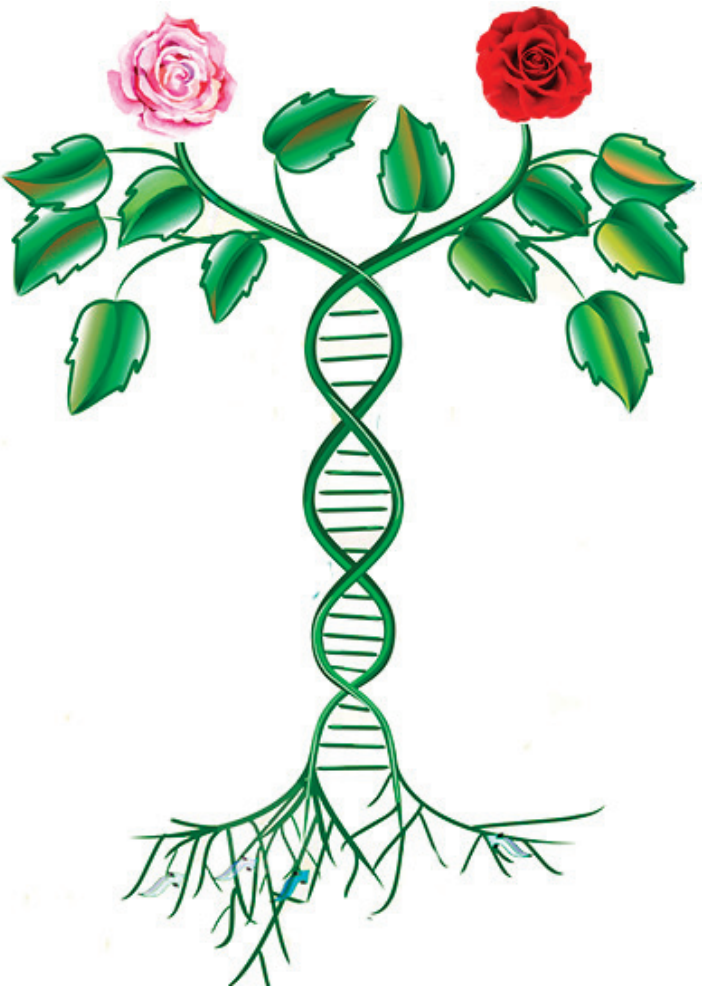
О. Л. Січняк

ГЕНЕТИКА З ОСНОВАМИ СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

О. Л. Січняк

ГЕНЕТИКА З ОСНОВАМИ СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 575:631.527(075.8)
С41

Рецензенти:

В. О. Лях, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри садово-паркового господарства та генетики Запорізького національного університету;

Л. В. Попова, кандидат біологічних наук, доцент кафедрі захисту, генетики і селекції рослин Одеської державної аграрної академії;

О. П. Сержук, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва.

Рекомендовано до друку науково-методичною радою
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 3 від 26.10. 2021 р.

Січняк О. Л.

С41 Генетика з основами селекції рослин : навч. посіб. / О. Л. Січняк. – Одеса. – Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 192 с.; іл., табл.

ISBN 978-617-689-529-9

Навчальний посібник до курсу «Генетика з основами селекції рослин» містить сучасну інформацію по основним розділам курсу, включаючи історію розвитку, докладний огляд методів, інформацію про молекулярні основи спадковості, характер успадковування різних типів ознак, механізми мінливості, відомості про генетику онтогенезу, генетику популяцій, генетичні основи селекції та генетичну інженерію.

Для студентів спеціальності 206 «Садово-паркове господарство» першого (бакалаврського) рівня вищої освіти.

УДК 575:631.527(075.8)

ISBN 978-617-689-529-9

© Січняк О. Л., 2022
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022

ЗМІСТ

Передмова 5
Розділ І. Матеріальні основи спадковості 6
1. Генетика як наука 6
2. Матеріальні основи спадковості 10
2.1. Клітина як основа спадковості та відтворення 10
2.2. Структура ДНК 11
2.3. Особливості спадкових структур еукаріот 14
2.4. Реплікація ДНК 17
2.5. Репарація ДНК 21
2.6. Реалізація генетичної інформації 22
3. Закономірності успадковування ознак 30
3.1. Генетична символіка 30
3.2. Закони Г. Менделя 31
3.3. Взаємодія неалельних генів 35
3.4. Пенетрантність і експресивність. Плейотропний ефект гена 42
3.5. Генетика статі та успадкування ознак, зчеплених зі статтю 44
3.6. Зчеплення генів і кросинговер 50
3.7. Позахромосомне (цитоплазматичне) успадковування 55
Питання для самоконтролю 59
Розділ ІІ. Генетичні засади мінливості та окремі проблеми генетики 62
4. Типи мінливості 62
4.1. Неспадкова мінливість 62
4.2. Спадкова мінливість 68
4.3. Мутаційна теорія та класифікація мутацій 68
4.4. Генні мутації 71
4.5. Хромосомні перебудови 72
4.6. Геномні мутації 80
4.7. Способи передачі спадкової інформації у бактерій 92
4.8. Транспозиції 95
5. Генетичні основи онтогенезу 101
6. Генетика популяцій і генетичні основи еволюції 111
Питання для самоконтролю 123

Розділ ІІІ. Селекція і генетична інженерія рослин 126
7. Селекція рослин 126
7.1. Поняття про сорт 128
7.2. Загальна схема селекційного процесу 133
7.3. Етапи селекційного процесу 134
7.4. Методи створення вихідного матеріалу 135
7.5. Явище гетерозису. Генетичні механізми гетерозису 137
7.6. Гібриди, що застосовуються в селекції 139
7.7. Методи добору 140
7.8. Селекційні оцінки та їх класифікація 145
7.9. Методика дослідної справи в селекції і насінництві 149
7.10. Методи біотехнології в селекції рослин 149
8. Генетична інженерія рослин 151
8.1. Ферменти генетичної інженерії 151
8.2. Вектори 154
8.3. Банки генів 157
8.4. Етапи отримання трансгенних рослин і методи трансформації рослинних клітин 160
8.5. Методи трансформації рослинних клітин і експресія чужорідних генів в геномі рослин 168
8.6. Докази трансформації рослин 171
8.7. Отримання трансгенних рослин, стійких до стресових факторів 173
8.8. Отримання трансгенних рослин для медичних цілей 176
8.9. Трансформація пластомного геному рослин 177
8.10. Екологічні проблеми генетичної інженерії 179
8.11. Інші проблеми генетичної інженерії 182
Питання для самоконтролю 183
Предметний покажчик 185
Рекомендована література 190

ПЕРЕДМОВА

В останні роки генетика прочно утримує позиції інтегральної біологічної дисципліни. Завдяки досягненням сучасної генетики успішно вирішуються питання виробництва продуктів харчування за рахунок створення високопродуктивних і стійких до хвороб сортів рослин і порід тварин. Завдяки успіхам генетичної інженерії створюються організми з принципово новими властивостями, відкриваються можливості створення і виробництва високоефективних ліків та сироваток, розробляються питання управління генофондами популяцій найбільш цінних тварин і рослин.

Майбутні фахівці садово-паркового господарства мають засвоїти системні знання про спадковість і мінливість живих організмів, ознайомитися з методами, які мають практичне значення для обробітку декоративних рослин, створення компонентів рослинних угруповань.

Основними завданнями посібника є забезпечення студентів найбільш суттєвою інформацією для самостійної роботи і засвоєння відомостей про матеріальні носії спадкової інформації, про структуру генів, геномів і генотипів, про основні молекулярно-генетичні механізми збереження, захисту і передачі спадкової інформації, а також про шляхи її реалізації в клітині; ознайомлення студентів з основними типами успадковування хромосомних і позахромосомних генів, а також з основними генетичними закономірностями процесу успадковування; усвідомлення основних критеріїв спадкової і неспадкової мінливості, ознайомлення з різними типами мутаційної мінливості, усвідомлення ролі різних типів мінливості в процесах адаптації і еволюції, а також в селекційному процесі; огляд найважливіших окремих розділів генетики, а саме: генетики індивідуального розвитку, генетики популяцій, селекції рослин тощо. Особлива увага приділена відомостям про методи генетичної інженерії рослин та її досягнення і роз'ясненням про справжні і надумані проблеми використання генномодифікованих рослин.

Навчальній посібник є доопрацьованим, розширеним та вдосконаленим виданням, що базується на матеріалах посібника «Генетика: навчальний посібник для студентів ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» галузі знань «Хімічна та біоінженерія» денної і заочної форм навчання / О. Л. Січняк, Л. В. Капрельянц, О. О. Килименчук. – Херсон: Олді-Плюс, 2018», а також містить ілюстрації, що знаходяться у вільному доступі в інтернеті, з модифікаціями.

І. МАТЕРІАЛЬНІ ОСНОВИ СПАДКОВОСТІ

1. Генетика як наука

Генетика в останні роки стала серцевиною біологічної науки. Лише в рамках генетики різноманітність життєвих форм і процесів може бути осмислена як єдине ціле. Генетика – наука про *спадковість* та її реалізацію у розвитку, про закономірності успадковування генетично закріплених ознак. Спадковість можна визначити, як біологічний процес, який зумовлює подібність між батьками і нащадками. У поняття спадковості по М. Є. Лобашеву входять чотири групи явищ: організація генетичного матеріалу, його експресія, відтворення (реплікація) і передача від одного покоління до іншого. Отже, генетика об'єднує в одне ціле ембріологію і біологію розвитку, морфологію і фізіологію, об'єднує в єдину науку – біологію. Іншою проблемою генетики є проблеми *мінливості*, загальні для будь-якого конкретного виду генотипу. Дуже велике і практичне значення генетики, тому що вона є теоретичною основою селекції корисних мікроорганізмів, культурних рослин і домашніх тварин.

З генетики виросли такі науки, що нині потужно розвиваються, як біотехнологія, генна інженерія, молекулярна біологія. Важко переоцінити роль генетики у розвитку медицини. Основними розділами сучасної генетики є: цитогенетика, молекулярна генетика, мутагенез, популяційна, еволюційна та екологічна генетика, фізіологічна генетика, генетика індивідуального розвитку, генетика поведінки та ін. Розділами спеціальної генетики є генетика мікроорганізмів, генетика рослин, генетика тварин, генетика людини.

Історія розвитку генетики. До початку XX ст. гіпотези про механізми спадковості мали умоглядний характер. Перші ідеї про механізми спадковості висловлювали древні греки вже до V ст. до н. е., в першу чергу Гіппократ. На його думку, статеві задатки (у нашому розумінні чоловічі і жіночі гамети), які беруть участь в заплідненні, формуються за участю всіх частин організму, в результаті чого ознаки батьків безпосередньо передаються нащадкам, причому здорові органи постачають здоровий репродуктивний матеріал, а нездорові – нездоровий. Це теорія *прямого успадковування ознак*.

Аристотель (IV ст. до н. е.) вважав, що статеві задатки, які беруть участь в заплідненні, виробляються не безпосередньо з відповідних органів, а з поживних речовин, необхідних для цих органів. Це теорія *непрямого успадковування*.

Через багато років, на рубежі XVIII-XIX ст., Ж.-Б. Ламарк використав уявлення Гіппократа для побудови теорії передачі нащадкам нових ознак, придбаних протягом життя.

Теорія пангенезису, висунута Ч. Дарвіном в 1868 р., теж базується на ідеї Гіппократа. Згідно з нею від усіх клітин організму відокремлюються найдрібніші частки – *гемули*, які з током крові досягають статевих клітин. Після злиття статевих клітин, в ході розвитку дочірнього організму, гемули перетворюються в клітини того типу, з якого відбулися, з усіма особливостями, набутими протягом життя батьків. Відображенням уявлень про передачу спадковості через «кров» є вирази «блакитна кров», «чистокровний», «напівкровка» тощо.

У 1871 р. Ф. Гальтон спростував цю теорію. Він переливав кров чорних кроликів білим, а потім схрещував білих між собою. У трьох поколіннях не було жодного сліду порушення чистоти сріблясто білої породи. Отже, принаймні в крові кроликів, гемули відсутні.

У 1887 р. А. Вейсман висунув гіпотезу, згідно з якою в організмі існують два типи клітин: соматичні і особлива спадкова субстанція – *зародкова плазма*, яка в повному обсязі присутня тільки в статевих клітинах.

Сучасна генетика – наука про спадковість і мінливість організмів – в даний час проходить якісно новий етап свого розвитку, пов'язаний з вивченням молекулярних основ будови і функціонування генів і геномів, проблем генетичної інженерії та її використання в медицині, біологічній промисловості, сільському господарстві та інших напрямках науки і практики.

Перший етап класичної генетики (1900-1930 рр.) пов'язаний зі створенням теорії дискретної спадковості (менделізм) і *хромосомної теорії спадковості* (роботи Моргана та його школи).

Другий етап (1930-1953 рр.) – поглиблення принципів класичної генетики і перегляд ряду її положень, дослідження мутаційної мінливості, докази складної будови гена і генетичної ролі молекул дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) як матеріальної основи спадковості в клітині.

Третій етап починається з 1953 р, коли було описано будову ДНК та її властивості, розпочаті та продовжуються роботи по виділенню ДНК і РНК та розшифрування генетичного коду. В останні роки активно досліджуються молекулярні основи будови та функціонування геномів, встановлюються повні нуклеотидні послідовності ге-

номів ряду організмів, в тому числі людини, ведуться інтенсивні дослідження в галузі генетичної інженерії.

Селекціонерів-практиків можна вважати попередниками Г. Менделя. Однак, його заслугою є те, що з безперервної характеристики рослин він *виділив дискретні ознаки, виявив константність і контрастність їх прояву, а також ввів поняття домінантності і рецесивності*. Всі ці прийоми згодом увійшли у гібридологічний аналіз будь-якого організму.

Робота Г. Менделя не змогла зацікавити сучасників і не вплинула на поширені в кінці XIX ст. уявлення про спадковість. Перевідкриття законів Менделя в 1900 р. Г. де Фрізом у Голландії, К. Корренсом у Німеччині та Е. Чермаком в Австрії затвердили уявлення про існування дискретних спадкових факторів. Світ вже був готовий до того, щоб сприйняти нову генетику. Цей рік і вважають датою народження генетики. Почався її тріумфальний хід. Перевіряли справедливість законів Менделя на все нових і нових рослинах і тваринах і отримували незмінні підтвердження. Всі виключення з правил швидко розвивалися в нові явища загальної теорії спадковості.

У 1906 р. У. Бетсон запропонував термін *генетика* (від лат. *genео* – породжую). У 1909 р. В. Йогансен запропонував терміни *ген*, *генотип* і *фенотип*.

Але вже незабаром після 1900 р. постало питання, що таке ген і де він розташований? Ще в кінці XIX ст. А. Вейсман припустив, що постульована ним зародкова плазма повинна складати матеріал хромосом. У 1903 р. Т. Бовери і У. Сеттон, який працював в лабораторії Е. Б. Вільсона, незалежно один від одного припустили, що загальновідома поведінка хромосом під час дозрівання статевих клітин, а також при заплідненні, дозволяє пояснити характер розщеплення спадкових одиниць, постульований теорією Менделя, тобто, на їхню думку, *гени мають бути в хромосомах*.

У 1906 р. У. Бетсон і Р. Пеннет в дослідах із запашним горошком виявили явище зчеплення спадкових ознак, а Л. Донкастер у тому ж році в дослідах з метеликом аґрусового п’ядуна відкрив зчеплене зі статтю успадковування. На перший погляд ці дані не вкладалися в закони Менделя. Однак це протиріччя легко усувається, якщо уявити, що відбувається зчеплення генів однієї з хромосом.

З 1910 р. починаються експерименти групи Т. Х. Моргана. Разом зі своїми учнями А. Стертевантом, К. Бріджесом і Г. Меллером він до середини 1920-х рр. сформулював *хромосомну теорію спадковості*,

згідно з якою гени розташовані в хромосомах «як намисто на нитці». Вони визначили порядок розташування генів і відстані між ними. Саме Морган ввів в генетичні дослідження в якості модельного об'єкта плодову муху дрозофілу (*Drosophila melanogaster*).

У 1929 р. А. С. Серебровський і Н. П. Дубінін, ще не знаючи, що таке ген, в результаті власних досліджень прийшли до висновку про його подільність.

У 1930-1940-і рр. Дж. Бідл і Е. Тейтум зробили висновок про те, що всякий ген визначає синтез одного ферменту. Вони запропонували формулу: «Один ген – один фермент», або пізніше, після уточнення: «один ген – один білок» або «один ген – один поліпептид».

У 1944 р. в результаті досліджень з *трансформації* у бактерій О. Евері, К. Маклеод і М. Маккарті показали, що трансформуючим агентом у пневмококів є ДНК, а, отже, саме цей компонент хромосом і є носієм спадкової інформації. Приблизно в цей же час з'ясували, що інфекційним елементом вірусів служить їх нуклеїнова кислота. У 1952 році Дж. Ледерберг і М. Зиндер відкрили явище *трансдукції* – перенесення вірусами генів господаря, підтвердивши роль ДНК в здійсненні спадковості.

Новий етап розвитку генетики почався з розшифрування структури ДНК Дж. Уотсоном і Ф. Криком, які узагальнили дані рентгеноструктурного аналізу М. Уілкінса і Р. Франклін. Цей етап розвитку генетики багатий видатними відкриттями, зокрема було розшифровано генетичний код (С. Очоа і М. Ніренберг, Ф. Крик), а в 1969 р. Г. Хорана з співр. хімічно синтезували перший ген. У 1976 р. була виділена і клонована ДНК мобільних елементів геному (Г. П. Георгієв з співр., Д. Хогнесс з співр.). З 1982 р., використовуючи мобільні елементи геному як вектор, розпочали досліди по трансформації дрозофіли (Дж. Рубін, А. Спрадлінг). З кінця 1980-х рр. спостерігається прорив у розшифруванні генетичного контролю процесів розвитку (Е. Льюіс, Х. Ньюслайн-Фольхард, Е. Вішаус, В. Герінг, А. Гарсія-Беллідо, Д. Хогнес, Е. Файр, К. Меллоу, М. Капеккі, О. Смітіс, М. Еванс).

Дев'яності роки XX ст. ознаменовані розшифруванням ряду геномів. Роботи ведуть не окремі дослідницькі групи, а їх об'єднання і міжнародні консорціуми. У 1995 р. розшифровано геном першого вільноживучого організму – *Haemophilus influenzae* (1,8 Mbp). У 1996 р. встановлена повна послідовність геному дріжджів *Saccharomyces*

cerevisiae (12,1 Mbp) – першого еукаріотичного геному, який містить 5700 генів. У 1997 р. секвенований геном *E. coli* (4,7 Mbp, 4500 генів), а у 1998 р. – перший геном багатоклітинного організму *Caenorhabditis elegans* (97 Mbp, 19 100 генів). У 2000 р. секвенований геном першої квіткової рослини – *Arabidopsis thaliana* (125 Mbp, 25 500 генів) і головного модельного об'єкта генетичних досліджень – дрозофіли (123 Mbp, 13 400 генів). У 2002 р. оприлюднена нуклеотидна послідовність геному людини (2900 Mbp), яка, як вважають, містить 30 000 генів. Така ж кількість генів в геномі миші (2500 Mbp), а геном риса (470 Mbp) містить 32-56 тис. генів. А геном риби *Fugu rubripes* (365 Mbp, 31 059 генів) вважають найменшим за розміром серед хребетних тварин. З'ясована послідовність геному комарів-переносників малярії (278 Mbp, 13 600 генів) і самого паразиту – *Plasmodium falciparum* (23 Mbp, 5300 генів). У 2003 р., менше ніж через п'ять місяців після початку розповсюдження хвороби, встановлена послідовність геному коронавірусу, пов'язаного з SARS (30 Kbp, 16 відкритих рамок зчитування), а у 2020 р. за три місяці з'ясували структуру геному SARS-CoV-2 (29,903 Kbp, 10 відкритих рамок зчитування).

Серед досягнень останнього часу – редагування геному живої людини на основі CRISPR-технології (від англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами), внаслідок чого було досягнуто успіх у лікуванні раку крові.

2. Матеріальні основи спадковості

2.1. Клітина як основа спадковості та відтворення. *Клітинна теорія* – це узагальнені уявлення про будову клітин як структурних одиниць живого, про їхнє розмноження і роль у формуванні багатоклітинних організмів. Т. Шванн у 1838 р. показав, що клітини рослин і тварин гомологічні. Подальший розвиток ці уявлення отримали в роботах Р. Вірхова (1858). У теперішній час клітинна теорія постулює:

1) Клітина – елементарна одиниця живого, поза клітиною немає життя.

2) Клітина – єдина система, що складається із закономірно пов'язаних елементів, які є цілісним утворенням і складаються із сполучених функціональних одиниць – органел або органоїдів.

3) Клітини гомологічні за будовою та основними властивостями.

4) Клітини збільшуються в числі шляхом поділу вихідної клітини після подвоєння її генетичного матеріалу (ДНК): клітина від клітини.

5) Багатоклітинний організм являє собою нову систему, складний ансамбль із безлічі клітин, об'єднаних і інтегрованих у системи тканин і органів, пов'язаних один з одним за допомогою хімічних факторів, гуморальних і нервових.

6) Клітини багатоклітинних організмів тотипотентні, тобто мають генетичні потенції всіх клітин даного організму, рівнозначні за генетичною інформацією, але відрізняються одна від одної ступенем експресії різних генів, що приводить до їхньої морфологічної та функціональної різноманітності – до диференціації.

У живих організмів існує два типи організації клітин: *прокаріотна* – у бактерій і синьо-зелених водоростей, які зазвичай діляться бінарним способом, і *еукаріотна*. У них клітинне ядро відділене від цитоплазми ядерною оболонкою, нормальним способом поділу є мітоз, завдяки якому зберігається сталість числа хромосом (*2n*) та ідентичність генетичного матеріалу.

Неклітинною формою є віруси, які складаються з капсиду – захисної білкової оболонки і генетичного матеріалу. Як спадковий матеріал віруси можуть містити 2 види нуклеїнових кислот і тому їх підрозділяють на ДНК-місткі і РНК-місткі. Серед ДНК-вірусів виділяють форми з однонитковою ДНК (бактеріофаги) і з двонитковою ДНК (аденовіруси – віруси віспи, герпесу). Серед РНК-вірусів теж виділяють одноніткові (ентеровіруси – грипу, сказу, тютюнової мозаїки) і двуніткові форми (ретровіруси – онкогенні віруси, ВІЛ).

