве селекционная и племенная работа тесно взаимосвязаны разными формами работ с племенным материалом. А так как селекционная работа и племенная работа имеют разные цели и особенности, указанные выше, то они выполняются в разных категориях рыбоводных хозяйств. Созданием новых и совершенствованием существующих пород занимаются

селекционно-племенные хозяйства высшего типа, являющиеся, как правило, опытными базами исследовательских институтов. Селекционные хозяйства могут также входить в состав полносистемных хозяйств и рыбопитомников в виде участка. Выращивание производителей, ремонтного молодняка и массовое получение молоди для нужд промышленных хозяйств выполняют в племрассаdnиках-репродукторах. Репродукторы специализируются на разведение какой-либо породы или на получении промышленных гибридов от скрещивания двух и более пород. В нашей стране есть репродукторы украинского, парского, ропшинского и других пород карпа.

Концентрация племенной работы в ограниченном числе хозяйств значительно упрощает её организацию и облегчает контроль племенного дела, обеспечивает высокую производительность труда, способствует более быстрому внедрению селекционных достижений в производство, является предпосылкой снижения опасности распространения заразных болезней. Фактическое число репродукторов в регионе должно быть больше расчетной их потребности на случай возникновения аварий и вспышек заразных заболеваний, когда получение или вывоз молоди из хозяйства становится невозможным.

Контрольные вопросы:

1. Что такое селекция?
2. Расскажите про первые селекционные работы?

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 8 «ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СЕЛЕКЦИИ. ГИБРИДИЗАЦИЯ»

Содержание:

1. Генетические методы селекции рыб. Индуцированный мутагенез
2. Гиногенез
3. Андрогенез

Теоретическая часть

Генетические методы селекции рыб. Индуцированный мутагенез.

Индуцированный мутагенез - способ повышения генетической изменчивости за счет возникновения мутаций при обработке гамет мутагенами физической (ионизирующее и ультрафиолетовое излучение) или химической (нитрозоэтилмочевина, диметилсульфат и др.) природы.

В качестве мутагенов в селекции рыб целесообразно применять алкилирующие соединения и ультрафиолетовое излучение, поскольку они индуцируют в основном генные мутации. Использование ионизирующих излучений приводит к образованию хромосомных перестроек, обуславливающих значительное (до 100%) снижение жизнеспособности и появление большого числа уродств и аномалий. Поэтому оно не нашло применения в селекции рыб.

Для получения мутагенного потомства икру осеменяют спермой, обработанной мутагенами. В опытах Р.М. Цоя и сотрудников максимальное увеличение генетической изменчивости наблюдалось при использовании химических мутагенов в концентрациях близких к полуметальным, т.е. при которых происходит гибель около 50% рыб. Сравнительная оценка ряда химических мутагенов показала, что в селекции рыб наиболее перспективно применение нитрозоэтилмочевины и этиленимина.

Впервые попытка использования индуцированного мутагенеза была сделана при селекции краснодарского карпа. Химический мутагенез был также использован в селекции казахстанского карпа, что позволило

значительно увеличить селекционный дифференциал и повысить эффективность отбора.

Использование индуцированного мутагенеза особенно актуально при снижении генетической изменчивости селекционируемого материала, когда применение традиционных методов селекции малоэффективно.

Гиногенез

Гиногенез - это форма полового размножения организмов, при которой сперматозоид, проникая в яйцеклетку, стимулирует её развитие, но его ядро не сливается с ядром яйца и не участвует в последующем развитии зародыша. Это процесс называют ложным оплодотворением - псевдогамией. По этой причине иногда гиногенез рассматривают как одну из форм партеногенеза.

Естественный гиногенез обнаружен у некоторых нематод, костистых рыб, земноводных и многих видов покрытосеменных растений. Иногда в гиногенетических популяциях самцы не известны и яйца осеменяются спермой других видов (например, икра карася молоками щуки). Экспериментально гиногенез может быть получен при осеменении яиц спермой неродственных видов, инактивацией ядра сперматозоида физическими или химическими агентами или механическим удалением мужского пронуклеуса из яйца. Однако развивающиеся при этом гаплоидные зародыши обычно нежизнеспособны. Для получения диплоидного гиногенеза нужно подавить цитотомию одного из делений созревания яйцеклетки или одного из первых делений дробления зиготы. В первом случае будет получена диплоидная яйцеклетка, во втором - произойдёт диплоидизация одного из бластомеров.