2.2. Структура ДНК. ДНК – полімер, структурною одиницею якого є нуклеотид. Нуклеотид складається з азотистої основи – пуринової (аденін (А) чи гуанін (Г)) або піримідинової – (цитозин (Ц) чи тимін (Т)), вуглеводу дезоксирибози (п'ятикутне цукрове кільце) і залишку фосфорної кислоти (HPO_3). Фосфатні угруповання перебувають зовні спіралей, а основи – всередині. Подвійна спіраль ДНК правобічна. Десять пар основ складають повний оберт 360 градусів, довжина витка приблизно 3,4 нм. Ланцюги утримуються разом водневими зв'язками між основами і закручені одна навколо іншої і навколо загальної осі (рис. 2.1).

У розробці моделі ДНК важливу роль зіграло правило Е. Чаргаффа (1949):

$$А = Т; Г = Ц \text{ або } А + Г / Ц + Т = 1,$$

тобто пропорція пуринових і піримідинових основ завжди рівна.

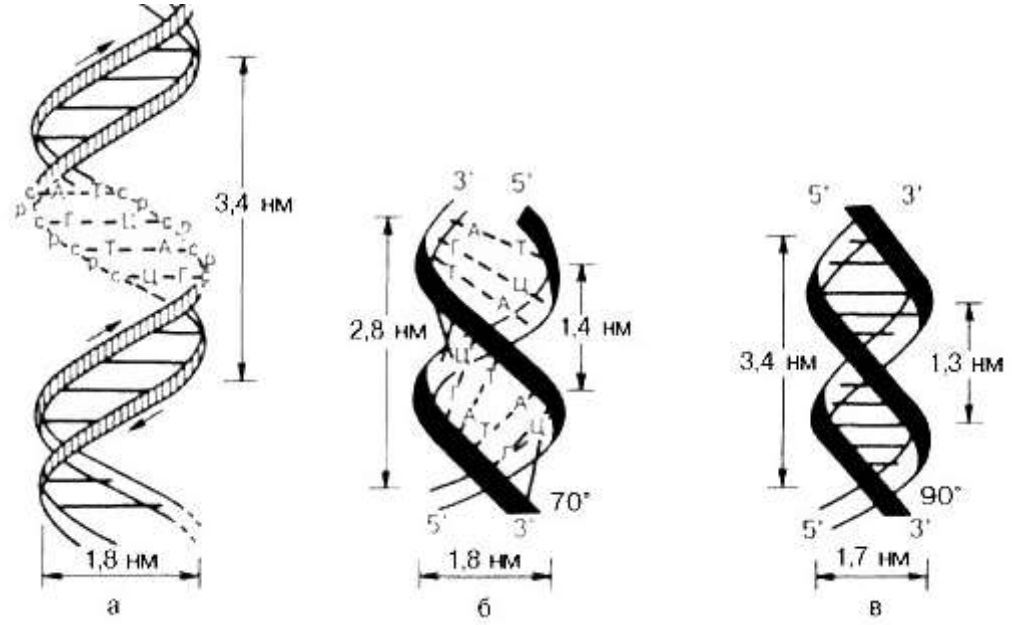


Рис. 2.1. **Схематичне зображення подвійної спіралі ДНК**: а – по Уотсону і Кріку (с – залишок дезоксирибози, р – залишок фосфорної кислоти); б – А-форма ДНК; в – В-форма ДНК.

Нуклеотиди з'єднані в полінуклеотидні ланцюги зв'язками між 5′-положенням одного пентозного кінця і 3′-положенням наступного пентозного кільця через фосфатну групу з утворенням фосфодиефірних зв'язків. Генетична інформація записана в послідовності нуклеотидів в напрямку від 5′-кінця до 3′-кінця – така нитка називається *смисловою* ДНК, тут розташовані гени. Друга нитка напрямку 3′-5′ вважається *антисмисловою*. Вона є еталоном зберігання генетичної інформації. Антисмислова нитка грає велику роль в процесах реплікації і репарації. Основи в антипаралельних нитках утворюють за рахунок водневих зв'язків комплементарні пари: А + Т; Г + Ц. Таким чином, структура однієї нитки визначає послідовність нуклеотидів інший нитки. Отже, послідовності основ в нитках ДНК завжди *антипаралельні* і *комплементарні*. Принцип комплементарності універсальний для процесів реплікації і транскрипції.

Поліморфізм ДНК – це здатність молекули приймати різні конфігурації. В даний час описано 6 форм, частина з них може існувати тільки *in vitro*:

B-форма існує в фізіологічних умовах (низька концентрація солей, високий ступінь гідратації – 92 %), є домінуючим структурним типом (рис. 2.1).

A-форма виявлена при 75 % вологості і при більш високому вмісті іонів калію і натрію (рис. 2.1). Вона коротше B-форми на 25 %, її конформація близька до структури гібридних молекул ДНК-РНК.

C-форма утворюється при 66 % вологості в присутності іонів літію, має менше основ на виток, ніж B-форма.

У цих трьох формах можуть перебувати всі ДНК незалежно від нуклеотидної послідовності. Наступні форми характерні тільки для молекул ДНК з певними послідовностями в парах основ.

D і E-форми – можливо, крайні варіанти однієї і тієї ж форми, мають найменше число пар основ на виток. Виявлені лише в молекулах ДНК, які не містять гуанін.

Z-форма – це зигзагоподібна лівозакручена форма, тоді як інші форми правозакручені. Z-ДНК зустрічається на ділянках, збагачених парами Г-Ц. Показано, що Z-форма ДНК може брати участь в регуляції експресії генів.

Зазначені форми при зміні концентрації солей і ступеня гідратації можуть переходити одна в одну, наприклад, A – B; а також Z – B. Вважають, що взаємні переходи A- і B-форм регулюють роботу генів.

ДНК не може грати роль матриці при синтезі білків з амінокислот, тому що майже вся вона знаходиться в хромосомах, розташованих в ядрі, в той час як більшість, якщо не всі, клітинні білки синтезуються в цитоплазмі. Отже, генетична інформація, яка міститься в ДНК, має передаватися проміжній молекулі, яка транспортується в цитоплазму і бере участь в синтезі поліпептидних ланцюгів. Такою проміжною молекулою є РНК. Про це свідчить те, що клітини, які синтезують велику кількість білка, містять багато РНК. Крім того, цукрозофосфатні «скелети» ДНК і РНК надзвичайно схожі, тому легко уявити, як відбувається синтез одиночних ланцюгів РНК на одноланцюговій ДНК з утворенням нестабільних гібридних молекул, один ланцюг яких представлений ДНК, а інший – РНК. Взаємовідносини ДНК, РНК і білка в 1953 р. були представлені у вигляді схеми:

реплікація ДНК → транскрипція РНК → трансляція → білок

Одиночні ланцюги ДНК служать матрицями при синтезі комплементарних молекул ДНК (реплікація) і комплементарних молекул РНК (транскрипція). У свою чергу, молекули РНК служать матрицями для послідовного поєднання амінокислот з утворенням поліпептидних ланцюгів білків в процесі трансляції, названому так тому, що «текст», написаний на «мові» нуклеотидів, перекладається (транслюється) на «мову» амінокислот. Група нуклеотидів, що кодує одну амінокислоту, називається *кодоном*.

2.3. Особливості спадкових структур еукаріот. У клітинах не буває вільної ДНК. Молекули ДНК в тій чи іншій мірі упаковані в нуклеопротеїнові структури – *хромосоми*. В хромосомах зберігається, передається нащадкам і реалізується спадкова інформація. Для кожного виду рослин і тварин характерне своє число хромосом і свої морфологічні особливості хромосомного набору, тобто певний *каріотип*. У нормі всі хромосоми клітин організму еукаріот парні (кожна хромосома має аналогічного за розміром, формою і особливостями розташування генів гомолога) і складають *диплоїдний* набір (*2n*). Тільки зрілі статеві клітини містять *гаплоїдний* (*1n*) набір хромосом. Точне число і структуру окремих хромосом можна оцінити в клітинах, що діляться на стадії метафази, коли хромосоми найбільш потовщені і вкорочені.

Хроматин має компактну упаковку, в якій ДНК функціонально неактивна. Фундаментальна субодиниця хроматину – *нуклеосома* – має один і той же тип організації у всіх еукаріот. Нитки нуклеосом знаходять в ядрах, оброблених розчинами з низькою іонною силою. Кожна нуклеосома містить приблизно 200 п. о. ДНК, пов’язаних з октамерною часткою, що складається з білків-гістонів (H2A, H2B, H3 і H4). Це серцевинні гістони (рис. 2.2).

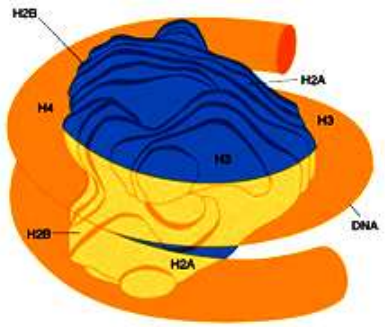


Рис. 2.2. Нуклеосома

Серцевина має вигляд циліндра, навколо якого ДНК робить два витка. Ділянка ДНК між двома нуклеосомами називається *лінкером*. ДНК довжиною 146 п. о. обмотується навколо октамера, ще близько 50 пар основ доводиться на лінкер. Більше 90 % ДНК у клітині присутні в складі нуклеосом. Після упаковки ДНК в нуклеосомні структури вона коротшає у 7 разів.

В ультраструктурі хроматину виділяють два типи нуклеопротеїнових ниток: 11 нм і 30 нм в діаметрі. Перша – це нитка з нуклеосом, розташованих одна за одною. Нитка діаметром 30 нм представляє собою спіраль, згорнуту з нитки діаметром 10 нм. У кожному витку спіралі знаходяться 6 нуклеосом (рис. 2.3). У фібрилі діаметром 30 нм коефіцієнт упаковки ДНК становить приблизно 36-40, тобто кожен мікрометр уздовж осі цієї нитки містить 40 мкм ДНК. У деяких генах, наприклад, в блоках генів рибосомної 18 S і 28 S РНК, нуклеосомне укладання зникає повністю.



Рис. 2.3. Структура нитки хроматину діаметром 30 нм

Процес компактизації ДНК, що призводить врешті-решт до побудови щільного тіла мітотичної хромосоми, проходить через кілька структурних рівнів (рис. 2.4).

Перший рівень – *нуклеосомний* – забезпечує намотування ДНК на поверхню гістонової серцевини. Довжина структури скорочується до 7 разів і утворюється нуклеосомна нитка діаметром 11 нм.

Другий рівень – *нуклеомерний* (надбусина), де йде об’єднання 6 нуклеосом у вигляді глобули. Так як всі ці рівні компактизації відбуваються на величезних лінійних молекулах ДНК, то ряд зближених нуклеомерів утворює фібрилу дезоксинуклеопротеїду (ДНП) діаметром 30 нм. Вважається, що укладка нуклеосом у складі фібрили забезпечується гістоном Н1.

Третій рівень – *хромомерний*: петлі фібрил ДНП, об'єднані скріпками з негістонових білків, утворюють компактні тіла (300 нм), які при штучній деконденсації дають розеткоподібні структури.

Четвертий рівень – *хромонемний*: зближені в лінійному порядку хромомери утворюють товсті (700 нм) нитки, які можна бачити вже в світловому мікроскопі.



Рис. 2.4. Схема компактизації хроматину в хромосомі еукаріотів

При обробці хромосом 2 М NaCl видаляються всі гістони і велика частка негістонових білків. В результаті замість метафазної хромосоми залишається остов (scaffold) з негістонових білків, з якого виходять і розподіляються петлеподібні нитки ДНК довжиною 10-30 нм.

Якщо обробити ДНКазою препарати хромосом з петлями, то можна отримати білкові остови і аналізувати їх склад. Виявилося, що в них присутні близько 20 видів білків негістонової природи, подібних до білків інтерфазного ядерного матриксу.

Скаффолди формуються тільки в експериментальних умовах і реальне існування їх у нативних хромосомах не доведене.

В кінці XIX ст. ряд дослідників (Е. Бальбіані, В. Флемінг) виявили, що хромосомна нитка на стадії профази мітозу містить ряд невеликих тілець, які сильно забарвлюються – *хромомер*. Вони розрізняються за розмірами і формою. У профазі мейозу малюнок хромомер в гомологічних хромосомах повністю симетричний. Розрізняючись між собою за величиною, формою, вмістом ДНК і положенню в хромосомі, хромомери мають чітко виражену індивідуальність і надають хромосомним ниткам і окремим їх ділянкам постійний характерний малюнок, фіксований спадково.

Найбільш виражені хромомери зустрічаються в *політенних хромосомах*, які являють собою особливий випадок ендоредуплікації – збільшення плоїдності шляхом політенії, і в хромосомах типу «лампових щіток». У останніх від хромомер відходять бічні петлі, в результаті чого хромосома виглядає як йоржик для чищення гасових ламп, тому їх і називають *хромосомами типу лампових щіток*.

Дві властивості є загальними для хромомер різних типів: по-перше, всі вони представляють собою відрізки компактізованої ДНК, по-друге, число і малюнок хромомер у даного організму постійні на даній стадії клітинного циклу.

Отже, завершуючи загальний розгляд поняття хромомер, можна сказати, що це фрагменти хромосом, здатні до локальної компактизації. Довжина фрагмента ДНК, що входить до складу хромомер, різна на різних етапах процесу компактизації хромосом під час клітинного циклу. Тому є всі підстави вважати, що хромомери не є постійними структурними одиницями організації генома, і для кожного етапу онтогенезу існують свої набори хромомер. Тому всі відомі типи хромомер можна розділити, принаймні, на чотири групи: а) лептотенні, б) пахітенні, в) хромосом типу «лампових щіток», г) хромомери інтерфазних політенних хромосом.

2.4. Реплікація ДНК. Дж. Уотсон і Ф. Крик вже в другій своїй роботі 1953 р. припустили можливий механізм копіювання спадкового матеріалу. Легко уявити, що ланцюги молекули ДНК розходяться і кожна з них стає матрицею, на якій синтезується новий комплементарний ланцюг. В результаті утворюються дві дочірні двоспіральні молекули ДНК, які не відрізняються від батьківської молекули.

Кожна молекула ДНК складається з одного ланцюга вихідної батьківської молекули і одного знов синтезованого ланцюга. Такий механізм копіювання називається напівконсервативним. У той же час

обговорювалися дві інші моделі, одна з них «консервативна», інша «дисперсійна» (рис. 2.5).

Існування напівконсервативної моделі довели М. Мезелсон і Ф. Сталь у 1958 р. Вони вирощували бактерії *E. coli* кілька поколінь на мінімальному середовищі, в якому єдиним джерелом азоту був $^{15}NH_4C1$ (хлорид амонію). У цій сполуці нормальний ізотоп ^{14}N, був замінений на ^{15}N. В результаті всі клітинні компоненти бактерій, включаючи пурини і піримідини в молекулах ДНК, містили більш важкий азот ^{15}N. Потім клітини переносили на середовище, що містить ізотоп ^{14}N. Через одно або два покоління виділяли ДНК і центрифугували в градієнті CsCl. Фракції, що містять легкі або важкі ланцюги, а також гібридні $^{15}N/^{14}N$, легко відділялися одна від одної.

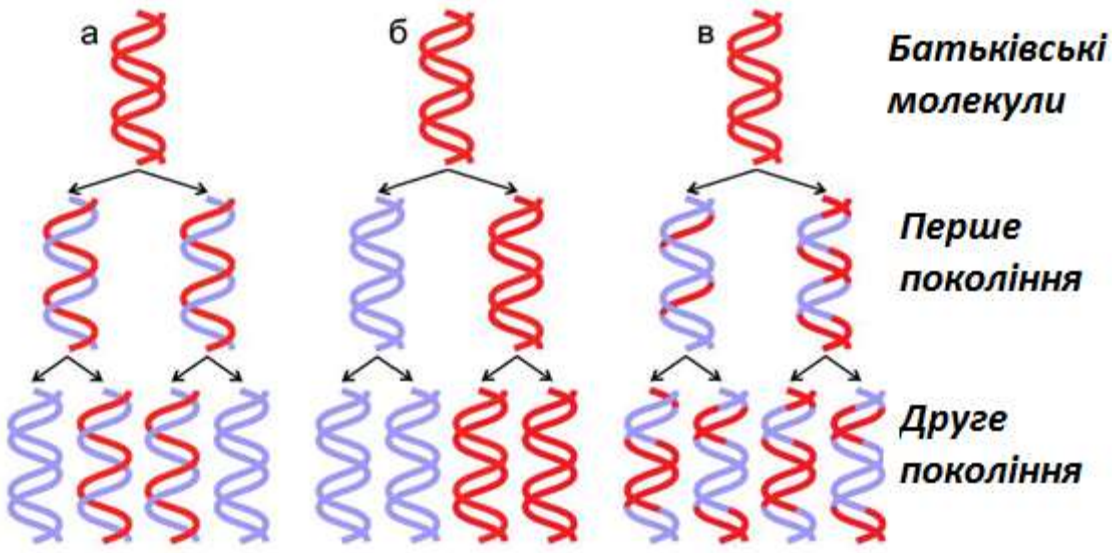


Рис. 2.5. Моделі реплікації ДНК: а – напівконсервативна,б – консервативна,в – дисперсійна. Батьківські ланцюги темні

У 1957 р. А. Корнберг виявив у бактерії *E. coli* фермент, що каталізує процес полімеризації ДНК з нуклеотидів – *ДНК-полімеразу*. Це відкриття показало, що в основі подвоєння молекул ДНК лежать звичайні біохімічні реакції. За сучасними уявленнями в реплікації ДНК у прокаріотів виділяють наступні етапи:

1. Релаксація надспіралізованої ДНК. Цей процес каталізується ферментом *топоізомеразою*.

2. Денатурація подвійної спіралі ДНК. Оскільки синтез ДНК відбувається на одноланцюговій матриці, йому має передувати обов’язкове розділення двох ланцюгів ДНК. Ділянка початку розходження ланцюгів називається реплікаційною вилкою через характер-

ну Y-подібну форму. Саме в цій вилці реплікації ДНК-полімерази синтезують дочірні молекули ДНК.

Ділянка ДНК, в якої реплікація вже завершилася, виглядає як бульбашка або «вічко» в нереплікованій ДНК. Реплікаційні вічка утворюються в тих місцях, де знаходяться специфічні послідовності – точки початку реплікації (origin of replication). Вони складаються приблизно з 300 нуклеотидів. З оріджинами зв'язуються білки ініціації реплікації.

Роз'єднання ланцюгів ДНК забезпечує ДНК-хеліказа, яка зв'язується з білками ініціації. Цей фермент рухається по одиночному ланцюгу ДНК і, зустрічаючи ділянку подвійної спіралі, він розриває водневі зв'язки між основами, розділяє ланцюги і просуває вилку реплікації.

Субстратом для ДНК-полімерази є дезоксирибонуклеозидтрифосфати (дНТФ), які полімеризуються на одноланцюговій матриці. ДНК-полімерази послідовно нарощують одну нитку ДНК, крок за кроком приєднуючи до неї наступні ланки в напрямку від 5′ до 3′ кінця. У клітинах присутні кілька різних типів ДНК-полімераз, які виконують різні функції і розрізняються за будовою. Вони можуть складатися з різної кількості субодиниць (білкових ланцюгів), від однієї до десятків. Однак, всі вони працюють на будь-яких послідовностях нуклеотидів матриці; задача цих ферментів – зробити точну копію кожної матриці.

Генетичний матеріал живих організмів має величезні розміри і реплікується з високою точністю. В середньому, в процесі відтворення геному ссавця, що складається з ДНК довжиною три млрд. пар нуклеотидів, виникає не більше трьох помилок. При цьому ДНК синтезується надзвичайно швидко (швидкість її полімеризації коливається в межах від 500 нуклеотидів в секунду у бактерій до 50 нуклеотидів в секунду у ссавців).

Висока точність реплікації, поряд з її високою швидкістю, забезпечується наявністю спеціальних механізмів, що здійснюють корекцію, тобто усувають помилки. Суть механізму корекції полягає в тому, що ДНК-полімерази двічі перевіряють відповідність кожного нуклеотиду матриці: один раз перед включенням його до складу зростаючого ланцюга, другий раз перед тим, як включити наступний нуклеотид. Черговий фосфодиефірний зв'язок синтезується лише в тому

випадку, якщо останній нуклеотид зростання ланцюга ДНК утворив правильну пару з відповідним нуклеотидом матриці.

ДНК-полімерази не можуть починати синтез ДНК на матриці, а здатні лише додавати нові дезоксирибонуклеотидні ланки до 3′-кінця вже наявного полінуклеотидного ланцюга. Такий заздалегідь утворений ланцюг, до якого додаються нуклеотиди, називають запалом (або *праймером*). Коротку РНК-затравку синтезує з рибонуклеозидтрифосфатів фермент, який не має коректорної активності і називається ДНК-праймазою. Праймазна активність може належати або окремому ферменту, або одній з суб'одиниць ДНК-полімерази.

Встановлено, що дочірні ланцюги ДНК ростуть тільки в напрямку 5′→3′, тобто завжди подовжується 3′-кінець затравки, а матриця зчитується ДНК-полімеразою в напрямку 3′→5′.

Синтез ДНК відбувається безперервно тільки на одному з матричних ланцюгів. На другому ланцюзі ДНК синтезується порівняно короткими фрагментами – від 100 до 1000 нуклеотидів, названими *фрагментами Оказакі* на ім'я вченого, який відкрив їх – Т. Оказакі.

З одиночними ланцюгами ДНК зв'язуються спеціальні білки, що дестабілізують спіраль (SSB -single strand binding proteins). Вони не дозволяють їм зімкнутися. Для того, щоб репликаційна вилка могла просуватися вперед, вся ще не подвоєна частина ДНК повинна була б дуже швидко обертатися. Білки ДНК-топоізомерази вносять одно- або дволанцюгові розриви, що дозволяють ланцюгам ДНК розділитися, а потім закладають ці розриви. На рис. 2.6 показано розташування ланцюгів і молекул ферментів під час реплікації.

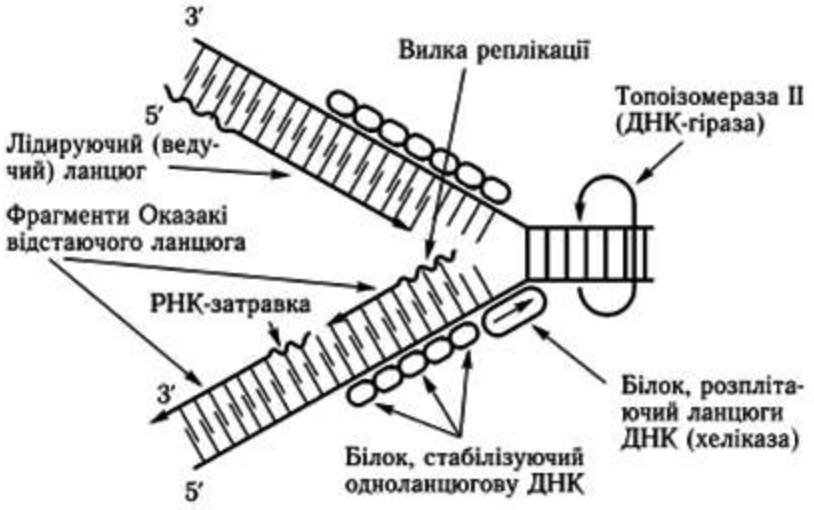


Рис. 2.6. Будова реплікаційної вилки

Спіраль розплітається *ДНК-хеліказою*; цьому процесу допомагають ДНК-топоізомераза, що розкручує ланцюги ДНК, і безліч молекул дестабілізуючого білка (SSB), що зв'язуються з обома одиночними ланцюгами ДНК. В області вилки діють дві ДНК-полімерази – на провідному і на відстаючому ланцюгах. На провідному ланцюзі ДНК-полімераза працює безперервно, а на відстаючому фермент час від часу перериває і знову відновлює свою роботу, використовуючи короткі РНК-затравки, синтезовані *ДНК-праймазою*.

Молекула ДНК-праймази безпосередньо пов'язана з ДНК-хеліказою, утворюючи структуру, яка називається *праймосомою*. Праймосома рухається в напрямі розкриття вилки реплікації і по ходу руху синтезує РНК-затравки для фрагментів Оказакі. У цьому ж напрямі рухається ДНК-полімераза провідного ланцюга і ДНК-полімераза відстаючого ланцюга. Для цього, як вважають, остання накладає ланцюг ДНК, який служить їй матрицею, сам на себе, що і забезпечує розворот ДНК-полімерази відстаючого ланцюга на 180 градусів. Узгоджений рух двох молекул ДНК-полімерази забезпечує координовану реплікацію обох ниток. Всього у вилці реплікації одночасно працює близько двадцяти різних білків.

Процес реплікації хромосоми бактерій починається в точці початку реплікації і триває до тих пір, поки не подвоїться вся ДНК хромосоми. Молекулярно-біологічні процеси, що відбуваються під час реплікації ДНК, в основному схожі в еукаріот і прокаріот. Якщо бактеріальна хромосома являє собою одиницю реплікації – *реплікон*, то реплікація ДНК еукаріотичної хромосоми здійснюється за допомогою поділу її на безліч окремих *реплiконов*. Вважають, що в еукаріот гомологами оріджину початку реплікації є послідовності, що автономно реплікуються, або ARS (autonomously replicating sequences). По еукаріотичній хромосомі в кожен момент часу може рухатися незалежно одна від одної безліч реплікаційних вилок. Зупинка просування вилки відбувається тільки при зіткненні з іншою вилкою, що просувалася в зустрічному напрямку, або після досягнення кінця хромосоми. В результаті вся ДНК хромосоми в короткий термін виявляється репліkованою.

Реплікони у еукаріот мають істотно менші розміри, ніж у прокаріот (хоча в межах геному одного виду вони можуть варіювати в розмірах у 10 разів). Швидкість реплікації істотно нижче у еукаріот.

2.5. Репарація ДНК. У будь-якій клітині під впливом різних факторів в ДНК щодня відбуваються тисячі випадкових змін, а за рік в кожній клітині накопичується лише дуже невелике число стабільних змін нуклеотидної послідовності ДНК. Серед множинних випадкових замін основ в ДНК лише одна на тисячу призводить до виникнення *мутації*. Всі інші пошкодження дуже ефективно ліквідуються в процесі репарації ДНК. Механізм репарації («заліковування» пошкоджень ДНК) заснований на тому, що молекула ДНК має дві копії генетичної інформації – по одній в кожній з ниток молекули. Основний шлях репарації включає три етапи:

– змінена ділянка пошкодженого ланцюга ДНК розпізнається і видаляється за допомогою ДНК-репаруючої нуклеази. У спіралі ДНК в цьому місці виникає пролом;

– ДНК-полімераза і глікозілази заповнюють цю прогалину, приєднуючи нуклеотиди один за іншим, копіюючи інформацію з цілісної нитки;

– *ДНК-лігаза* «зшиває» розриви і завершує відновлення молекули.

Порушення репарації у людей, уражених пігментною ксеродермою (підвищена чутливість до сонячного світла), призводить до раку шкіри. Активність УФ-ендонуклеази, необхідної для репарації, при цьому відсутня. Якщо придушуються репараційні системи, то мутагенез посилюється.

2.6. Реалізація генетичної інформації

Транскрипція. Передача інформації від ДНК здійснюється за допомогою інформаційної або матричної рибонуклеїнової кислоти (мРНК). Синтез мРНК називається транскрипцією. Молекула мРНК, комплементарна одному з ланцюгів матричної ДНК, утворюється в ході сополімеризації чотирьох рибонуклеозидтрифосфатів (аденін-, гуанозін-, цитозин- і урацилтрифосфата) з утворенням 3′-5′-фосфодиефірних зав’язків і звільненням неорганічного пірофосфату. Транскрипцію здійснює фермент ДНК-залежна РНК-полімераза. Синтез мРНК молекулами РНК-полімерази починається в певних місцях ДНК, які називаються промоторами, і завершується на особливих нуклеотидних послідовностях – термінаторах. Сукупність нуклеотидів ДНК, укладених між промотором і термінатором, називають *транскрипційною одиницею* або *транскриптоном*.

Процес транскрипції поділяють на 4 стадії: зв'язування РНК-полімерази з ДНК і розпізнавання промотора, ініціація, елонгація і термінація. Вважають, що після початкового нетривкого зв'язування з ДНК у випадковому місці молекула РНК-полімерази переміщається уздовж подвійної спіралі ДНК до тих пір, поки не виявить послідовність нуклеотидів промотора. У цьому місці зв'язування молекули ферменту з ДНК стає міцнішим. Ініціація транскрипції починається з утворення на промоторі передініціаційного комплексу, що складається з РНК-полімерази і матричної ДНК. Після утворення передініціаційний комплекс зазнає температурнозалежних конформаційних змін, які супроводжуються локальним плавленням, тобто розплітанням подвійної спіралі ДНК, і комплекс стає здатним до транскрипції. При наявності рибонуклеозидтрифосфатів відбувається утворення перших фосфодіефірних зв'язків в молекулі синтезованої мРНК, після чого починається стадія елонгації, тобто послідовне подовження молекули мРНК, що синтезується.

У 1992 р. М. Чемберлен із співробітниками розробили загальну модель елонгації мРНК, згідно з якою переміщення РНК-полімерази уздовж ДНК і приєднання нуклеотидів до зростаючого ланцюга мРНК в активному центрі ферменту розділені в часі. Це можливо тому, що у РНК-полімерази є два сайти (ділянки), що утримують зростаючий ланцюг мРНК, і дві ділянки зв'язування ДНК-матриці. Молекула РНК-полімерази переміщається уздовж ДНК подібно гусениці: коли один сайт зв'язування ДНК фіксований, інший переміщається вперед. ДНК-залежні РНК-полімерази фагів, що складаються з одної субодиниці, синтезують РНК в умовах *in vitro* зі швидкістю 200-400 нуклеотидів в секунду. При переміщенні ферменту уздовж матриці ланцюги ДНК піддаються плавленню і повторному відпалу, в результаті якого відновлюється вихідна структура ДНК. Стадія елонгації закінчується після досягнення РНК-полімеразою термінатора транскрипції. Потім синтезована РНК і РНК-полімераза звільняються з транскрипційного комплексу. Тільки мінус-ланцюг ДНК служить матрицею для синтезу мРНК.

Ділянки ДНК, що несуть інформацію про будову білка – *екзони*, розділені неінформативними *інтронами*. У процесі транскрипції зчитується інформація як з екзонів, так і з інтронів. Утворюється попередник мРНК – про-мРНК. Молекули про-мРНК зазнають дозрівання – *процесингу*. У ядрі з про-мРНК відбувається вирізання інтронів і

об'єднання екзонів – *сплайсинг*. Після цього мРНК з'єднується з білком, утворюючи *інформосому*. Вона виходить через пори в ядерній оболонці в цитоплазму, мРНК вивільняється з інформсоми і одноланцюгова неспіралізована молекула мРНК приєднується до ділянки малої субодиниці рибосоми, яка примикає до великої субодиниці. До рибосоми прикріплюється невелика ділянка ланцюга мРНК, що містить один кодон, який складається з трьох азотистих основ. Один кодон відповідає одній амінокислоті.

Генетичний код. У будь-якій даній ділянці ДНК тільки одна з двох ниток ДНК кодує амінокислоти, тому код – це послідовність нуклеотидів, а не пар нуклеотидів. Генетичний код має наступні властивості:

1. Генетичний код читається групами по три нуклеотиди, тобто *код триплетний*. Кожен триплет кодує амінокислоту, кожен триплет називається *кодоном*.

2. Основні закономірності організації генетичного коду були відкриті за допомогою генетичного аналізу району II фага Т6. У 1961 р. Ф. Крик і його колеги показали, що код повинен читатися триплетами, що не перекриваються, з фіксованої стартової точки. Не перекривання має на увазі, що кожен кодон складається з трьох нуклеотидів і кожний наступний кодон представлений наступними трьома нуклеотидами. Фіксована стартова точка означає, що зчитування починається на одному кінці і завершується на іншому; різні частини послідовності, що кодує, не можуть зчитуватися незалежно одна від одної.

3. Початком трансляції будь-якого гена є кодон AUG або GUG. Це *ініціюючі кодони*. В кінці гена обов'язково стоять кодони UAA, UAG або UGA, які не кодують амінокислот і є сигналами на закінчення синтезу білка – це *стоп-кодони*. Для підвищення надійності процесу термінації стоп-кодони зазвичай дублюються. Першим при цьому, як правило, виступає кодон UAA (основний термінуючий триплет), а слідом за ним на дуже близькій відстані в тій же рамці зчитування міститься один із запасних термінуючих триплетів – UAG або UGA (табл. 2.1).

4. Якщо генетичний код зчитується триплетами, що не перекриваються, є тільки три можливості транслювання послідовності нуклеотидів в амінокислотну послідовність, в залежності від стартової точки. Ці три можливості називають рамками зчитування.

Мутація, в результаті якої відбувається *інсерція* або *делеція* одного нуклеотиду і змінюється рамка зчитування всієї наступної пос-

лідовності, називається *зрушенням рамки зчитування*. Оскільки послідовність нової рамки зчитування повністю відмінна від первісної, вся амінокислотна послідовність буде зміненою після мутації. Функція такого білка повністю втрачена.

5. Генетичний код є *виродженим*, в тому сенсі, що однієї амінокислоті може відповідати декілька кодонів (табл. 2.1). Однак, кодони використовуються не з однаковою частотою. Наприклад, у дрозофіли, в результаті паралельного вивчення послідовностей кодонів в генах і амінокислот, кодованих ними, з'ясовано, що кодони використовуються з різними частотами.

Таблиця 2.1

Відповідність кодонів генетичного коду амінокислотам білка

Перша основа в кодоні (5′)	Друга основа в кодоні				Третя основа в кодоні (3′)
	U	C	A	G	
U	UUU(Phe) UUC(Phe) UUA(Leu) UUG(Leu)	UCU(Ser) UCC(Ser) UCA(Ser) UCG(Ser)	UAU(Tyr) UAC(Tyr) UAA(stop) UAG(stop)	UGU(Cys) UGC(Cys) UGA(stop) UGG(Trp)	U C A G
C	CUU(Leu) CUC(Leu) CUA(Leu) CUG(Leu)	CCU(Pro) CCC(Pro) CCA(Pro) CCG(Pro)	CAU(His) CAC(His) CAA(Gln) CAG(Gln)	CGU(Arg) CGC(Arg) CGA(Arg) CGG(Arg)	U C A G
A	AUU(Ile) AUC(Ile) AUA(Ile) **AUG(Met)**	ACU(Thr) ACC(Thr) ACA(Thr) ACG(Thr)	AAU(Asn) AAC(Asn) AAA(Lys) AAG(Lys)	AGU(Ser) AGC(Ser) AGA(Arg) AGG(Arg)	U C A G
G	GUU(Val) GUC(Val) GUA(Val) **GUG(Val)**	GCU(Ala) GCC(Ala) GCA(Ala) GCG(Ala)	GAU(Asp) GAC(Asp) GAA(Glu) GAG(Glu)	GGU(Gly) GGC(Gly) GGA(Gly) GGG(Gly)	U C A G

Жирним шрифтом виділені ініціюючі кодони

6. Генетичний код універсальний, в тому сенсі, що певному кодону відповідає певна амінокислота. Наприклад, AUG-кодон кодує

метіонін у будь-якого організму. Однак, у міру розширення кола об'єктів молекулярної генетики стали накопичуватися виключення. Стосується це, насамперед, мітохондріальних геномів.

Трансляція. Трансляція (переклад) – процес втілення генетичної інформації мРНК в структуру поліпептиду. Це етап білкового синтезу, здійснюваний послідовною поліконденсацією окремих амінокислотних залишків, починаючи з амінокінця поліпептидного ланцюга до карбоксильного кінця.

Зріла матрична РНК виходить в цитоплазму, де здійснюється процес трансляції – декодування інформації мРНК в амінокислотну послідовність білка. Процес декодування здійснюється в напрямку від 5′→3′ і відбувається на рибосомах. Комплекс мРНК і рибосом називається *полісомою*. Подібно транскрипції механізм трансляції складається з трьох етапів: *ініціації*, *елонгації* та *термінації*.

Трансляція починається зі стартового кодону AUG або GUG, який при локалізації в змістовній частині структурного гена кодує амінокислоту метіонін або валін, відповідно. Кожну амінокислоту доставляє до полісом транспортна РНК (тРНК), специфічна до даної амінокислоти. Вона виконує роль посередника між кодоном мРНК і амінокислотою. Молекули тРНК пізнають в цитоплазмі відповідний триплет (кодон в мРНК) за принципом спарювання комплементарних азотистих основ. Транспортна РНК, яка підходить до малої субодиниці, утворює зв'язок кодон-антикодон, при цьому одночасно передає свою амінокислоту в аміноацільну ділянку (А-ділянка) великої субодиниці. До кодону AUG «підходить» антикодон тільки тієї тРНК, яка переносить метіонін. Тому перш за все до рибосоми доставляється метіонін. Потім кодон AUG переходить на пептидильну ділянку великої субодиниці (Р-ділянку). В результаті цих процесів утворюється транслюча рибосома – ініціюючий комплекс.

Елонгація – це послідовне включення амінокислотних залишків до складу зростаючого поліпептидного ланцюга. Кожен акт елонгації складається з трьох етапів:

розпізнавання кодону, яке полягає у зв'язуванні антикодону з черговою молекулою тРНК, що несе амінокислоту, з кодоном вільної А-ділянки на рибосомі;

утворення пептидного зв'язку, яке відбувається лише тоді, коли обидві ділянки – А і Р – зайняті молекулами тРНК. Частина великої субодиниці рибосоми – фермент пептидилтрансфераза, який каталізує утворення пептидного зв'язку;

транслокація, коли тРНК ділянки Р, не пов'язана з пептидом, залишає рибосому. Потім молекула тРНК з поліпептидом переходять з А на Р-ділянку і, нарешті, рибосома переміщається уздовж РНК на один кодон.

Термінация (закінчення синтезу) відбувається по команді кодонів UAA, UAG, UGA. У природі не існує таких молекул тРНК, антикодони яких відповідали б цим кодонам.

Кожна мРНК транслюється, як правило, кілька разів, після чого руйнується. Середній час життя молекули мРНК близько 2 хв. Руйнуючи старі і створюючи нові мРНК, клітина може досить строго регулювати як тип продукованих білків, так і їх кількість. Це регуляція синтезу білка на рівні транскрипції. У еукаріот можлива регуляція і на рівні трансляції. Синтез білка – один з найістотніших показників життя.

Потік інформації в клітині. Сучасні уявлення про роль ДНК в передачі спадкової інформації найкраще відображає «Центральна догма молекулярної біології», сформульована Ф. Криком в 1970 році (рис. 2.7).

Автор запропонував розділити всі види перенесення біологічної інформації в клітині на три групи:

1. Процеси, існування яких уже показано: ДНК → ДНК, ДНК → РНК, РНК → білок, РНК → РНК.

2. Процеси, що не були експериментально виявлені і з теоретичної точки зору не здавалися строго необхідними: РНК → ДНК, ДНК → білок.

3. Неможливі переноси: білок → білок, білок → РНК, білок → ДНК. Таким чином, інформація в усіх випадках в клітці переноситься односпрямовано по ланцюгу: ДНК → РНК → білок. Білок не може слугувати матрицею для синтезу ДНК або РНК, оскільки у молекул білка немає властивості комплементарності окремих частин молекули, що б дозволяло використовувати її як матрицю.

Синтез однієї молекули білка, що складається з 150 амінокислот, йде приблизно 1,5 хвилини, тобто зі швидкістю 2 амінокислоти в секунду. Він залежить від багатьох факторів. Наприклад, стан рибосоми може мати вплив на зчитування інформації. Рибосома «читає з помилками», якщо на неї впливати будь-якими зовнішніми факторами, наприклад, опроміненням, хімічними речовинами, здатними змінювати структуру і функцію рибосоми.

Однак, якщо переноси типу ДНК → ДНК, ДНК → РНК, РНК → РНК і РНК → білок мали експериментальні прямі або непрямі докази, то на користь інших переносів доводів і теоретичних обґрунтувань в той час не було.

Вивчення механізмів взаємодії з клітиною онкогенних вірусів наштовхнуло на думку про можливість існування інших типів зв'язків. У 1969-1971 рр. Р. Дульбеко експериментально довів, що ДНК онкогенного вірусу міцно зв'язується з ДНК клітини, знаходячи в її хромосомах криївку. Але онкогенні віруси діляться на дві великі групи: ДНК-віруси і РНК-віруси. Включення вірусної ДНК в ДНК клітини і їх інтеграцію уявити легко. Але як застосувати цю гіпотезу до РНК-вірусу?

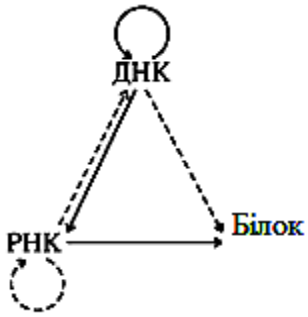


Рис. 2.7. «Центральна догма молекулярної біології». Суцільні стрілки показують звичайний шлях перенесення генетичної інформації, пунктирні – більш рідкісні шляхи, також існуючі в природі

У 1960-х рр. Г. Тьомін висловив припущення, згідно з яким «життєвий цикл» РНК-утримуючих онкогенних вірусів повинен включати стадію утворення ДНК-продукту – провірусу. Це явно суперечило центральної догми молекулярної біології, яка наголошувала, що генетична інформація передається тільки в одному напрямку: ДНК → РНК → білок. Якщо допустити, що існує і шлях РНК → ДНК, то в клітині має бути і спеціальний фермент, який бере участь в синтезі такого роду. У 1970 р. Г. Тьомін і С. Мізутані виявили в складі вірусу саркоми Рауса (РНК-вірус) фермент, здатний синтезувати ДНК на матриці РНК. Цей фермент назвали *зворотною транскриптазою* або *РНК-залежною ДНК-полімеразою* (*ревертазою*, по В. А. Енгельгардту). Одночасно Д. Балтімор виявив фермент, що синтезує ДНК, у вірусу мієлобластозу птахів. Ревертазу в даний час знайдено у всіх без винятку РНК-утримуючих онкогенних вірусів. Формула центральної догми молекулярної біології доповнилася:

ДНК ↔ РНК → білок

Процес зворотної транскрипції складається з двох етапів. Спочатку на РНК-матриці синтезується нитка ДНК, тобто утворюється проміжний продукт реакції, який складається з гібридних молекул, одна нитка яких – вірусна РНК, інша – комплементарна їй синтезована нитка ДНК. На ДНК-вій нитці гібридної молекули синтезується друга нитка ДНК і виходить кінцевий продукт реакції – дволанцюгова спіральна молекула ДНК, яка містить генетичну інформацію, повністю переписану з вірусної РНК. Обидва етапи здійснюються, мабуть, одним і тим же вірусним ферментом, точніше, його активним центром, отже ревертаза володіє як РНК-залежною, так і ДНК-залежною ДНК-полімеразною активністю і веде всю реакцію від початку до кінця.

Відкриття ревертази наштовхнуло на думку, що шляхом виявлення її в клітинах можна здійснювати ранню і швидку діагностику злоякісних пухлин і лейкозів. Однак незабаром виявилося, що ревертази властиві і тканинам здорових, не заражених вірусами організмів. Особливо багато їх виявилося в ембріональних клітинах. Проте, існують кількісні відмінності ревертази в пухлинних і нормальних клітинах, за винятком ембріональних. Встановлено також відмінності в активності і фізико-хімічних властивостях ревертази онкогенних вірусів і нормальних клітин. Безсумнівно, зворотна транскрипція потрібна для злоякісної трансформації.

Наявність ревертази у всіх нормальних клітинах свідчить про можливість передачі інформації від РНК до ДНК. Але з якою метою? Відзначено, що на певній стадії ембріогенезу в клітинах амфібій різко зростає число генів, що кодують рибосомальну РНК. Замість двох копій (2 гомологічні хромосоми) в клітинах виявляється по кілька сотень копій кожного гена, які певний період ембріогенезу функціонують ізольовано від хромосоми, а потім руйнуються. У 1971 р. К. Д. Тартоф відкрив таке ж явище і у дрозофіли. Воно було названо *ампліфікацією генів*. Механізм ампліфікації не відомий. Однак встановлено, що в умовах підвищеної потреби у синтезі білка в клітині відбувається розмноження генів рРНК методом зворотної транскрипції. Це забезпечує синтез РНК не на хромосомній матриці, а на матриці генів, що утворюються в цитоплазмі. Очевидно, ампліфікація генів грає істотну роль в регуляції онтогенетичних процесів і відбувається завжди, коли потрібно збільшити кількість білка.

3. Закономірності успадковування ознак

Основу генетичного дослідження складає *генетичний аналіз*. Під цим терміном О. С. Серебровський розумів систему дослідів, спостережень і розрахунків, які мають метою розкладання властивостей (ознак) організму на окремі спадкові елементи і вивчення властивостей відповідних їм генів.

Будь-яке схрещування починається з виявлення ознаки. Нащадки від схрещування двох особин з різними ознаками називаються гібридними, а окрема особина – гібридом. Закономірності успадковування ознак за внутрішньовидової гібридизації гороху встановлені Г. Менделем за допомогою гібридологічного аналізу. При його проведенні він враховував наступне:

1) для схрещування використовують вихідні форми, які відрізняються по одній або декільком парам альтернативних ознак;

2) розглядати характер успадковування по кожній парі ознак;

3) проводити кількісний облік гібридних рослин по всім досліджуваним ознакам;

4) проводити індивідуальний аналіз нащадків від кожної рослини в ряду поколінь.