Гиногенез используют для получения строго гомозиготных организмов, а также особей одного, обычно женского, пола. В рыбоводстве для получения высокоинбредных линий, предназначенных для промышленной гибридизации, применяется индуцированный гиногенез.

При получении диплоидных гиногенетических самок необходимо решить две задачи: как генетически инактивировать мужские хромосомы и как обойти редукцию хромосомного комплекса.

Для инактивации мужских хромосом сперму обрабатывают высокими дозами мутагенов. С этой целью сперму облучают γ -, X-, и ультрафиолетовыми лучами (радиационный гиногенез), реже обрабатывают химическими веществами (химический гиногенез). При этом подбираются такие дозы мутагенов, при которых мужские хромосомы оказываются полностью разрушенными, но спермий сохраняет способность проникать в яйцеклетку и активировать ее. Более приемлем радиационный гиногенез, поскольку при химическом гиногенезе существует опасность проникновения мутагена в яйцеклетку, что может негативно повлиять на развитие эмбриона.

Для диплоидизации женского набора хромосом используют чаще всего воздействие на икру низкими или высокими сублетальными температурами (температурный шок). Это воздействие проводят до осеменения (стадия метафазы II), вскоре после осеменения (стадия анафазы II) или в период первого деления дробления зародыша. Как показали цитологические исследования, проведенные Д.Д. Ромашовым и В.Н. Беляевой, температурное воздействие наиболее эффективно вскоре после осеменения при прохождении хромосомами стадии анафазы II. Эффективность температурного шока определяется температурой и продолжительностью воздействия, а также состоянием хромосом до начала воздействия. Процесс диплоидизации женских хромосом при индуцированном гиногенезе протекает не всегда достаточно точно, что приводит к возникновению большого количества анеуплоидных гиногенетических зародышей.

С помощью гиногенеза можно решить такие важные вопросы, как определение степени паратипической изменчивости, точная оценка величины инбредной депрессии у рыб, быстрое выявление и анализ наследования рецессивных генов и др.

В селекции индуцированный гиногенез используется, прежде всего, для ускоренного получения инбредных линий с целью последующей промышленной гибридизации на получение эффекта гетерозиса.

Андрогенез

Андрогенез - это такая форма размножения организмов, при которой в развитии зародыша участвует мужское ядро, привнесённое в яйцо сперматозоидом, а женское не участвует. Естественный андрогенез происходит у некоторых видов наездников, кукурузы, табака в тех случаях, когда ядро яйцеклетки погибает до оплодотворения. В таком случае оплодотворение оказывается ложным (псевдогамия). Андрогенез может быть вызван искусственно. Для этого нужно механически удалить или инактивировать женское ядро. Полученные гаплоидные зародыши обычно имеют низкую жизнеспособность.

Явление андрогенеза используют при исследовании роли ядра в наследственности, изучения ядерно-цитоплазматического взаимодействия, для получения строго гомозиготных организмов, а также животных одного пола.

Андрогенез представляет особый интерес в связи с проблемой сохранения генофондов исчезающих видов рыб. Сохранить редкие и исчезающие виды рыб можно при осеменении криоконсервированной спермой исчезающего вида инактивированных яйцеклеток самок близкого вида и удвоении мужских хромосом.

Для получения андрогенетического потомства на первом этапе инактивируют яйцеклетки большими дозами радиации и осеменяют их. На втором этапе блокируют первое деление дробления гаплоидных зародышей, что приводит к получению жизнеспособных диплоидных андрогенетических рыб. Андрогенез, как и гиногенез можно использовать при создании клонов рыб и для получения высокоинбредных самцов без применения гормональной инверсии пола.

В настоящее время получены андрогенетические потомства у радужной форели, карпа и некоторых других видов рыб.

Контрольные вопросы:

1. Раскройте понятие индуцированного мутагенеза?
2. Расскажите о понятии гиногенез?
3. Андрогенез – это?