У теперішній час у поняття генетичного аналізу входить клонування гена, визначення послідовності нуклеотидів ДНК, з'ясування інтрон-екзонної структури гена, експресії гена в онтогенезі.

3.1. Генетична символіка. Схрещування позначають знаком множення – ×. В схемах на першому місці (за замовчуванням) пишуть генотип жіночої статі. За необхідності жіночу стать позначають символом ♀ (дзеркало Венери), чоловічу – знаком ♂ (щит і спис Марса). Батьківські організми позначають буквою P (лат. *Parento* – батьки). Гібридне покоління позначають літерою F (лат. *Filii* – діти) з цифровим індексом, який відповідає порядковому номеру гібридного покоління.

Ознаки (і гени), які проявляються у гібридів F_1, називаються *домінантними* (лат. *dominus* – панівний), а ті, що не проявляються – *рецесивними* (лат. *recessus* – відступаючий).

Для позначення генів, які детермінують дані ознаки, використовують букви латинського алфавіту (для домінантних – прописні, для рецесивних – строчні). Сполучення двох генів (оскільки кожний організм, як правило, диплоїдний і має по дві гомологічні хромосоми)

називається *генотипом* за даною ознакою (наприклад, *АА*, *Аа* або *аа*). Сукупність генів у гаплоїдному наборі хромосом називається *геномом*.

Для позначення структурних варіантів одного і того ж гена застосовують термін *алель*. Пара алелів характеризує два контрастних стана гена. *Алельні гени* знаходяться в ідентичних локусах гомологічних хромосом. В основі статевого розмноження організмів лежить мейоз (або редукційний поділ). В результаті формуються гаплоїдні гамети, в яких міститься тільки одна з гомологічних хромосом і, отже, лише один алель. Це знайшло відображення у правилі чистоти гамет Бетсона, згідно з яким домінантний і рецесивний алелі в гетерозиготному генотипі F_1 (Аа) не змішуються, а утворюють два типи гамет у рівному співвідношенні: ½ А и ½ а. Константні форми *АА* і *аа*, які у наступних поколіннях не дають розщеплення називають *гомозиготними*, а форми *Аа*, які дають розщеплення – *гетерозиготними*. Наявність константних ознак, які контролюються різними алелями генів, знайдені у всіх живих організмів.

Фенотипом називають сукупність усіх зовнішніх і внутрішніх ознак організму. Ознакою, у генетичному розумінні, можна вважати будь-яку особливість, що виявляється при описі організму: зріст, вага, колір очей, форма або розташування листків, колір квітки, розмір молекули білка або його електрофоретична рухомість.

3.2. Закони Г. Менделя. До початку схрещувань Г. Мендель з'ясував, що за обраними ознаками батьківські форми гороху при самозапиленні дають однорідне потомство, тобто є константними.

Найпростіший варіант, коли батьківські форми розрізняються за однією парою ознак (наприклад, круглі або зморшкуваті зерна) називається *моногібридним схрещуванням* (рис. 3.1). Батьківські форми, які є гомозиготами, утворюють один тип гамет. Пара алелів (*А* і *а*) відповідає двом контрастним станам гена і локалізована в ідентичних локусах гомологічних хромосом. При злитті батьківських гамет формується генотип гібридів першого покоління – *Аа*. Усі гібриди першого покоління (F_1) мають гладкі зерна, тобто однаковий фенотип, який співпадає з фенотипом одного з батьків. Це відображає правило домінування і *перший закон Менделя – закон одноманітності першого покоління*. Рецесивна ознака у гібридів першого покоління не проявлялася.

При аналізі успадковування ознак зручно використовувати так звані фенотипові радикали, коли наводиться лише значущій алель, а замість другого ставиться прочерк. Наприклад, генотипам *AA* і *Aa* відповідає фенотиповий радикал *A_*.

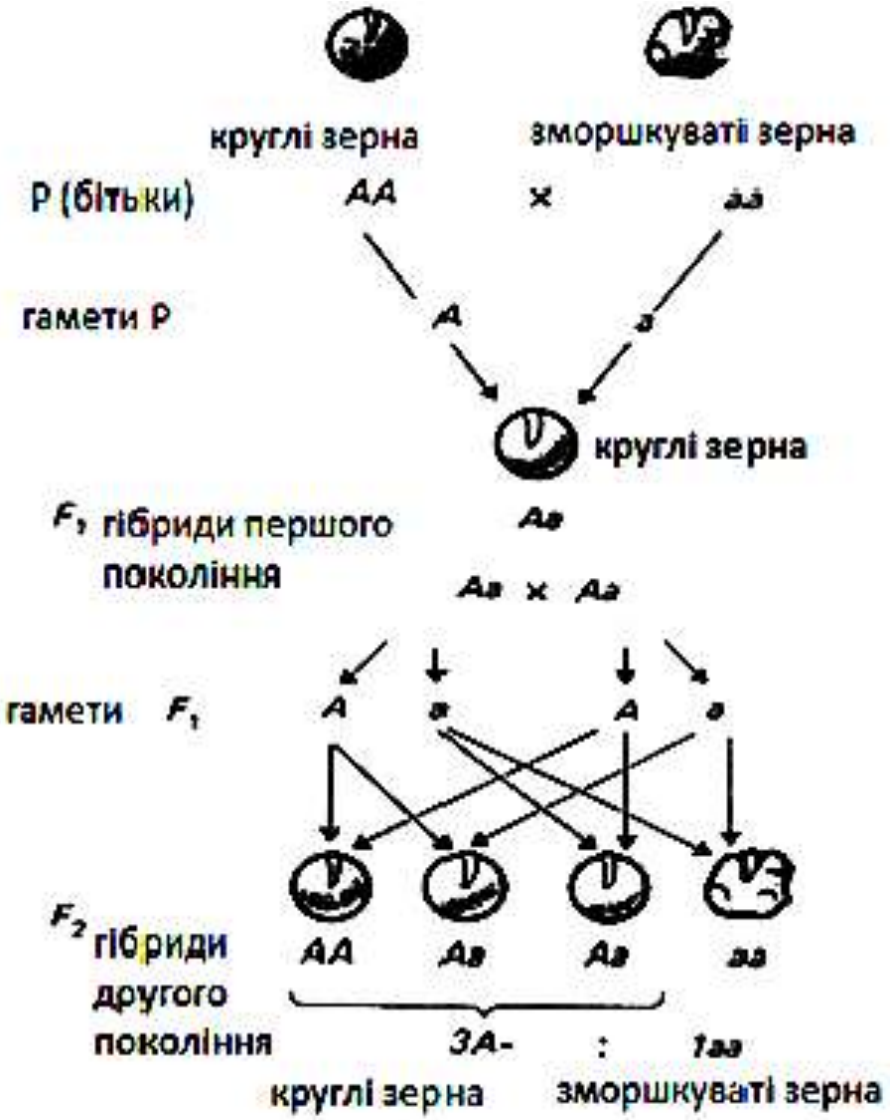


Рис. 3.1. Успадковування форми зерна у гороху

За самозапилення гібридів F_1 серед нащадків знов з'являються форми з рецесивними ознаками: в F_2 було отримано 7324 горошини, з яких 5474 були гладкими, а 1850 – зморшкуватими. Отже, спостерігалося розщеплення по фенотипу у співвідношенні 3 : 1 (¾ гладких і ¼ зморшкуватих). Це співвідношення відображає *другий закон Менделя – закон розщеплення ознак*.

У наступних поколіннях нащадки з рецесивним проявом ознаки залишалися константними. Серед нащадків домінуючого класу знов спостерігалося розщеплення. В цілому співвідношення різних гено-

типів серед нащадків гетерозигот складає 1:2:1. Для полегшення розрахунку варіантів об'єднання різних типів гамет у зиготи англійський генетик Р. Пеннет запропонував запис у вигляді решітки – таблиці з числом клітинок, залежним від кількості типів гамет, які утворюють батьки (широко відома як решітка Пеннета). Так, у схрещуванні *Aa* х *Aa* будуть наступні гамети та їх сполучення (рис. 3.2):

Гамети гетерозиготних батьків	*A*	*a*
	Генотипи	
A *a*	*AA* *Aa*	*Aa* *aa*
Сума генотипів	*AA* + 2*Aa* + *aa*	

Рис. 3.2. Опис розщеплення при моногібридному схрещуванні за допомогою решітки Пеннета

Крім *повного домінування*, описаного Г. Менделем, виявлені також неповне домінування та кодомінування. При *неповному домінуванні* гетерозигота має фенотип, відмінний від фенотипів гетерозигот. При цьому одноманітність фенотипу в F_1 зберігається. В F_2 розщеплення по фенотипу і по генотипу співпадають – 1:2:1. Прикладом неповного домінування є проміжне рожеве забарвлення квітки у гібридів нічної красуні *Mirabilis jalapa*, отриманих від схрещування форм з червоними та білими квітками. Неповне домінування широко розповсюджене явище. Його спостерігали при вивченні забарвлення квітки у ротиків, оперення в андалузьких курей, шерсті крупної рогатої худоби, вівець тощо.

Кодомінування – це явище, коли обидва алелі дають рівноцінний внесок у формування ознаки. Наприклад, у людей з групою крові АВ, які є гетерозиготами (I^AI^B) фенотипово проявляються обидва алелі: на поверхні еритроцитів є обидва типи антигенів – А і В (рис. 3.3).

Аналізуюче схрещування – це схрещування з рецесивною гомозиготою. Серед нащадків аналізуючого схрещування гетерозиготи спостерігається розщеплення у співвідношенні 1 : 1.

Якщо у схрещуванні беруть участь особини, які розрізняються за двома парами альтернативних ознак, то таке схрещування називають *дигібридним*. Якщо альтернитивних ознак три пари – схрещування *тригібридне*. У загальному випадку, якщо батьківські форми роз-

різняються за багатьма альтернативними ознаками, то таке схрещування називають *полігібридним*.

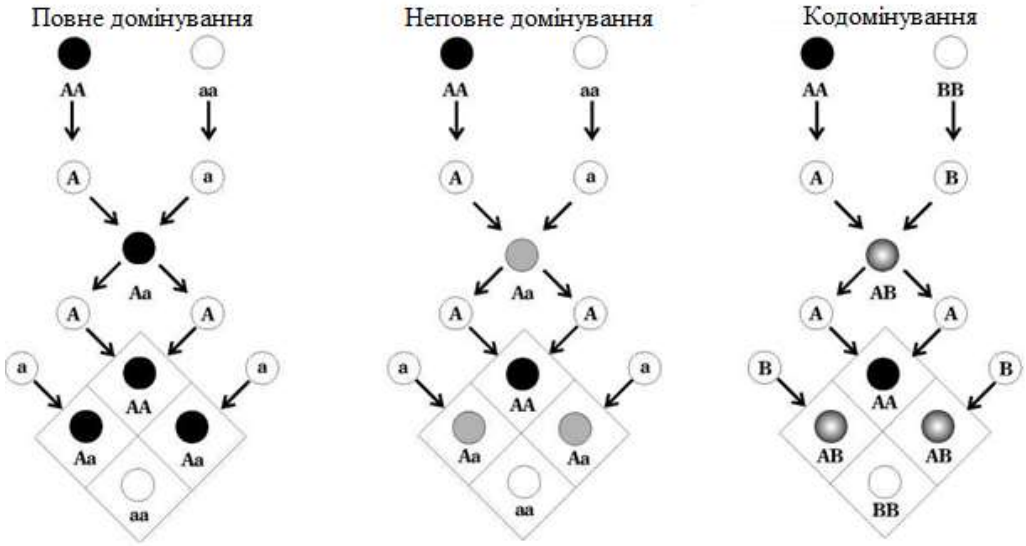


Рис. 3.3. Схема, яка ілюструє різни типи взаємодії алельних генів

В дигібридному схрещуванні (рис. 3.4) ознаки успадковуються незалежно, розподіл генів обумовлений незалежним і випадковим розходженням двох пар гомологічних хромосом у мейозі.

Гамети ♂ / Гамети ♀	*AB*	*Ab*	*aB*	*ab*
AB	*AABB*	*AABb*	*AaBB*	*AaBb*
Ab	*AABb*	*AAbb*	*AaBb*	*Aabb*
aB	*AaBB*	*AaBb*	*aaBB*	*aaBb*
ab	*AaBb*	*Aabb*	*aaBb*	*aabb*

Рис. 3.4. Схема дигібридного схрещування

Дигетерозиготні організми F_1 утворюють $2^2 = 4$ типів гамет. При утворенні зигот можливо $4^2 = 16$ комбінацій гамет. Отже, в F_2 по кожній ознаці успадковування здійснюється незалежно від другої ознаки. Це і є третій закон Менделя – *закон незалежного успадковування ознак.*

Розщеплення по кожній парі ознак відбувається як і за моногібридного схрещування: по фенотипу у співвідношенні 3:1, а при одночасному врахуванні ознак за фенотипом в F_2 можна виділити $2^2 = 4$ класи у співвідношенні:

(3*A_* : 1*aa*) x (3*B_* : 1*вв*) = 9*A_B_* : 3*A_вв* : 3*aaB_* : 1 *аавв*

жовтих гладких : жовтих зморшк. : зелених гладких : зелених зморшк.

По генотипу в F_2 розщеплення відбувається на $3^2 = 9$ класів у співвідношенні: (1*AA* : 2*Aa* : 1*aa*) x (1*BB* : 2*Bв* : 1*вв*) = 1*AABB* : 2*AABв* : 1*AAвв* : 2*AaBB* : 4*AaBв* : 2*Aавв* : 1*aaBB* : 2*aaBв* : 1*аавв*.

Аналіз полігібридних схрещувань проводять також, як і дигібридних, однак слід мати на увазі, що гетерозигота продукує 2^n типів гамет і, отже, із зростанням числа ознак збільшується число комбінацій гамет. Якщо у дигібрида утворюється 16 комбінацій, то у тригібрида їх 64, у тетрагібрида – 256.

Відповідно розщеплення по фенотипу описується співвідношенням $(3 : 1)^n$, а по генотипу – $(1 : 2 : 1)^n$. При цьому слід мати на увазі, що ці співвідношення справедливі лише при повному домінуванні та за взаємодії алельних генів. При неповному домінуванні і кодомінуванні розщеплення за фенотипом і генотипом співпадають.

Закони Менделя описують закономірності *незалежного* успадковування. Можливі і відхилення від менделівських законів, обумовлені:

1) статистичними похибками;
2) неоднаковою життєздатністю володарів різних генотипів;
3) взаємодією неалельних генів;
4) зчепленням ознак зі статтю;
5) позахромосомною спадковістю;
6) онтогенетичними особливостями реалізації генотипу;
7) впливом середовища.

3.3. Взаємодія неалельних генів. *Неалельні гени* локалізовані у негомологічних хромосомах, або в різних ділянках одної хромосоми.

Виділяють наступні типи взаємодії неалельних генів.

Комплементарія – тип взаємодії неалельних генів, за якого при поєднанні в генотипі хоча б по одному домінантному алелю кожного з генів проявляється нова ознака. При цьому можливі різни типи розщеплення серед нащадків гетерозигот.

Розщеплення по фенотипу у співвідношенні 9:3:3:1 в F_2 спостерігають при успадковуванні забарвлення плодів у овочевого перця. При схрещуванні форми з жовтим забарвленням плодів з рослиною з коричневими перцями були отримані гібриди F_1 з червоними плодами (рис. 3.5).

В F_2 присутність домінантних алелів *A* і *B* у 9/16 особин приводить до формування червоного кольору плодів. Присутність гена *A* (в гомо- або гетерозиготному стані) у сполученні з рецесивною гомозиготою *bb* дає жовте забарвлення плодів у 3/16 особин, а за генотипу *aaB_* 3/16 нащадків мають коричневі плоди. Гомозиготні рецесиви по обох генах – *aabb* (1/16) мають новий фенотип – зелений колір перців. Отже, взаємодія домінантних генів змінює колір плодів. Кожний з комплементарних домінантних генів має власний фенотиповий прояв, а рецесивна гомозигота за двома генами відрізняється від них за фенотипом.

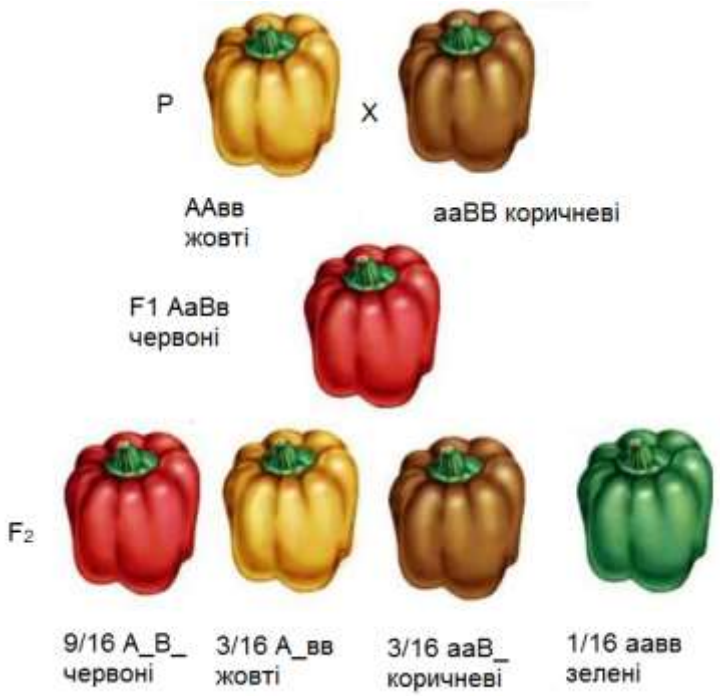


Рис 3.5. Успадковування забарвлення плодів у перця *Piper annuum*

При комплементарній взаємодії генів можливі відхилення від стандартної формули розщеплення по фенотипу (9:3:3:1) при дигібридному схрещуванні. Розщеплення у співвідношенні 9:6:1 характерне для успадковування форми плодів у гарбуза (рис. 3.6).

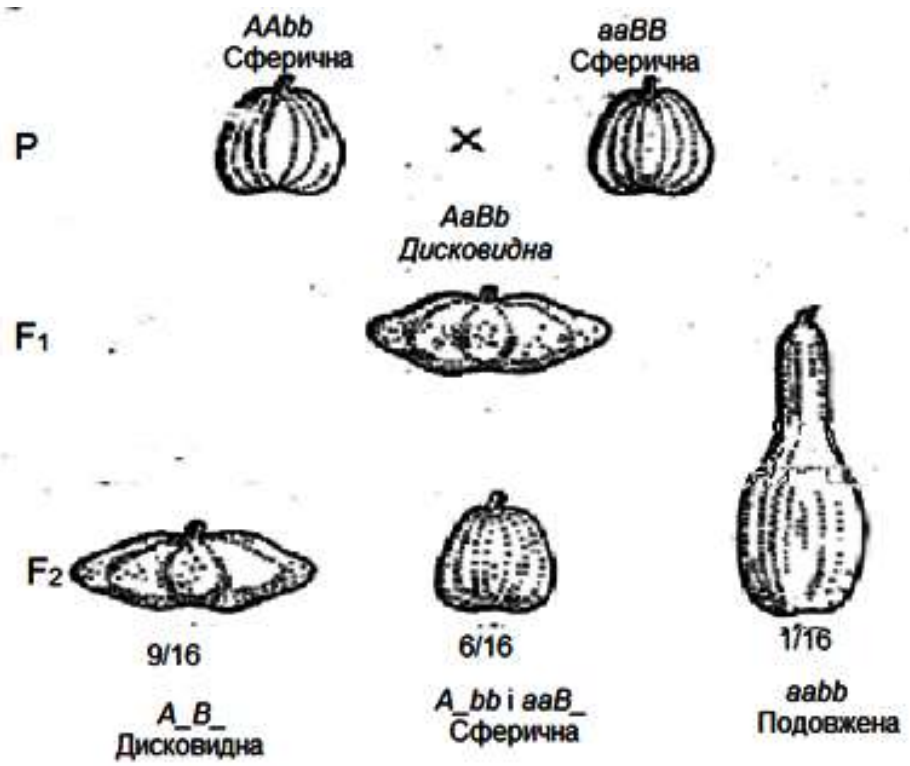


Рис. 3.6. Успадковування форми плода у *Cucurbita pepo*

У гарбуза спостерігається три різновиди плодів: дископодібні, сферичні та подовжені. При схрещуванні двох сортів гарбуза зі сферичними плодами в F_1 отримують рослини з дископодібною формою плодів. Серед нащадків цих рослин в F_2 появляються три фенотипові класи у співвідношенні 9/16 з дископодібними плодами (*A_B_*), 6/16 – зі сферичними (3/16 *A_bb*+3/16 *aaB_*) і 1/16 з подовженими (*aabb*). Це вказує на те, що кожний з домінантних неалельних генів *A* і *B* детермінує схожій фенотип – сферичну форму плодів, взаємодія їх домінантних алелів обумовлює дископодібну форму плодів, а взаємодія рецесивних алелів – подовжену форму плодів.

При схрещуванні двох ліній запашного горошку з білими квітками в F_1 дигетерозиготні рослини *AaBв* мали пурпурні квітки, а в F_2 було отримано 9/16 (*A_B_*) рослин з пурпурними квітками і 7/16 (3/16 *A_bb*+ 3/16 *aaB_* + 1/16 *aabb*) з білими квітками, тобто, розщеплення склало 9:7 (рис. 3.7).

У цибулі спостерігається ще один варіант розщеплення при взаємодії комплементарних генів – 9:3:4. За схрещування цибулі з білою цибулиною з формою, яка має жовту цибулину в F_1 отримують рослини з червоною цибулиною. А в F_2 спостерігається розщеплення: 9/16 рослин з червоними, 3/16 – з жовтими і 4/16 – з білими цибулинами (рис. 3.8).

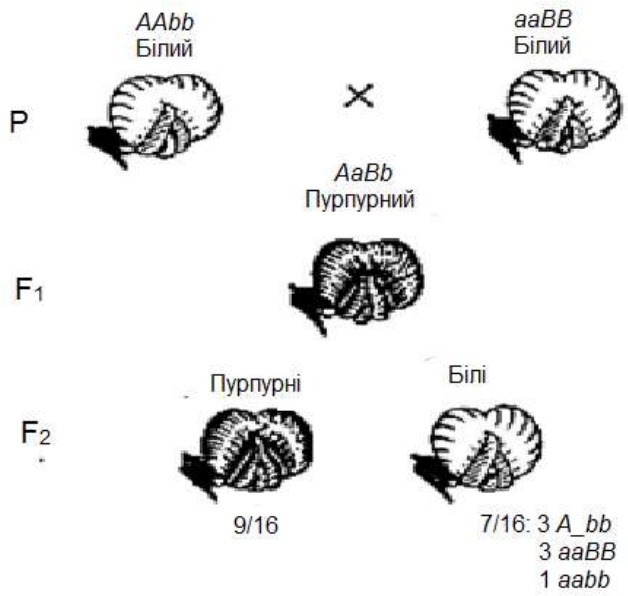


Рис. 3.7. Успадковування кольору квіток у *Lathyrus odoratus*

P:	*ccRR*	×	*CCrr*
	Біла		Жовта
Гаметы:	*cR*		*Cr*
F_1		*CcRr*	
Гаметы:		*CR, Cr, cR, cr*	
F_2	*9/16 C_R_* : 3/16 *C_rr* :	4/16 (3/16 *ccR_* + 1/16 *ccrr*)	
	Червоні	Жовті	Білі

Рис. 3.8. Успадковування кольору цибулини у *Allium cepa*

Червоне забарвлення цибулини обумовлене наявністю двох домінантних генів (*C_R_*). Домінантний алель *C* детермінує жовте забарвлення цибулини, а рецесивний алель *c* – біле. Домінантний ген *R* не має власного фенотипового прояву і об'єднується по фенотипу з рецесивною гомозиготою гена *c*, алель *r* не впливає на прояв забарвлення.

Епістаз – тип взаємодії неалельних генів, за якого ген одної алельної пари пригнічує дію генів іншої пари.

Гени, які пригнічують прояв інших генів, називають *супресорами*, а гени, які пригнічуються – *гіпостатичними***.** Розрізняють домінантний і рецесивний епістаз. При домінантному епістазі інгібіруючу дію проявляє домінантний алель: A>B.

Забарвлення зерен у кукурудзи визначається двома генами, які взаємодіють по типу домінантного епістазу. Ген *C* обумовлює забар-

влене зерна, а ген *I* пригнічує прояв пігменту (*I* > *C*); ген *c* детермінує біле забарвлення, ген *i* на забарвлення не впливає.

При схрещуванні рослин кукурудзи з незабарвленим зерном (генотип *CCII*) з рослинами з незабарвленим зерном, які мали генотип *ccii*, в F_1 усі рослини маюли незабарвлене зерно, а в F_2 відбувається розщеплення: 13/16 (9*C_I_* +3*ccI_* + *ccii*) рослин з незабарвленим зерном і 3/16 (*C_ii*) – із забарвленим зерном. У останніх відбувається нормальний синтез пігменту.

За домінантного епістазу можливе й інше розщеплення – 12:3:1 у випадку, якщо рецесивний алель епістатичного гену має власний фенотиповий прояв. Така взаємодія генів спостерігається при успадковуванні забарвлення плодів у гарбуза (рис. 3.9).

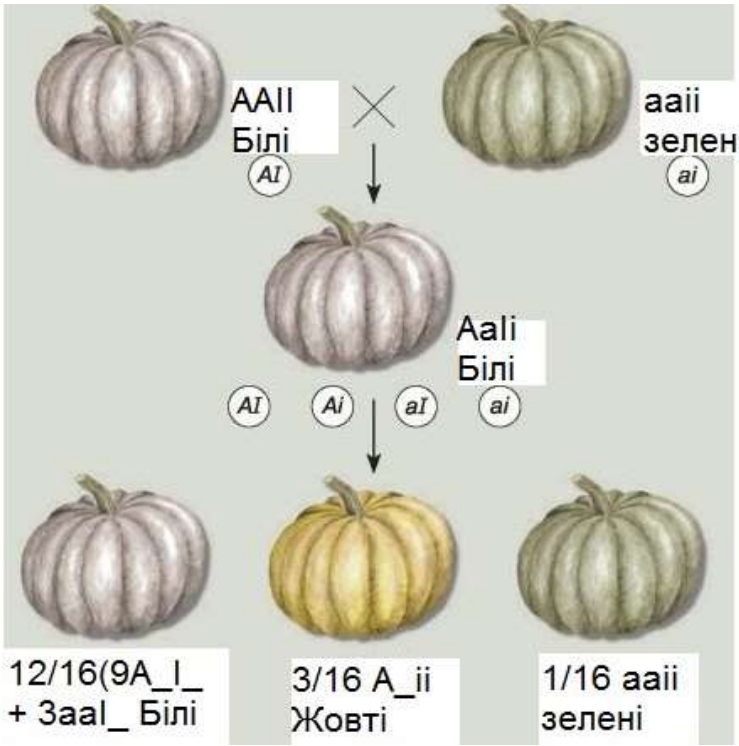


Рис. 3.9. Забарвлення плодів у гарбуза

Ген *A* обумовлює колір плодів, домінантний алель (*A*) обумовлює жовте забарвлення, рецесивний (*a*) – зелене. Ген *I* блокує роботу гена *A* (*I* > *A*). Серед нащадків F_2 від схрещування рослин з білими плодами (*AAII*) і з зеленими плодами (*aaii*) 12/16 (*9A_I_+3aaI_*) мають біле забарвлення плодів, 3/16 (*A_ii_*) – жовте і 1/16 (*aaii*) – зелене.

При рецесивному епістазі – *криптомерії* – рецесивна гомозигота одного гена подавляє дію іншого, неалельного домінантного гена: *A_<bb*. При криптомерії серед нащадків спостерігають розщеплення

9:3:4. Прикладом такого успадковування є хлорофільні мутанти у ячменю. Рослини ячменю дикого типу зелені, а мутантні форми можуть бути жовтими або зеленими. Нормальний процес утворення хлорофілу вимагає присутності двох домінантних генів (*A* і *B*). Мутація в кожному з них може приводити до порушення утворення хлорофілу: рослини з генотипом *A_bb* будуть жовтими (фенотип «xantha»), а з генотипом *aaB_* – білими (фенотип «albina»). Рослини *aabb* також будуть білими. При схрещуванні жовтих рослин з білими (*AAbb* × *aaBB*) в F_1 усі рослини будуть зеленого кольору (генотип *A_B_*), а в F_2 відбудеться розщеплення у співвідношенні 9 зелених (*A_B_*) : 3 жовтих (*A_bb*) : 4 білих (3 *aaB_* + 1 *aabb*). У даному випадку дія рецесивного гену *b* обмежує функціонування алелю *A*, внаслідок чого рослини набувають фенотип «xantha».

Цей приклад демонструє прояв одинарного рецесивного епістазу, однак існує ще й випадки подвійного рецесивного епістазу: *aa* подавляє дію *B_*, а *вв – A_*. При цьому у дигибридному схрещуванні розщеплення по фенотипу буде 9 :7, як і у випадку комплементарної взаємодії генів. Отже, одне й теж співвідношення можна трактувати і як комплементарну взаємодію, і як епістаз. Сам по собі генетичний аналіз успадковування взаємодії генів без урахування біохімії та фізіології розвитку ознаки в онтогенезі не може розкрити природи цієї взаємодії, але без генетичного аналізу неможливо зрозуміти спадкової детермінації розвитку цих ознак.

Полімерія – тип взаємодії неалельних генів, при якому декілька пар неалельних генів впливають на формування однієї ознаки, викликаючи схожі зміни.

Розрізняють *кумулятивну* і *некумулятивну полімерію*. При *кумулятивній полімерії* ступінь прояву ознаки залежить від числа домінантних алелів у генотипі. Так успадковується, наприклад, довжина качана у кукурудзи.

Одна з вихідних ліній (№ 60) має довжину качанів у межах від 5 до 8 см, лінія № 54 – від 13 до 21 см. Гібриди F_1 мають середні значення довжини качанів. Рослини F_2 фенотипово неоднорідні, довжина качанів варіює від 7 до 21 см. При цьому довжина качана пропорційна числу (дозі) домінантних генів у генотипі.

По типу кумулятивної полімерії успадковується пігментація шкіри у людини. Наприклад, у чорношкірого чоловіка і білої жінки (чи навпаки) народжуються діти з проміжним кольором шкіри – мулати. У подружжя мулатів можуть народжуватися діти з кольором

шкіри від чорного до білого, що визначається кількістю домінантних алелів. Аналіз нащадків великої кількості подружь мулатів виявив розщеплення: 1/16 ($A_1A_1A_2A_2$) чорні + 4/16 (2/16$A_1A_1A_2a_2$ + 2/16$A_1a_1A_2A_2$) темні мулати + 6/16 (1/16A_1A_{1a2a2} + 4/16$A_1a_1A_2a_2$ + 1/16$a_1a_1A_2A_2$) мулати + 4/16 (2/16$A_1a_1a_2a_2$ + 2/16 $a_1a_1A_2a_2$) світлі мулати + 1/16 ($a_1a_1a_2a_2$) – білі.

При *некумулятивній полімерії*, наявність у генотипі хоча б одного домінантного алеля визначає трикутну форму плодів у грициків звичайних (рис. 3.10).

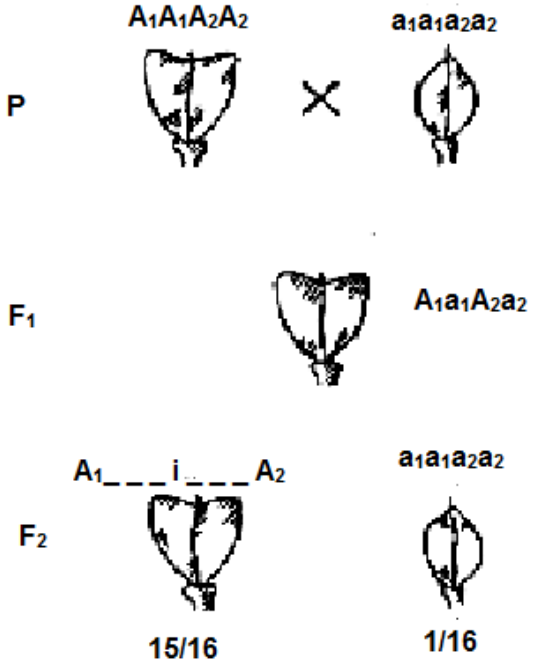


Рис. 3.10. Успадковування форми стручка у *Capsella bursa pastoris*

При схрещуванні рослини з трикутними плодами з рослиною з овальними плодами в F_1 утворюються рослини з плодами трикутної форми. При їх самозапиленні у F_2 спостерігається розщеплення на рослини з трикутними і овальними плодами у співвідношенні 15:1.

При полімерному типі успадковування можливий прояв *трансгресій*. Трансгресія – це явище, коли у гібридів ступінь прояву ознаки більший, ніж у батьківських форм.

Трансгресії можуть бути позитивними і негативними:

P: $A_1A_1a_2a_2A_3A_3a_4a_4 \times a_1a_1A_2A_2a_3a_3A_4A_4$

F_1: $A_1aA_2a_2A_3a_3A_4a_4$

F_2: $A_1A_1A_2A_2A_3A_3A_4A_4$ $aa_1a_2a_2a_3a_3a_4a_4$

позитивна негативна трансгресії

Отже, трансгресії проявляються у F_2, коли батьківські форми не володіють крайніми проявами ознак і не несуть усіх домінантних

(при позитивній трансгресії) або всіх рецесивних (при негативній трансгресії) алелів.

Гени-модифікатори – гени, які підсилюють чи послаблюють дію основного гена. Вивчення окраски ссавців показало, що поряд з крайніми формами, які мають повний розвиток пігменту (чорні) або його відсутність (альбіноси), є ряд проміжних форм – сіруваті, бурі, жовті. Забарвлення шерсті залежить від дії генів-модифікаторів, які не мають власного прояву, але здатні змінювати експресію основного гена. Гени-модифікатори здатні контролювати смак, колір і аромат плодів, тому їх рекомендують накопичувати для покращання ознак сортів плодових культур.

3.4. Пенетрантність і експресивність. Плейотропний ефект гена. *Пенетрантність гена* – це частка особин, у яких проявляється очікуваний за даного генотипу фенотип. *Експресивність* – це ступінь прояву ознаки, яка варіює. Ці поняття були введені М. В. Тимофєєвим-Ресовським у 1927 р. для опису мінливого прояву генів (рис. 3.11).

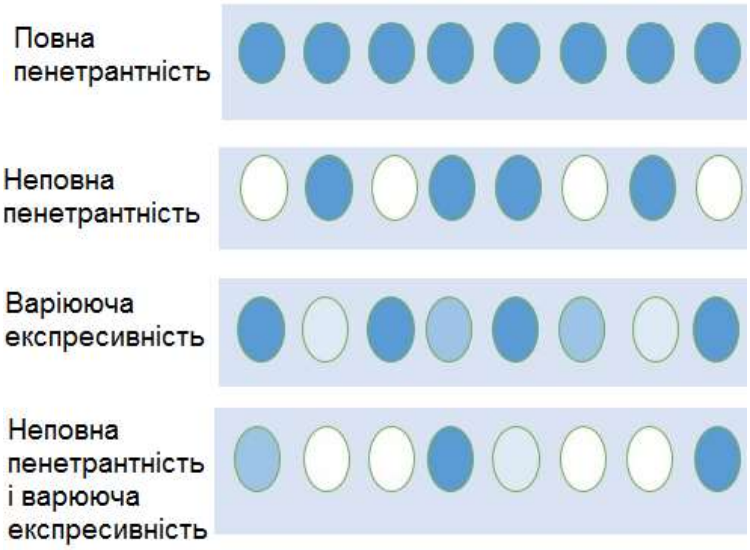


Рис. 3.11. Схема, яка пояснює варіювання пенетрантності та експресивності ознаки

Багато генів мають повну пенетрантність та експресивність. Так, в експериментах Г. Менделя усі горошини, які несли домінантний алель (як в гомозиготному, так і в гетерозиготному стані) були жовтими, а усі горошини, гомозиготні по рецесивному алелю були зеленими.

Однак, розглядаючи дію гена, його алелів, необхідно враховувати не лише генні взаємодії, але й вплив довкілля. Відомо, що у при-

мули забарвлення квітки визначається моногенно: генотип *P_* зумовлює рожеве забарвлення, а генотип *pp* – біле забарвлення. Але так відбувається, якщо рослини вирощують при 15-25 ºС. Якщо ж рослини вирощувати при 30-35 ºС, то всі квітки рослин другого покоління будуть білими. Рослини, вирощені при температурі між цими інтервалами, покажуть самі різноманітні співвідношення: від 3 рожеві : 1 білі до всіх білих.

Роль довкілля у прояві гена очевидна в ряді мутацій. Наприклад, дрозофіли, які мають температурозалежні умовно летальні мутації мають нормальну життєздатність при 20 ºС, але при 29 ºС вони втрачають рухомість або гинуть. Довкілля також впливає на експресивність морфологічних ознак. Наприклад, у людини полідактилія проявляється у присутності домінантного гена *D*, який контролює число променистих кісток. Експресивність генотипу *Dd* може варіювати у однієї і тієї ж особи, коли людина має на одній руці п’ять пальців, а на другій – шість. В цьому випадку варіювання експресивності визначається внутрішнім середовищем організму.

Плейотропія – явище, коли один ген впливає на декілька ознак. Це явище відмічав ще Г. Мендель у гороху: один з досліджуваних ним генів впливав одночасно на забарвлення квіток (червоне чи біле), забарвлення насіння (сіре чи коричневе) і забарвлення пазух листків (наявність або відсутність червонуватих плям). У кукурудзи відомі гени, які у гомозиготному стані обумовлюють ознаки ендосперму – цукристість (su_1), ламкість (bt_1), зморшкуватість (sh_2), малий розмір (*mn*). Разом з тим, кожний із зазначених генів змінює кількісний склад ендосперму за вмістом триптофану, нікотинової та індолоцтової кислоти.

Плейотропна дія гена може суттєво впливати на результати розщеплення. Так, ген платинового забарвлення хутра лисиць є домінантним по відношенню до сріблясто-чорного забарвлення. Однак, у гомозиготному стані він приводить до загибелі ембріонів (*AA*) на ранніх стадіях:

Aa	×	Aa
Платинові		Платинові
2Aa	:	1aa
Платинові		Сріблясто-чорні

Виживають лише гетерозиготні платинові лисиці. Подібним образом успадковується наявність (*aa*) або відсутність (*Aa*) лусок у дзеркаль-

ного карпа, сіре (*Aa*) і чорне (*aa*) забарвлення шерсті у каракулевих вівець. У людини усі живі ахондропластичні карлики – гетерозиготи. Гомозигот (*AA*) знайдено лише декілька десятків серед спонтанних абортусів.

На рівні первинної дії кожний ген має одну функцію – кодування одного поліпептиду. Отже, плейотропний ефект є відображенням інтегрованості процесів розвитку, в яких продукт одного біохімічного шляху може у підсумку впливати на багато інших шляхів розвитку. Наприклад, за фенілкетонурії мутантний ген не може забезпечити синтез ферменту, який відповідає за перетворення фенілаланіну у тирозин. Внаслідок цього фенілаланін накопичується в крові, що приводить до порушень розвитку мозку, зменшенню розмірів голови, зниженню інтелекту. Нестача тирозину приводить до нестачі пігментів і світлого волосся та блідої шкіри у хворих.

3.5. Генетика статі та успадковування ознак, зчеплених зі статтю. Статеве розмноження притаманне більшості живих організмів. Існування статевого процесу у прокаріотів та еукаріотів передбачає наявність принаймні двох статей. У природі найчастіше зустрічається роздільностатевість, тобто самостійне існування жіночих і чоловічих особин. Однак іноді у тварин, а частіше у рослин, є форми, в яких обидві статі існують спільно. Це так званий гермафродитизм.

Стать являє собою сукупність ознак і властивостей організму, що забезпечують відтворення потомства і передачу спадкової інформації. *Статевий диморфізм* – це відмінності морфологічних, фізіологічних і біохімічних ознак у осіб різної статі.

У прокаріотів риси статевого диморфізму виражені слабо і обмежуються наявністю у чоловічих бактеріальних клітинах статевого фактору – фрагмента ДНК, існуючого у вигляді цитоплазматичної структури або структури, інтегрованої в хромосому.

У водоростей, грибів, деяких найпростіших (інфузорії) є кілька статевих форм. У водоростей, наприклад, це плюс і мінус-форми, що виконують відповідно роль «чоловічих» і «жіночих» клітин.

У більш високо розвинених еукаріотів спостерігається чіткий статевий диморфізм, при якому відмінності між особинами жіночої та чоловічої статі виявляються вже і за морфологічними ознаками. Всі ознаки, що відрізняють одну стать від іншої, умовно ділять на дві групи: первинні і вторинні.

Первинні статеві ознаки забезпечують утворення гамет і об'єднання їх в процесі запліднення. До них відносяться гонади і статеві органи. *Вторинні статеві ознаки* – це сукупність морфологічних і фізіологічних ознак і властивостей, що визначають фенотипові відмінності між особинами різних статей. Значення їх в розмноженні непряме (тип волосяного покриву, тембр голосу, шлюбне забарвлення тварин), але формування контролюється діяльністю статевих гормонів, тобто вони пов'язані з функцією гонад.

Іноді виділяють ознаки, що не належать до рис статевого диморфізму, але прояв їх залежить від гормональної активності статевих залоз. Так, гени молочності не проявляються фенотипово у биків, несучості – у півнів. Кількість чоловічих і жіночих статевих гормонів в крові впливає і на форму домінування (ген, що детермінує роги у баранів, ген плішивості у людини).

Давно відомо, що співвідношення чоловічої і жіночої статі у нащадків від будь-якого схрещування близько до співвідношення 1:1. Таке розщеплення корелює з результатами аналізуючого схрещування – коли один з батьків гетерозиготний, а інший – гомозиготний по аналізованій ознаці. Тому можна припустити, що одна із статей як би гетерозиготна, а інша – гомозиготна по фактору, який визначає стать. Цитологічний аналіз виявляє найбільш помітну різницю між статями – наявність статевих хромосом в каріотипі, причому одна стать має однакові хромосоми, а в каріотипі іншої – дві різні статеві хромосоми, тобто ця стать як би «гетерозиготна». Привертає увагу величезна різноманітність варіантів статевого розмноження і відповідних їм версій визначення статі. Насамперед слід відзначити, що існує *прогамний* тип визначення статі (коловертки, попелиці), стать зиготи визначається вже в процесі дозрівання яйцеклітин.

За *сингамного* типу стать визначається у момент злиття гамет і утворення зиготи. Виділяють кілька типів визначення статі в залежності від числа і складу статевих хромосом, наприклад, у самця можуть бути X і Y хромосоми, а у самки – XX. До такого типу відносяться людина, дрозофіла, водяний клоп *Ligaeus*, на ім'я якого і названий даний тип визначення статі, а також багато інших видів тварин. Ще один тип, названий по імені іншого водяного клопа – *Protenor*, і зустрічається у деяких метеликів і хробаків, пов'язаний з наявністю у самців однієї X хромосоми, а у самок двох X хромосом.

Втім, слід зазначити, що у комах і ссавців механізми визначення статі суттєво розрізняються. У комах стать визначається співвідношенням Х хромосом і аутосом, а у ссавців – наявністю Y хромосоми. Саме тому клопи *Protenor* з каріотипом Х0 – нормальні самці, а людина з каріотипом Х0 – жінка, хвора на синдром Шерешевського-Терненра.

В 1921 р. К. Бріджес виявив у *D. melanogaster* самиць, що мали триплоїдний набір хромосом (3Х+3А). При схрещуванні їх з нормальними самцями (2А+ХY) серед нащадків крім нормальних самиць і самців виявили особин з проміжним або незвичайним проявом статевих ознак. В залежності від співвідношення кількості статевих хромосом і аутосом відбулося розщеплення на вісім класів (рис. 3.12). К. Бріджес дійшов висновку, що у дрозофіли стать визначається балансом числа гоносом і аутосом, а Y-хромосома взагалі не грає ролі; ця гіпотеза отримала назву *балансової*.



Рис. 3.12. Статеві типи *Drosophila melanogaster* в залежності від балансу гоносом і аутосом

Балансова гіпотеза пояснює і деякі випадки визначення статі у покритонасінних рослин. У куколиці білої (*Melandrium album* Mill.) стать визначається насамперед балансом Х- та Y-хромосом, зміна кількості аутосом ефекту не дає (табл. 3.1).

У ссавців процес визначення статі вивчено більш детально. Їх Y-хромосома невелика – 2-3 % гаплоїдного геному. Її фенотиповий вплив обмежений вагою сім'яників, рівнем тестостерону, серологіч-

ного HY-антигену, чутливістю органів до андрогенів і сексуальною поведінкою. Більшість послідовностей Y-хромосоми гомологічні ділянкам X-хромосоми або аутосом і лише частина з них унікальна. Наявність псевдоаутосомальних областей, які забезпечують кон'югацію в мейозі і рекомбінацію, є необхідною умовою фертильності. Вважають, що специфічна система Y-хромосоми забезпечує розвиток ембріонів обох статей у «морі материнських естрогенів» – жіночих статевих гормонів. Напрям диференціації статевих клітин на певному етапі залежить не від їх каріотипу, а від оточення, створеного соматичними клітинами гонад. У критичний пренатальний період первинні статеві клітини в яєчниках входять у мейоз на відміну від таких у сім'яниках, що зазнають блоку мейозу і входження в сперматогенез. Далі знову важлива роль каріотипу – присутність двох X-хромосом або Y-хромосоми.

Таблиця 3.1

Визначення статі у куколиці білої (*Melandrium album* Mill.)

Стать квітки	Каріотип	X:Y
Жіноча	2A XX	0,0
Чоловіча	2A XY	0,5
Чоловіча	2A XYY	1,0
	3A XY	
	4A XY	
	4A XXYY	
Чоловіча	4A XXXYY	1,5
Чоловіча (зустрічаються гермафродитні)	2A XXY	2,0
	3A XXY	
	4A XXY	
	4A XXXXYY	
Гермафродитні (зустрічаються чоловічі)	4A XXXXY	4,0

Інший тип хромосомного визначення статі знайдений у птахів, деяких метеликів, риб, земноводних і квіткових рослин. У них гетерогаметною (тобто з різними статевими хромосомами) статтю є жіноча, і самки мають набір статевих хромосом ZW або Z0, в той час як самці – ZZ.

Відомі й інші типи визначення статі. У деяких випадках поява чоловічої або жіночої статі визначається не спадковими відмінностя-

ми, а виникає під впливом умов середовища. Класичним прикладом служить морський хробак *Bonellia viridis*. Самці розміром в кілька міліметрів живуть у матці самки, де виконують своє завдання – запліднюють яйцеклітини. Самець є типовим паразитом, що живе всередині тіла самки, розмір якої приблизно дорівнює розміру сливи. Вільно плаваючі личинки, що розвиваються після запліднення яйцеклітин, деякий час ведуть вільний спосіб життя, а потім прикріплюються до хобота статевозрілої самки, або осідають і прикріплюються до дна. В останньому випадку розвивається самиця. Це *епігамний* тип визначення статі.

У дрозофіли і в інших організмів відомі випадки *гінандроморфізму*, коли різні ділянки тіла за своїми ознаками належать різним статям. Організм виглядає як мозаїка: одна частина чоловіча, а інша жіноча (рис. 3.13). В даному випадку зигота мала дві Х-хромосоми і мала розвинутися в самку. Вона була гетерозиготой по генам білоокості і маленьких крил *wm* / *w+m+*. Під час перших поділів дроблення Х хромосома з генами *w+m+* була загублена і екватор мітотичного поділу розташовувався по лінії симетрії від головної до хвостової частини ембріона. В результаті ліва частина тіла мухи складалася з клітин, які мають тільки одну Х хромосому, що відповідає каріотипу самця. Права сторона мала дві Х хромосоми і розвинулася в самку.

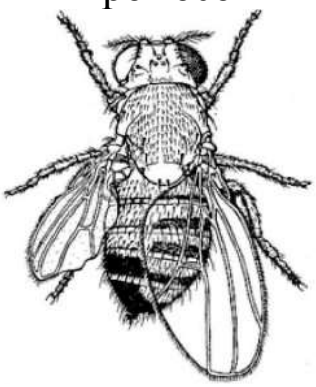


Рис. 3.13. Білатеральний гінандроморф *Drosophila melanogaster*

У непарного шовкопряда *Lymantria dispar* є різкі відмінності між самками і самцями. Схрещування різних географічних рас цього метелика (європейських і японських) привело до появи форм, перехідних за своїми ознаками між самцями і самками, тобто до появи *інтерсексуальності*. Інтерсекси виявлені і у дрозофіли. Від гінандроморфів інтерсекси відрізняються тим, що у них відсутні по різному детерміновані за статтю сектори. У інтерсексів до певного моменту розвитку зберігається генетично детермінована стать, але потім розвиток

триває в напрямку протилежної статі. В результаті інтерсекси відрізняються від нормальних особин тим, що у них первинні і вторинні статеві ознаки носять проміжний характер, створюючи безперервний ряд переходів від нормального самця до нормальної самиці.

Наряду з різностатевістю у багатьох рослин і у нижчих тварин чоловіча і жіноча стать поєднуються в одному організмі, який таким чином є *гермафродитом*.

Успадкування ознак, гени яких знаходяться в Х і У хромосомах, називається *успадкуванням, зчепленим зі статтю*.

Т. Г. Морган і його співробітники провели два типи схрещувань дрозофіл: в одному самки були нормальними за кольором очей (X^WX^W), а самці мали білі очі (X^wY), в іншому білооких самок (X^wX^w) схрещували з нормальними самцями (X^WY). Такі схрещування називають *реципрокними*, тобто проведеними в обох напрямках. У схрещуванні нормальних самок з білоокими самцями усі самці і самки першого покоління були червоноокими (X^WX^w і X^WY). У другому поколінні усі самки були червоноокими, а самці – червоноокими і білоокими у співвідношенні 1:1. Розщеплення 3:1 виходить, але своєрідне: самки усі одного фенотипу, а самці – двох (рис. 3.14а).

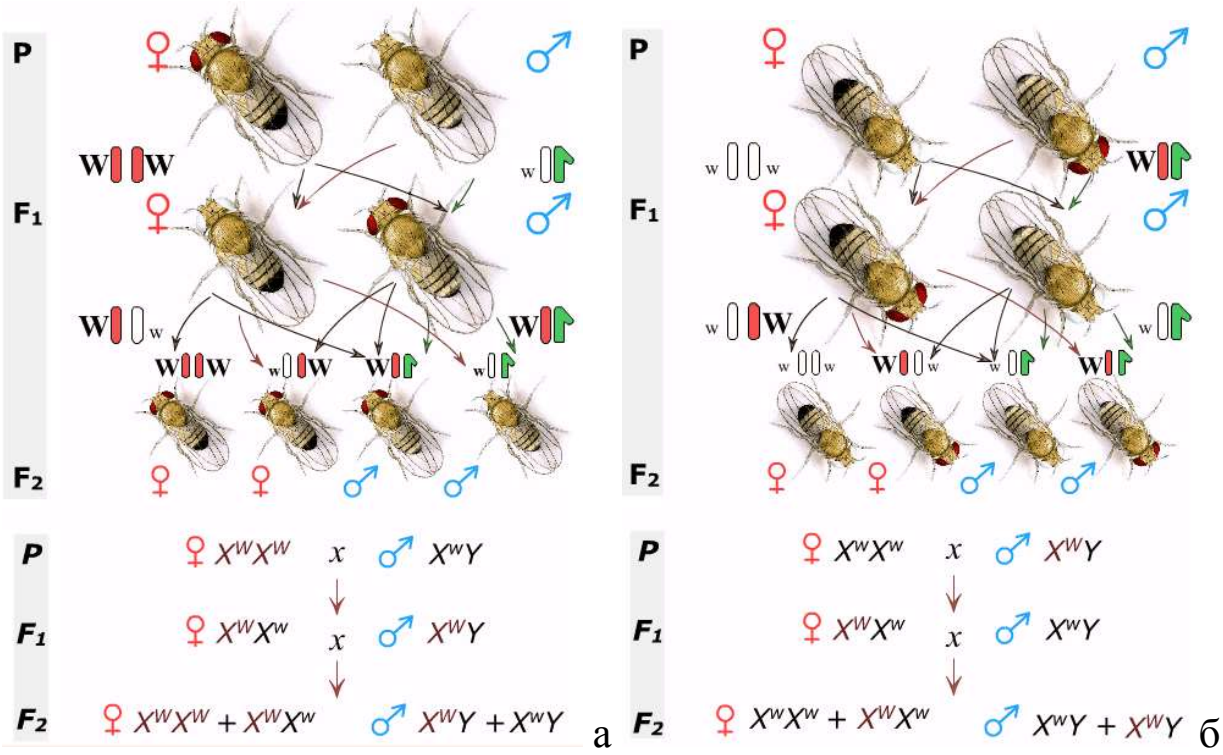


Рис. 3.14. Успадковування кольору очей у дрозофіли в реципрокних схрещуваннях

У випадку реципрокного схрещування, коли самка, гомозиготна по гену *w* (білі очі), схрещується з червонооким самцем, розщеплення спостерігається в першому ж поколінні щодо білооких і червонооких 1:1. Прі цьому білоокими виявляються тільки самці, а усі самки – червоноокі (рис. 3.14б). В F_2 і самки, і самці представлені і білоокими, і червоноокими особинами в рівних співвідношеннях.

Картина успадкування, коли в F_1 ознаки батьків передаються протилежній статі, називається *кріс-крос* (criss-cross – хрест-навхрест). Ці розщеплення повністю корелюють з поведінкою статевих хромосом. Саме в цьому експерименті була вперше показана генетичним чином роль хромосом у спадковості.

3.6. Зчеплення генів і кросинговер. Г. Мендель вивчав у гороху 7 альтернативних ознак. За сучасними даними, досліджувані ним гени мають наступну хромосомну локалізацію (у сучасній символіці): *R-r* (хромосома 7), *I-i* (хромосома 1), *A-a* (хромосома 1), *V-v* (хромосома 4), *Gp-gp* (хромосома 5), *Fa-fa* (хромосома 4), *Le-le* (хромосома 4). Тобто, 4 з 7 генів були зчепленими, але, як ми розуміємо тепер, завдяки кросинговеру імітувалося незалежне успадковування. Усього у гороху ідентифіковано понад 400 генів, які контролюють різні морфологічні, фізіологічні та біохімічні ознаки і властивості генеративних і вегетативних органів, а за даними аналізу транскриптому гороху їх чисельність оцінюється в 68-80 тис. Отже, кількість генів набагато перевищує кількість хромосом і мають існувати інші закономірності успадковування, відмінні від третього закону Менделя.

Зчеплене успадковування вперше виявили у 1906 р. В. Бетсон і Р. Пеннет у дослідах на духмяному горошку, які за дигібридного схрещування отримали в F_2 розщеплення, відмінне від менделівського 9:3:3:1. Розуміння цього явища стало можливим внаслідок досліджень Т. Х. Моргана та його школи. У 1911 р. з'ясували, що в гомологічній парі хромосом регулярно відбувається обмін генами. При схрещуванні організмів, що розрізняються по парі ознак, в F_1 виходять дигетерозиготи *AB/ab*. В схрещуванні нащадків F_1 з батьківською формою *ab/ab* в разі повного зчеплення мало б виходити розщеплення *AB/ab* і *ab/ab* у співвідношенні 1:1. Однак, завжди з'являються нові поєднання ознак, наприклад, *Ab/ab* і *aB/ab*. Отже, під час гаметогенезу утворилися нові типи гамет за рахунок перехрещення хромосом і обміну їх фрагментами (рис. 3.15).

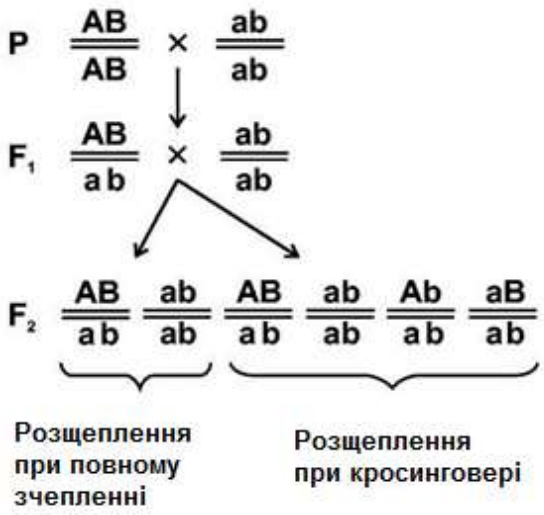


Рис. 3.15. Схема успадковування при повному і неповному зчепленні

Т. Х. Морган зі співробітниками схрещував лінії дрозофіл, що містять гени *a* – чорне тіло, *b* – зародкові крила. Далі ставилися реципрокні схрещування: в одному дигетерозиготою була самка, а дигомозиготою – самець, в іншому – навпаки. Якщо дигетерозиготою був самець, в потомстві 1 частина має фенотип, детермінований генами *Ab*, інша частина – *aB*. Ці класи розщеплюються в співвідношенні 1:1. В реципрокному схрещуванні отримали чотири класи нащадків, два з яких мають зчеплені гени, в тому порядку, в якому вони спостерігалися у батьків, а два інших класи виникли в результаті порушення зчеплення – це кросовери (рис. 3.16).

Ці результати неспростовно свідчать, що в ході гаметогенезу відбувся обмін фрагментами хромосом. У кожному з класів число мух було в певних числових співвідношеннях: *Ab/ab* і *aB/ab* становили по 41,5 %, тобто некросоверів було 83 %. Два кросоверних класи за кількістю особин були також однаковими (8,5 %), в сумі 17 %.

А. Стертевант припустив, що частота кросинговеру показує відносну відстань між генами: чим частіше здійснюється кросинговер, тим більш віддалені гени друг від друга в хромосомі. Чим рідше кросинговер, тим вони ближче. Таким чином він запропонував будувати лінійні карти розташування генів, де відстань між генами визначається частотою кросинговеру.

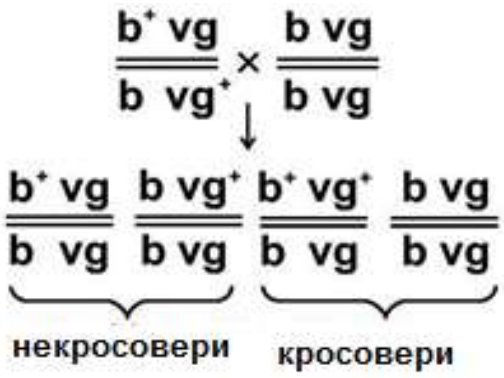


Рис. 3.16. Схема успадковування за наявності кросинговеру

Відсоток кросинговеру визначається як відношення числа гамет із зареєстрованими обмінами між двома певними парами алелів до загальної кількості гамет. Значення частоти кросинговеру між двома генами, що виявляється в експерименті, не може бути більше 50 % тому, що ця частота становить ймовірність нормального, тобто без кросинговеру, розходження хромосом. Тому відстань між далеко розміщеними генами визначають не шляхом розрахунку кількості кросоверних гамет у дигетерозиготи на підставі наслідків аналізуючого схрещування, а шляхом додавання відстаней між багатьма близько розташованими генами.

У СРСР для позначення частоти кросинговеру, що дорівнює 1 %, використовували термін «морганіда» на честь Т. Х. Моргана. У США довгий час використовували термін «одиниця карти» (map unit – m.u.). Починаючи з 1980-х років, майже повсюдно використовують термін «*сантиморган*» (centiMorgan або сМ).

Г. Меллер (1916), аналізуючи дані А. Стертеванта і Т. Х. Моргана, виявив, що ймовірність подвійних обмінів не дорівнює добутку ймовірностей одинарних обмінів. Так, якщо частота рекомбінації між генами *b* и *w* становить 1,3 %, а між генами *w* і *mi* 32,6 %, то очікувана частота подвійних обмінів має скласти 0,43 %. Фактично ж вона була 0,045 %. Це означає, що обмін, який відбувся, зменшує ймовірність виникнення біля нього іншого обміну. Г. Меллер назвав це явище інтерференцією і запропонував вимірювати її ступінь коефіцієнтом збігу або *коінциденції* С:

$$C = \frac{\text{фактична частота подвійних обмінів}}{\text{теоретично очікувана частота подвійних обмінів}}$$

У наведеному прикладі С = 0,106. Г. Меллер показав, що С залежить від відстані між генами: чим більше відстань, тим більше С. На відстані близько 35 % інтерференція зникає (С=1).

Ступінь інтерференції, імовірно, контролюється генетично. На основі цитогенетичних досліджень К. Мазер (1936) показав, що хіазми утворюються у правильній послідовності, починаючи від центромери. Перша хіазма, що утворюється, відмінна від інших тим, що середній інтервал між нею і центромерою корелює з довжиною хромосомного плеча, в той час як середня величина інтервалів до наступних хіазм постійна для всіх хромосом даного організму.

Цитологічні докази кросинговеру. На початку 1930-х рр. К. Штерн отримав лінії дрозофіли, у яких статеві хромосоми відмінні одна від одної. У самки одна з Х-хромосом мала невеликий фрагмент Y-хромосоми, що надало їй специфічну Г-подібну форму, легко помітну під мікроскопом (рис. 3.17).

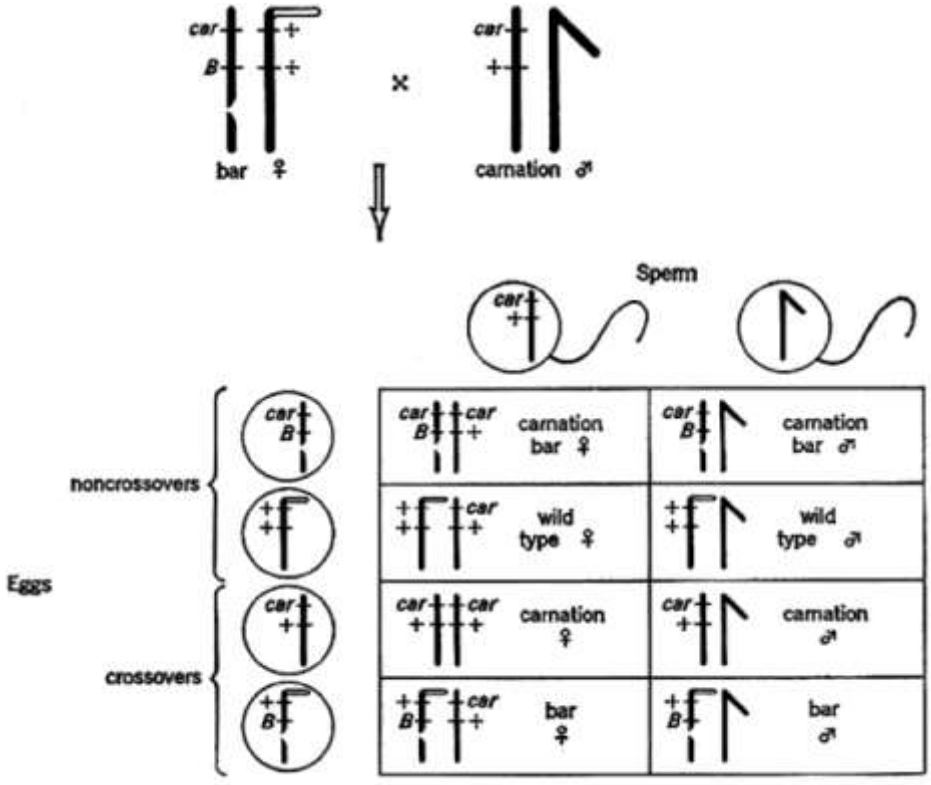


Рис. 3.17. Схема експерименту по цитологічному доказу кросинговеру у *D. melanogaster*

Були отримані самки, гетерозиготні за двома вказаними морфологічно різними Х-хромосомами і одночасно за двома генами – *Bar* (*B*) і *carnation* (*car*). Цитологічний аналіз 374 препаратів самок показав, що в 369 випадках каріотип відповідав очікуваному. Всі чотири

класи самок мали по одній нормальній, тобто паличкоподібній Х-хромосомі, отриманій від батька. Кросоверні (тобто *Bcar*+ за фенотипом) самки містили двоплечу Г-подібну Х-хромосому.

Ці результати підтвердили гіпотезу Т. Х. Моргана і його співробітників про те, що кросинговер – це обмін ділянками гомологічних хромосом і що гени дійсно локалізовані в хромосомах.

Аналогічні результати були отримані на кукурудзі (рис. 3.19). Г. Крейтон і Б. МакКлінток отримали лінію, в якій хромосоми IX пари у кукурудзи виявилися цитологічно різними (гетероморфними). Одна була нормальною і несла гени *c* (незабарвлений ендосперм) і *Wx* (крохмалистий ендосперм), інша несла knob (потовщення) одного плеча, друге плече було довше. Ця хромосома була маркована генами *C* (забарвлений ендосперм) і *wx* (воскоподібний ендосперм).

У цьому схрещуванні з'ясували, що кросоверні зерна незмінно містили IX хромосому з обмінами ділянками: хромосому нормальної довжини, але з потовщенням, або хромосому без потовщення, але подовжену.

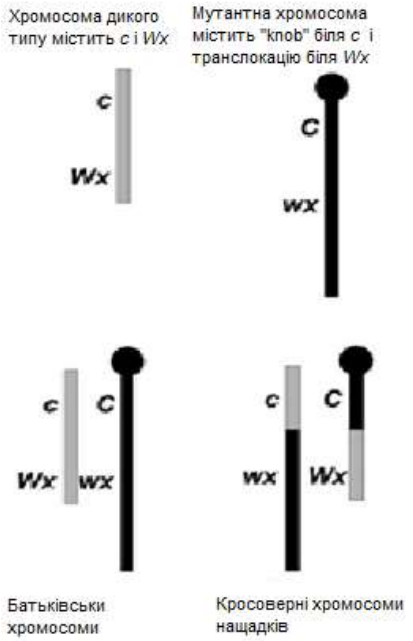


Рис. 3.19. Схема кросинговеру в IX парі хромосом кукурудзи

Мітотичний (соматичний) кросинговер. Досі ми розглядали обміни ділянками хромосом, що відбуваються в ході мейозу. Однак, як з'ясувалося, кросинговер може відбуватися і в соматичних клітинах в ході мітозу. Гомологічні хромосоми в інтерфазі кон'югують і входять в мітотичний поділ спареними. Соматичний кросинговер може бути виявлений, якщо він здійснюється на стадії чотирьох хроматид (рис. 3.20).

Фактори, що впливають на частоту кросинговеру. На частоту кросинговеру впливають:

а) зовнішні умови (температура та ін.),

б) стадії розвитку (вік),

в) стать,

г) генотип (певні гени або структурні зміни хромосом).

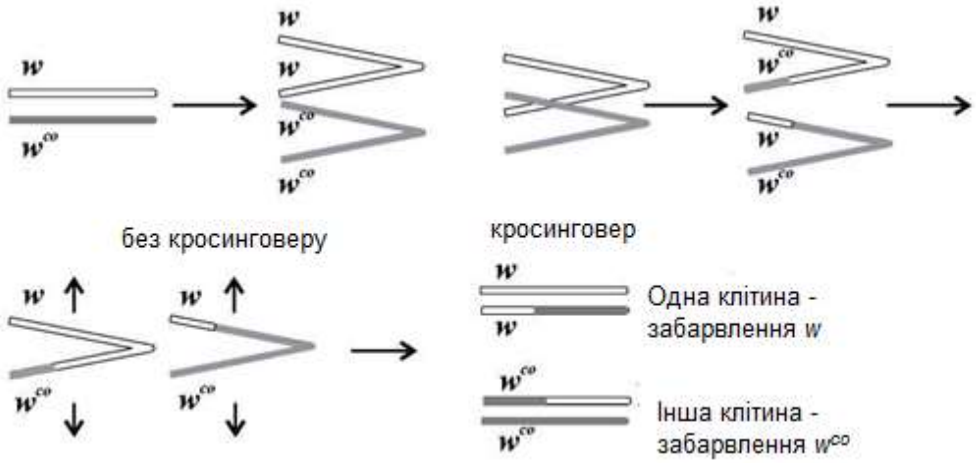


Рис. 3.20. Схема мітотичного кросинговеру

Кросинговер виявлений майже у всіх вивчених видів тварин і рослин, проте, формування обмінів хромосом залежить від статі, наприклад, у самців дрозофіли і самок шовкопряда (обидві статі гетерогаметні) кросинговер не відбувається.

В численних експериментах показано, що у дрозофіли за умов низьких (9-13 °С) і високих (30-32 °С) температур частота кросинговеру збільшується, в той час як при оптимальних для розвитку температурах виявляється набагато менша частота кросинговеру. Так, на ділянці між генами *It* і *stw* при 25 °С – нормальної для дрозофіли температурі – виявлена низька частота обмінів – 0,05%. Після теплового шоку вона зростає більше ніж в 30 разів (досягає значення 1,7%).

3.7. Позахромосомне (цитоплазматичне) успадковування. Якщо коротко підсумовувати основні аргументи на користь особливого статусу нехромосомної спадковості, то їх можна звести до наступного:

1. Менделівські закони успадкування є за своєю суттю законами сегрегації хромосом в клітинах і, отже, гібридологічний аналіз може бути застосований лише до генів хромосом. Гени органел розподіля-

ються в клітинних потомствах інакше, внаслідок чого їх генетичний аналіз вимагає інших підходів.

2. Органели дійсно містять мале число генів, але функціонально ці гени пов'язані з найважливішими процесами життєдіяльності організмів – внутрішньоклітинним диханням та фотосинтезом, а ці процеси більш, ніж будь-які інші, визначають адаптивність та продуктивність організмів.

3. Множинність копій генів цитоплазматичних органел створює інший механізм реалізації цитоплазматичних мутацій, суттєво відмінний від ядерних. Можливим результатом специфічності цитоплазматичного мутагенезу є мутаційна і, отже, еволюційна консервативність генів цитоплазматичних органел. З іншого боку, є достатньо багато прикладів надзвичайно високого виходу цитоплазматичних мутацій (до 100 %) під дією специфічних мутагенів, чого з ядерними генами ніколи не відбувається.

4. Тваринна клітина містить, як мінімум, дві, а рослинна – три генетичні системи. Ці системи функціонують по різному, але взаємопов'язано. При цьому виникає складність взаємодії, котра сама по собі вимагає спеціального вивчення.

Формально в поняття носіїв спадкової мінливості можна включити усі внутрішньоклітинні органели, частки інфекційної та неінфекційної природи, віруси, плазміди, епісоми і навіть внутрішньоклітинні бактеріоїди, такі, як, наприклад, бульбочкові бактерії або внутрішньоклітинні бактеріальні включення комах, якщо вони містять в собі генетичну інформацію. Однак, як правило, це, в першу чергу, пластиди та мітохондрії, які є стабільними клітинними елементами з вивченими та охарактеризованими генними маркерами, власною генетичною та білок-синтезуючою системами.

В 1904 році один з перевідкривачів законів Менделя – К. Корренс, вивчаючи успадкування статі у чаберу садового, прийшов до висновку, що успадкування чоловічої стерильності у цієї рослини ніяк не укладається в рамки менделівських законів. При запиленні рослин з дефектними пиляками пилком з нормальних рослин серед нащадків першого покоління всі 100 % рослин мали дефектні пиляки. На перший погляд таке успадкування можливо трактувати як домінування чоловічої стерильності. Однак, в другому поколінні після повторного запилення стерильних рослин фертильними з'явилося знов 100 % стерильних, тобто по суті аналізуюче схрещування не приводило до розщеплення 1:1. Пізніше, відтворюючи ці експерименти на

зніті П. Міхаеліс показав, що навіть 25-разове беккросування пилком батька аж ніяк не змінює цю ознаку. Таке успадкування називається успадкуванням по материнській лінії.

Крім строкатолистості та чоловічої стерильності у вищих організмів були виявлені й інші ознаки, гени яких не розташовані у хромосомах. Наприклад, різні порушення процесу дихання у дріжджів, феномен передчасного старіння у нейроспори, деякі спадкові хвороби людини. При самому різному характері успадкування таких ознак можливо виявити і деякі загальні риси, притаманні для них:

1. Наявність соматичного розщеплення, при якому різні частини організмів несуть різні генетичні потенції, в той час як менделівські гени однакові в усіх частинах рослини і розщеплення відбувається на рівні окремих особин, а не частин особини. Соматичне розщеплення можна визначити як розщеплення на рівні одної особини.

2. Розщеплення цитоплазматичних генів відбувається в мітозі та мейозі, в той час як менделівські гени розподіляються лише в ході мейозу.

3. Специфічні відмінності в реципрокних схрещуваннях. У двостатевих організмів (частіше у рослин) відмінності за ознаками, які знаходяться під контролем ядерних генів, не спостерігаються, а у роздільностатевих організмів (частіше у тварин) такі відмінності пов’язані із статевими хромосомами і дають передбачувані чисельні співвідношення.

4. Спостерігається материнське успадкування ознак, хоча відомі випадки і змішаного успадкування. В обох випадках чисельні відношення нащадків різні і не укладаються в рамки звичайних менделівських чисельних співвідношень 3:1, 15:1, 9:7 і т. і.

Ці чотири особливості успадкування позахромосмних генів є одночасно і критеріями позахромосомного успадкування ознак, за якими можна, хоча б попередньо, судити про те, чи знаходиться ген, який визначає дану ознаку, в хромосомах або за їх межами. Чи достатньо лише одного з цих критеріїв? Ймовірно, що ні, оскільки інколи ознаки, які успадковуються хромосомно, можуть демонструвати той чи інший з вище зазначених критеріїв. З іншого боку, використання всіх чотирьох критеріїв не завжди можливо, оскільки навіть цитоплазматично успадковувані ознаки не завжди відповідають усім цим критеріям.

Хлоропластна ДНК (хпДНК) являє собою замкнуту кільцеву двоспіральну молекулу. Її розміри варіюють у різних видів рослин переважно в інтервалі 130-160 тис. п. н. В даний час повністю розшифрована нуклеотидна послідовність хпДНК ряду видів. При цьому виявлені загальні принципи організації хпДНК та її консервативність в ході еволюції. Хлоропластна ДНК містить близько 130 генів. У ній представлені по два гена чотирьох типів (4,5S, 5S, 16S і 23S) рибосомальної РНК (рРНК), гени всіх транспортних РНК (біля 30 видів), гени рибосомальних білків (близько 20), гени субодиниць РНК-полімерази – ферменту, що здійснює синтез РНК на хпДНК. Хлоропластний геном кодує близько 40 білків тилакоїдної мембрани, що беруть участь у формуванні комплексів електронно-транспортного ланцюга. Це складає близько половини білків, що входять до них. Решта білків тилакоїдної мембрани кодуються в ядрі. Хлоропластна ДНК містить ген великої субодиниці ключового ферменту фотосинтезу рібулозодифосфаткарбоксілази (РДФК).

Секвенований мітохондріальний геном покритонасінної рослини – арабідопсису – має розмір 367 т. п. н. і містить 58 генів. Для 49 % послідовностей мтДНК функції не встановлені. Знайдені у рослин мітохондріальні гени відносяться до наступних груп:

1. Гени рибосомальних білків.

2. Гени тРНК, які задовольняють потреби мітохондрій частково. Відсутні тРНК імпортуються з цитоплазми. Вони кодуються ядром або пластидами.

3. Гени рРНК, які звичайно кодують 26S, 18S і 5S рРНК. Деякі види, наприклад, кукурудза містять ще один ген – 4,5S рРНК, схожій з бактеріальним. Гени 18S і 5S рРНК зчеплені в один кластер.

4. Гени субодиниць комплексів дихального ланцюгу (NADH-дегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа, цитохром *b*, цитохром *c*) і АТФ-синтетазного комплексу – всього 18 генів.

5. Гени білків біогенезу цитохрома *c* (4 гени в арабідопсису) та деякі інші, а також псевдогени. Останні бувають двох типів: такі, що мають повноцінні аналоги в мітохондріальному геномі, і такі, що не мають інтактної копії. Останнє може бути зв’язане або з переносом відповідного гена в ядро, або із заміною мітохондріальної матриці на ядерну, внаслідок чого мітохондріальний ген стає не потрібним.

Мітохондріальний геном тварин редукований набагато більше. Мітохондріальна ДНК людини має всі ознаки, характерні для мтДНК ссавців: типовий розмір – 16 569 п. н., кільцеву структуру, 37 генів,

реплікується з утворенням D-петлі та експресується за допомогою ряду ядерних факторів.

Походження ДНК органел. Широко поширена думка, що мітохондрії і хлоропласти походять від прокаріотичних ендосимбіонтів, які мешкали в цитоплазмі попередників еукаріот. Як вважають, мітохондріям дали початок α-протеобактерії, а хлоропластам – ціанобактерії (синьо-зелені водорості) або близькі до них організми. Симбіонти проникли в еукаріотичні клітини і в ході еволюції втратили свою автономність, передавши велику кількість найважливіших генів в ядерний геном. В результаті незалежна бактеріальна клітина перетворилася в напівавтономну органелу, яка зберегла головну вихідну функцію – здатність до фотосинтезу (у хлоропластів) і систему окисного фосфорилювання (у мітохондрій).

Хоча багато генів цих древніх бактерій все ще використовуються для синтезу білків органели, велика їх частина з незрозумілих причин включилася в ядерний геном, де вони кодують ферменти, які схожі з бактеріальними і синтезуються на рибосомах в цитоплазмі, а потім переходять в органелу.

Питання для самоконтролю

1. Що є предметом генетики?
2. Які доменделівські гіпотези про спадковість вам відомі?
3. Який рік вважають датою народження генетики?
4. Назвіть етапи розвитку генетики.
5. Що таке ген?
6. Дайте визначення термінам *генотип* і *фенотип*.
7. Назвіть основні положення клітинної теорії.
8. Опишіть модель будови ДНК.
9. Пояснить принцип комплементарності.
10. Які форми ДНК вам відомі?
11. Опишіть потік інформації у клітині.
12. Опишіть рівні укладки ДНК у хромосомі.
13. Як здійснюється реплікація ДНК?
14. Що забезпечує високу точність реплікації ДНК?
15. Що таке фрагменти Оказакі?
16. Що таке реплікон?
17. Назвіть основні шляхи репарації ДНК.
18. Як здійснюється реалізація генетичної інформації?
19. Що таке транскриптон?

20. Опишіть схему транскрипції.
21. Що таке інтрони і екзони?
22. Що таке процесинг?
23. Що таке сплайсинг?
24. Що таке інформосома?
25. Назвіть основні властивості генетичного коду.
26. Що таке трансляція?
27. Що таке полісома?
28. Назвіть основні етапи трансляції.
29. В яких структурах відбувається синтез білків?
30. У чому суть центральної догми молекулярної біології?
31. Назвіть основні принципи гібридологічного аналізу.
32. Дайте визначення домінантним і рецесивним генам.
33. Які типи взаємодії алельних генів вам відомі?
33. Дайте визначення терміну алель.
34. Дайте визначення терміну геном.
35. Що таке гомозиготи і гетерозиготи?
36. У чому суть першого закону Менделя?
37. У чому суть другого закону Менделя?
38. У чому суть третього закону Менделя?
39. Що таке аналізуюче схрещування?
40. Що таке моногібридне схрещування?
41. Що таке полігібридне схрещування?
42. Назвіть можливі причини відхилення від менделівських законів.
43. Назвіть основні типи взаємодії неалельних генів.
44. Які варіанти розщеплень можливі за комплементарії?
45. Що таке епістаз, які типи епістазу вам відомі?
46. Що таке криптомерія?
47. Що таке полімерія, які типи полімерії вам відомі?
48. Що таке трансгресія?
49. Що таке пенетрантність гена?
50. Що таке експресивність гена?
51. Поясніть явище плейотропії.
52. Що таке первинні статеві ознаки?
53. Що таке вторинні статеві ознаки?
54. Які механізми визначення статі вам відомі?
55. Поясніть явище гінандроморфізму.
56. Хто такі інтерсекси?

57. Які схрещування називають реципрокними?

58. Які ознаки вказують на успадковування, зчеплене зі статтю?

59. Які ознаки вказують на зчеплене успадкування?

60. Що таке кросовери?

61. У яких одиницях вимірюють відстань між генами?

62. Яке схрещування дає змогу визначити відстань між генами у групі зчеплення?

63. Наведіть цитологічні докази кросинговеру.

64. Що таке мітотичний кросинговер?

65. Назвіть фактори, які впливають на частоту кросинговеру.

66. Наведіть ознаки позахромосомного успадковування.

67. Які клітинні структури є носіями позахромосомної спадковості?

68. Наведіть приклади ознак, що мають позахромосомну детермінацію, і назвіть пов’язані з цими ознаками структури.

69. Наведіть стислу характеристику геному пластид.

70. Наведіть стислу характеристику геному мітохондрій.

71. Поясніть походження пластид і мітохондрій

ІІ. ГЕНЕТИЧНІ ЗАСАДИ МІНЛИВОСТІ ТА ОКРЕМІ ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ

4. Мінливість

Під *мінливістю* розуміють властивість живих організмів набувати в процесі індивідуального розвитку (онтогенезу) нові морфофункціональні ознаки і особливості, що відрізняються від батьківських. З еволюційної точки зору розрізняють *групову мінливість*, під якою розуміють різницю між популяціями, етносами або расами, і *індивідуальну мінливість*, тобто відмінності між особинами однієї популяції. Індивідуальна мінливість набагато ширше групової. Процеси, що визначають мінливість, неоднорідні. Одні з них можуть проявлятися тільки у вигляді варіації ознак, інші зачіпають генетичний апарат. Відповідно до цього виділяють *фенотипову* (*неспадкову*) і *генотипову* (*спадкову*) мінливість.

4.1. Неспадкова мінливість. При фенотиповій мінливості спадковий матеріал до змін не залучається. Вони стосуються лише ознак індивіда і відбуваються під дією факторів зовнішнього і внутрішнього середовища. Подібні зміни не успадковуються, навіть якщо вони обумовлені постійним впливом протягом історично тривалого часу. Якщо зміни ознаки є реакцією на дію певного чинника і по вираженості не виходять за межі *норми реакції*, то такі зміни називають *модифікаційними*. Модифікаційна мінливість має адаптивне (пристосувальне) значення.

Відомості про модифікації потрібні, перш за все, для розуміння того, як відбувається реалізація генетичної інформації, оскільки формування організму визначається не тільки генами, а й різноманітними впливами зовнішнього середовища, в якому розвивався організм.

Морфологія листя у водяного жовтцю і стрілиці звичайної залежить від того, в якому середовищі – повітряному або підводному, вони розвиваються (рис. 4.1). Зміни розмірів листків спостерігаються навіть у дерев в залежності від органів, які їх формують: листки з прикореневої парості мають більший розмір, ніж листки на гілках крони різного порядку (рис. 4.2). Якщо надземну частину стебла картоплі штучно позбавити доступу світла, на ній розвиваються бульби, що висять у повітрі (рис. 4.3).

У камбали, яка веде донний спосіб життя, верхня поверхня тіла темна, що робить її непомітною, а нижня поверхня тіла світла. Але

якщо акваріум зроблений зі скляним дном і висвітлюється не зверху, а знизу, то темною стає нижня сторона тіла.



Рис. 4.1. Вверху – водяний жовтець, зліва – водні листки, праворуч – повітряні. Внизу – стрілиця звичайна з надводними, плаваючими і підводними листками



Рис. 4.2. Листки з прикореневої парості (ліворуч) та з гілок різного порядку крони (праворуч) липи

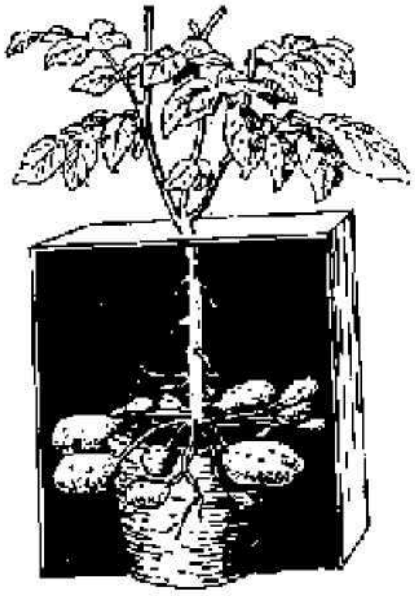


Рис. 4.3. Бульби картоплі, що утворюються над землею у темряві

Кролики горностаєвої породи мають білий колір тіла крім кінців морди, лап, хвоста і вух. Якщо виголити ділянку білого волосся, наприклад, на спині і тримати кроликів при зниженій температурі (0-1 °С), то на виголеному місці відростає чорна шерсть. Якщо виголити частину чорного волосся і помістити кролика в умови підвищеної температури, то відростає біла шерсть.

Пов’язано це з тим, що для кожної ділянки тіла характерний свій рівень кровообігу і відповідне варіювання температури тіла, в залежності від чого формується або деградує чорний пігмент – меланін (рис. 4.4). Генотип при цьому залишається однаковим.



Рис. 4.4.Карта температурних порогів пігментації у кролика

У модифікацій описані наступні властивості:

1. Ступінь вираження модифікації пропорційна силі і тривалості дії на організм фактору, що викликає модифікацію. Ця закономірність докорінно відрізняє модифікації від мутацій.

2. У переважній більшості випадків модифікація являє собою корисну пристосувальну реакцію організму на дію того чи іншого зовнішнього фактору.

3. Адаптивними бувають тільки ті модифікації, що викликаються звичайними змінами природних умов, які безліч разів зустрічалися особинам даного виду протягом його минулої еволюційної історії. Якщо ж організм потрапляє в незвичайні обставини, з якими його предкам стикатися не доводилося, то виникають модифікації, позбавлені пристосувального значення.

4. Не мають пристосувального значення (а нерідко представляють навіть справжні каліцтва) модифікації, що викликаються екстремальними експериментальними впливами, особливо хімічними і фізичними факторами, з якими організм не стикається в природі. Індуковані таким чином модифікації називають *морфозами*. Якщо діяти на личинок або лялечок дрозофіли, наприклад, рентгенівськими чи ультрафіолетовими променями, то у мух, що розвиваються, спостерігаються різноманітні морфози, характер яких залежить від індукуючого фактора і його інтенсивності, а також від стадії розвитку організму в момент впливу. Деякі з цих морфозів дуже схожі на зміни, викликані мутаціями відомих генів. Так, під впливом теплового шоку, якому піддавалися передкуколки і лялечки, були отримані мухи з закрученими догори крилами, з вирізками на крилах, з розставленими крилами, з крилами малих розмірів. Фенотипово відрізнити їх від мух декількох мутантних ліній дрозофіли неможливо (досліди Мітчелла). Такі модифікації, що нагадують прояв відомих генів, отримали назву *фенокопій*.

5. Варіювання ступеня стійкості модифікацій. На відміну від високої константності мутацій, модифікації мають різний ступінь стійкості. Багато з них оборотні, тобто виникла зміна поступово зникає, якщо усунуто вплив, який її викликав. Так, засмага у людини проходить, коли шкіра перестає піддаватися інсоляції, обсяг м’язів зменшується після припинення тренування і т. і. Лише дуже рідко модифікація зачіпає, теж поступово сходячи нанівець, ряд поколінь, але поколінь не статевих, а тих, що утворюються при вегетативному або партеногенетичному розмноженні. Такі тривалі модифікації описані, наприклад, у інфузорій-туфельок. Спочатку вони витримували концентрацію миш’яковистої кислоти не вище 1,1 %. Однак, переводячи їх у все

більш міцні розчини, вдалося домогтися, що вони стали переносити навіть 5 % концентрацію отрути. Після припинення впливу, стійкість туфельок до миш'яковистої кислоти повільно знижувалася, але тільки через 10 з половиною місяців вона опустилася до вихідного рівня, тобто модифікація зникла лише приблизно за 600 вегетативних поколінь.

6. Неспадковий характер модифікацій. На відміну від мутацій, модифікації не передаються у спадок. Це положення найбільш гостро обговорювалося протягом всієї історії людства. Вважали, що успадковуватися можуть будь-які зміни організму, як вроджені, так і придбані протягом життя. Навіть Дарвін визнавав можливість успадковування деяких модифікаційних змін.

Перший серйозний удар по уявленню про успадковування придбаних ознак завдав А. Вейсман. Протягом 22 поколінь він відрубував білим мишам хвости і схрещував їх між собою. В цілому було обстежено 1592 особи і жодного разу не було виявлено укорочення хвоста у новонароджених мишенят. У подібному експерименті, результати якого були опубліковані в 1913 р., по суті не було необхідності, оскільки події, аналогічні експериментам Вейсмана, часто зустрічаються і в звичайному житті людей. Результати навмисних пошкоджень у людини, зроблені з ритуальних або «естетичних» міркувань – обрізання, протикання вух, губ, носової перегородки, видалення зубів, спотворення ступень, черепа тощо, як відомо, не успадковуються.

У СРСР в 1930-1950-і роки набули широкого поширення помилкові твердження Т. Д. Лисенка і його послідовників про успадкування «придбаних ознак», тобто соматичних змін, що виникають протягом життя особини під впливом факторів середовища, а потім здатних адекватно передаватися її нащадкам, тобто проявлятися у них в такому ж вигляді, як у батька, навіть без дії цих факторів. Безліч ретельних дослідів, проведених на різних організмах, показали неспадковий характер модифікацій, і дослідження такого роду представляють тепер лише історичний інтерес. У теперішній час сформульована Ф. Криком так звана «Центральна догма молекулярної біології», однозначно заперечує перенос інформації від білків до нуклеїнових кислот.

Норма реакції. Фенотип формується за рахунок взаємодії двох чинників: генотипу і зовнішнього середовища. Властивість даного генотипу забезпечувати в певних межах мінливість онтогенезу в залежності від мінливих умов середовища, називають *нормою реакції*. Інакше кажучи, амплітуда можливої мінливості в реалізації генотипу висловлює норму реакції (рис. 4.5). Норму реакції спостерігати найкраще у організмів з однаковим генотипом, наприклад, у рослин, які вегетативно розмножуються, або у монозиготних близнюків. В цьому випад-

ку можна виявити норму реакції генотипу в найбільш «чистому» вигляді.

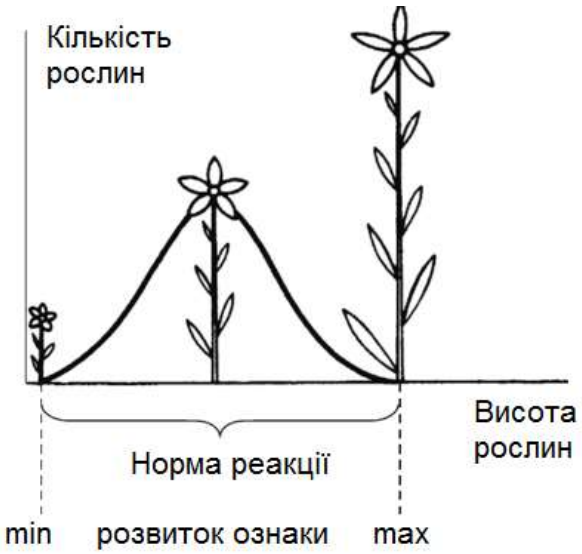


Рис. 4.5. Норма реакції гіпотетичної рослини

Повністю охарактеризувати норму реакції, притаманну тому чи іншому генотипу, практично неможливо, тому що для цього довелося б вивчити, як змінюється фенотип особин даного генотипу в усіх різноманітних умовах середовища, в яких вони можуть опинитися. Але окремі прояви норми реакції нерідко необхідно знати. У селекції, спрямованій на створення нових або вдосконалення існуючих форм корисних людині організмів, постійно виникає потреба встановити відмінності в реакції тих чи інших сортів рослин на якість ґрунту, строки сівби, наявність добрив.

Яка генетична зумовленість норми реакції?

Деякі з факторів, здатні забезпечити варіювання ознак в межах норми реакції, можна перерахувати:

1. Полігенна детермінація ознаки і реакції організму.

2. Плейотропна дія гена.

3. Залежність прояву мутації від умов середовища.

4. Гетерозиготність організму, внаслідок чого у деяких генів можуть змінюватися відносини домінування.

5. Взаємодія генів, яка відбувається на рівні генних продуктів – субодиниць білкових молекул.

6. Альтернативні шляхи розвитку в системі онтогенезу і біосинтезів в клітині. Блокування одного шляху компенсується іншим.

4.2. Спадкова мінливість. *Генотипова мінливість* в залежності від природи клітин підрозділяється на *генеративну* (зміни в спадковому апараті гамет) і *соматичну* (зміни в спадковому апараті клітин тіла). В рамках генеративної і соматичної мінливості виділяють 1) *комбінаційну* і 2) *мутаційну мінливість*.

Комбінаційна мінливість виникає в генотипах нащадків внаслідок випадкової перекомбінації алелів. Самі гени при цьому не змінюються, але генотипи батьків і дітей різні. Комбінаційна мінливість виникає в результаті декількох процесів:

а) незалежного розходження хромосом в процесі мейозу;

б) рекомбінації генів при кросинговері;

в) випадковій зустрічі гамет при заплідненні.

Комбінаційна мінливість є головним джерелом генетичної різноманітності. Відомо, що в геномі людини міститься приблизно 30-40 тис. генів. Близько третини всіх генів мають більш ніж один алель, тобто є поліморфними. Однак, навіть при наявності лише невеликого числа локусів, що містять по кілька алелів, тільки при комбінації (внаслідок перемішування генних комплексів) виникає колосальна безліч унікальних генотипів. Так, тільки при 10 генах, що мають по 4 алелі кожен, теоретичне число унікальних диплоїдних генотипів становить 10 мільярдів!

Оскільки близько однієї третини генів в геномі людини є поліморфними, то тільки за рахунок рекомбінації створюється невичерпна генетична різноманітність людини. У свою чергу, неповторність генетичної конституції багато в чому визначає унікальність і неповторність кожної людини.

Мутаційна мінливість обумовлена мутаціями (від лат. *mutatio* – зміна) – стійкою зміною генетичного матеріалу і, як наслідок, успадковуванням ознаки. Перехідних форм мінливості в порівнянні з вихідним станом не спостерігається.

4.3. Мутаційна теорія и класифікація мутацій. Мутаційна теорія зародилася на початку XX ст. в роботах Г. де Фріза (1901-1903). Мутація – це стрибкоподібна, переривчаста зміна спадкової ознаки. Суть мутаційної теорії де Фріза зводиться до наступних положень:

1. Мутація виникає дискретно, без переходів.
2. Нові форми константні.
3. Мутація є якісною зміною.
4. Мутації різноспрямовані (нейтральні, корисні і шкідливі).

5. Виявлення мутацій залежить від розмірів вибірки досліджуваних організмів.

6. Одні і ті ж мутації можуть виникати повторно.

Мутаційні зміни надзвичайно різноманітні. Вони можуть зачіпати буквально все морфологічні, фізіологічні та біохімічні ознаки організму, можуть викликати різкі або, навпаки, ледь помітні фенотипові відхилення від норми (рис. 4.6).

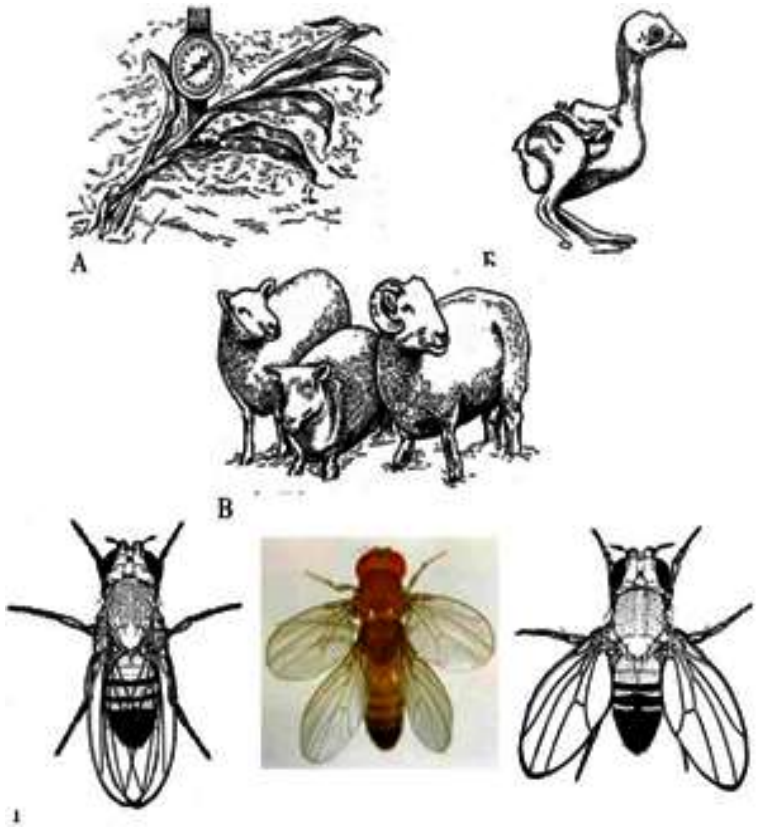


Рис. 4.6. Мутації у різних організмів: А. Мутація «лінива кукурудза». Б. Рецесивна, зчеплена зі статтю мутація відсутності оперення у курки. В. Рецесивна мутація коротких ніг у вівці. Праворуч і в центрі гомозиготи, зліва – гетерозигота. Г. Нормальна (ліворуч), чотирикрила форма (мутація гена *BX-C*) дрозофіли (в центрі), муха з розставленими крилами (домінантна мутація *Dichaete*) (праворуч)

Існує багато принципів класифікації мутацій. Їх розділяють по наступним категоріям.

За характером впливу на генотип:

1. Генні мутації або точкові.
2. Зміни хромосом, або хромосомні перебудови.
3. Зміни числа наборів хромосом.

За характером зміни фенотипу:

1. Морфологічні.

2. Фізіологічні.
3. Біохімічні.
4. Поведінкові.

За впливом на адаптивну здатність:

1. Корисні.
2. Нейтральні.
3. Субвітальні (знижують життєздатність на 10-50 %).
4.Напівлетальні (знижують життєздатність на 50-90 %).
5. Летальні (гине до 100 % генотипів)
6. Умовно-летальні (проявляються лише за певних умов).

За проявом у гетерозиготі:

1. Домінантні.
2. Рецесивні.

За способом індукції:

1. Спонтанні, тобто виникають без видимих причин або зусиль з боку експериментатора. Зазвичай спонтанними називають мутації, причина виникнення яких невідома.
2. Індуковані, тобто виниклі в результаті якогось впливу.

За локалізацією в клітці:

1. Ядерні.
2. Цитоплазматичні (мутації позаядерних генів).

По можливості успадкування:

1. Генеративні, тобто індуковані в статевих клітинах.
2. Соматичні, індуковані в соматичних клітинах.

Генеративна мутація може виникнути на будь-якому етапі розвитку статевих клітин. Якщо така мутація виникає на ранніх стадіях розвитку клітин зародкового шляху, вона розмножиться в багатьох клітинах, число яких буде пропорційне числу клітинних поділів після виникнення мутації. В результаті ця мутація буде представлена багатьма копіями. Мутації, що виникли на останніх етапах розвитку статевих клітин, в сперматозоїдах і яйцеклітинах, тільки в цих клітинах і представлені.

Прояв мутантного фенотипу *соматичних мутацій* також сильно залежить від стадії, на якій відбулася мутація. Чим раніше мутація виникає, тим більший ефект вона викликає.

Соматичні і генеративні мутації розрізняються головним чином можливістю успадкування: генеративні передаються у спадок. А у соматичних мутацій два шляхи: якщо організм розмножується виключно статевим шляхом, і клітини зародкового шляху вже на ранніх

етапах розвитку відокремлюються від соматичних, соматичні мутації не грають ніякої ролі в спадковості. Інша справа, якщо організм може розмножуватися безстатевим шляхом, наприклад, картопля. В цьому випадку мутації впливають на потомство, що розмножується вегетативним шляхом.

Не виключено, що соматичні мутації мають відношення до процесів старіння людського організму, тому що з віком може відбуватися накопичення фізіологічних мутацій.

Зазвичай мутації від стану дикого типу до нового стану називають *прямими*, а від мутантного до дикого – *зворотними*. Прямі та зворотні мутації виникають з різною частотою. Наявність зворотних мутацій свідчить про те, що при прямому мутуванні ген не втрачений, а лише змінився.

Множинні алелі. Досі ми розглядали тільки два стани гена: домінантний *A* і мутантний рецесивний *a*. Насправді ж один і той же ген може змінюватися дуже різноманітно, утворюючи кілька десятків і більше варіантів. Наприклад, у дрозофіли відомо близько 150 мутацій гена *vermilion*, близько 350 мутацій гена *white*. При цьому всі мутації *vermilion* мають однаковий фенотип. Фенотипи мутантів гена *white* варіюють в дуже широких межах від нормального кольору очей до повної відсутності пігменту, тобто повністю мутантних.

Мутації одного і того ж локусу називають серією множинних алелів, а саме явище – множинним алелізмом. Генотип, гетерозиготний по двом мутантним алелям (a_1/a_2) одного і того ж локусу називають *компаундом*.

Члени серії множинних алелів не тільки по-різному визначають розвиток ознак, але і вступають в різні домінантно-рецесивні відносини один з одним, наприклад, у разі контролю груп крові системи АВ0 в людини. Чотири групи крові цієї системи – 0, А, В і АВ – детермінуються трьома алелями I^a, I^b та i. Перші два кодомінантні один до одного, а останній рецесивний по відношенню до перших двох. Отже фенотипу 0 відповідає генотип ii, фенотипу А – генотипи I^aI^a та I^ai, фенотипу В – генотипи I^bI^bта I^bi, фенотипу АВ – генотип I^aI^b.

4.4. Генні мутації. До генних мутацій відносяться будь-які зміни молекулярної структури ДНК, незалежно від їх локалізації і впливу на життєздатність. Деякі мутації не впливають на структуру і функцію відповідного білка. Інша частина генних мутацій призводить до синтезу дефектного білка, не здатного виконувати властиву йому функцію. Саме

генні мутації обумовлюють розвиток більшості спадкових форм патології. Найбільш частими моногенними захворюваннями є муковісцидоз, гемохроматоз, адрено-генітальний синдром, фенілкетонурія, нейрофіброматоз, міопатії Дюшенна-Беккера і ряд інших захворювань.

Мутація може полягати:

1) в заміні основи в кодоні, це так звана *місенс*-мутація, що приводить до заміни амінокислоти в поліпептиді;

2) у такій зміні кодонів, яке призведе до зупинки зчитування інформації, це так звана *нонсенс-мутація*, внаслідок утворення кодону-термінатора (стоп-кодону);

3) у порушенні зчитування інформації, зсуві рамки зчитування, *фреймшіфт-мутація*, коли внаслідок інсерції (вставки) або делеції (випадіння) окремих основ змінюються значення триплетів.

Молекулярні зміни, що зачіпають від одного до декількох нуклеотидів, розглядають як точкову мутацію. Принциповим і відмітним для генної мутації є те, що вона: 1) призводить до зміни генетичної інформації, 2) може передаватися від покоління до покоління.

Певна частина генних мутацій може бути віднесена до нейтральних мутацій, оскільки вони не призводять до яких-небудь змін фенотипу. Наприклад, за рахунок виродженості генетичного коду одну і ту ж амінокислоту можуть кодувати декілька триплетів, які розрізняються тільки по одній основі. З іншого боку, один і той же ген може змінюватися (мутувати) в декілька різних станів.

4.5. Хромосомні перебудови

Хромосомні перебудови – це великий і гетерогенний клас спадкових змін, що включають випадання (втрати), додавання (подвоєння, множення) ділянок хромосом, а також їх переміщення в межах однієї хромосоми або між хромосомами. Провести чітку границю між хромосомними перебудовами і генними мутаціями досить важко, оскільки серед генних мутацій значну частину можуть становити внутрішньогенні мутації або нестачі, а також вставки рухливих генетичних елементів усередину гена, що приводять до його інактивації.

Залежно від стадії клітинного циклу виникають або хромосомні (за дії в період від G_1 до S), або хроматидні (від S до G_2, включаючи початок) розриви. При возз'єднанні пошкоджених хромосом / хроматид можуть виникати хромосомні перебудови. При цьому дія мутагену може викликати не лише розриви, але й деякі передмутаційні змі-

ни, які при однаковому впливі факторів, що модифікують, можуть реалізуватися в додаткові розриви та перебудови.

Основні типи хромосомних перебудов – це: 1) делеції; 2) дуплікації; 3) інверсії; 4) транслокації. Крім того, в результаті хромосомних перебудов може проявлятися ефект положення. Подібні з ним явища може викликати дія мобільних генетичних елементів.

Делеції. Делецією називають брак якоїсь ділянки хромосоми. Так, якщо в нормальній хромосомі гени розташовані в певному порядку:



при втраті фрагмента хромосом можливі два принципових варіанти:

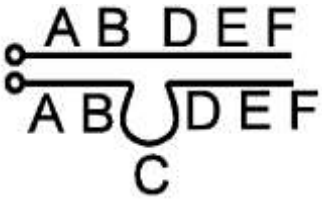


або:



тобто може бути втрачена середня частина хромосоми (CD) або кінцева (D-F).

Гетерозиготні делеції цитологічно виявляються через наявність петлі у нормальному гомологу під час кон'югації хромосом в мейозі:



Делеції дуже зручні для картування генів в певних ділянках хромосом. Цей метод картування генів був запропонований в 1935 році, а вже в 1938 р. Х. Слізінска, використовуючи серію делецій, що перекриваються, прокартувала ген *white* в Х-хромосомі дрозофіли з точністю до одного диска політенної хромосоми.

Генетичний метод виявлення делецій заснований на виявленні в схрещуванні типу *aa* × *AA* удаваного домінування рецесивного алеля. Якщо при такому схрещуванні з'являється організм із ознакою, відповідною до прояву рецесивного алеля, цей результат може бути наслідком або генної мутації $a \rightarrow A$, або делеції ділянки хромосоми, що несе ген *A*. Для делецій характерні дві основні особливості: 1) гомозиготність по делеції має летальний ефект, з цього правила виявлені

поодинокі виключення; 2) велика їх протяжність, що часто перевищує розміри одного гена, внаслідок чого при виявленні ефекту удаваного домінування рецесивного алеля в тому районі, де відомі тісно зчеплені гени, цей ефект може бути показаний відразу на декількох генах. Разом з тим, делеції не можуть бути дуже довгими, оскільки чим делеція довша, тим більша ймовірність того, що в районі хромосоми, гомологічному видаленому делецією, знаходиться летальна мутація. Крім того, відсутність надто протяжного фрагмента хромосоми може привести до порушення балансу в різних генетичних системах.

Дуплакації. Дуплікацією називають додатковий спадковий матеріал, ідентичний тому, який вже є в геномі:



1

(1) Нормальна хромосома



2

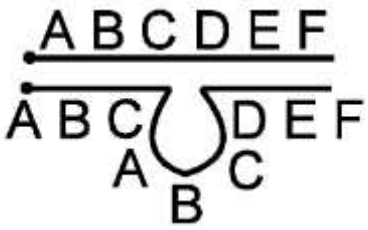
(2) Дуплікація ділянки ABC



3

(3) Тандемна дуплікація ділянки ABC

На цитологічному рівні у гетерозигот по дуплікації під час кон'югації хромосом в мейозі в хромосомі, що несе дуплікацію, утворюється петля з дуплікованого матеріалу:



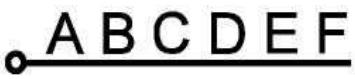
Дуплікації широко розповсюджені для «перекриття» мутантної дії леталей або делецій. Так, виникнення леталі або делеції в Х-хромосомі дрозофіли буде приводити до загибелі самців, що несуть цю хромосому в гемізиготному стані. Однак, наявність матеріалу Х-хромосоми, що містить нормальний алель літали, дуплікованого і включеного в будь-яку з хромосом (аутосому, Х- або Y-хромосому) робить самця життєздатним.

Він стає носієм літали в єдиній Х-хромосомі і нормального алеля в дуплікації, і його можна схрещувати з самками.

Класичним прикладом дуплікацій з фенотиповим проявом можна вважати мутацію *Bar* (*B*) в Х-хромосомі дрозофіли. Ця напівдомінантна мутація зменшує кількість фасеток ока. З'ясовано, що виникає дана мутація внаслідок дуплікації сегмента 16А, який локалізований в Х-хромосомі (57,0 сМ). Причиною цієї дуплікації є нерівний кросинговер.

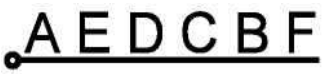
Інверсії. Інверсія – це зміна на 180° порядку розташування групи генів в хромосомі.

Нормальна хромосома:



Інверсії бувають пара- і періцентрічними. У разі *парацентричної* інверсії відбуваються два розриви хромосом, обидва по одну сторону від центромери. Ділянка між точками розривів повертається на 180°. У разі *періцентричної* інверсії точки розривів розташовані по обидва боки від центромери.

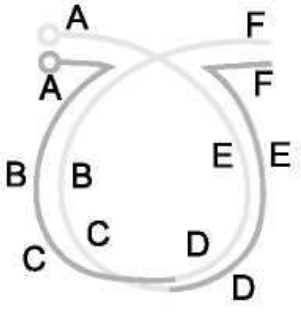
Парацентрична інверсія:



Перицентрична інверсія:



Генетичний метод виявлення інверсій – це виявлення мутацій, які в гетерозиготному стані сильно пригнічують кросинговер у певному районі якої-небудь хромосоми. Серед таких мутацій з великою ймовірністю можуть бути знайдені інверсії. У гомозигот по інверсіям кросинговер відбувається нормально. У особин, гетерозиготних по інверсії в хромосомах, утворюється петля:



У гетерозигот по парацентричній інверсії вихід кросинговеру відбувається наступним чином: в разі перехрещення між генами C і D утворюється два продукти: ацентрична і дицентрична хромосоми, тобто без центромери і з двома центромерами, відповідно. В подальшому це приведе до утворення мостів і фрагментів. Аналіз усіх імовірних варіантів кросинговеру в інвертованій ділянці у гетерозиготи за парацентричною інверсією показує, що у нащадків таких гетерозигот не виявляються одиничні кросовери – головний клас кросоверів, який характеризується найбільшою частотою. Можуть виявлятися тільки подвійні кросовери, частота яких незрівнянно менше. У гетерозигот по перицентричній інверсії мости і фрагменти не утворюються, однак, і у них не виявляється одиничні кросовери, що свідчить про придушення кросинговеру у гетерозигот по інверсіях. Слід підкреслити, що в обох випадках мова йде про придушення кросинговеру, що виявляється. Виявлення у гетерозигот за парацентричними інверсіями з великою частотою мостів і фрагментів свідчить про досить велику частоту кросинговеру, що не відбивається.

В одній хромосомі буває і кілька інверсій. У цьому випадку інверсії можуть не перекриватися або перекриватися частково чи повністю. При гетерозиготності за декількома інверсіями в одній хромосомі гомологічна кон’югація занадто утруднена і частіше виявляється її відсутність. Інверсійний поліморфізм в популяціях сприяє накопиченню визначених мутацій в ділянках хромосом, які перекриваються інверсіями.

Транслокації. Перебудови, внаслідок яких частина одної хромосоми переноситься до складу іншої, негомологічної їй хромосоми, називаються транслокаціями. Вони були відкриті К. Штерном у 1926 р. у дрозофіли. Цьому передувало виявлення наступних фактів. Були знайдені форми, при використанні яких у схрещуваннях виявлялися незвичайні для даного виду відносини зчеплення між генами (наприклад, мутація *Pale* демонструє зчеплення одночасно з генами II й III хромосом). У оксамитових бобів виявлені напівстерильні форми зі своєрідним типом успадковування: напівстерильні рослини серед нащадків давали розщеплення на напівстерильні та фертильні (1:1) як при схрещуванні з фертильними рослинами, так і при схрещуванні двох напівстерильних рослин. Напівстерильними були й гібриди гороху, у потомстві яких проявлялося незвичайне зчеплення генів. Виявили поліморфізм каріотипу в природних популяціях деяких видів прямокрилих: з’являлися незвичайні метацентричні хромосоми при одночасному

зменшенні числа акроцентричних хромосом. Припустили, що це результат злиття акроцентриків в одну хромосому і що цей процес зворотний.

Спираючись на ці факти, висунули гіпотезу «сегментного обміну» між негомологічними хромосомами, яку успішно використали для пояснення напівстерильності у бобів (рис. 4.7).

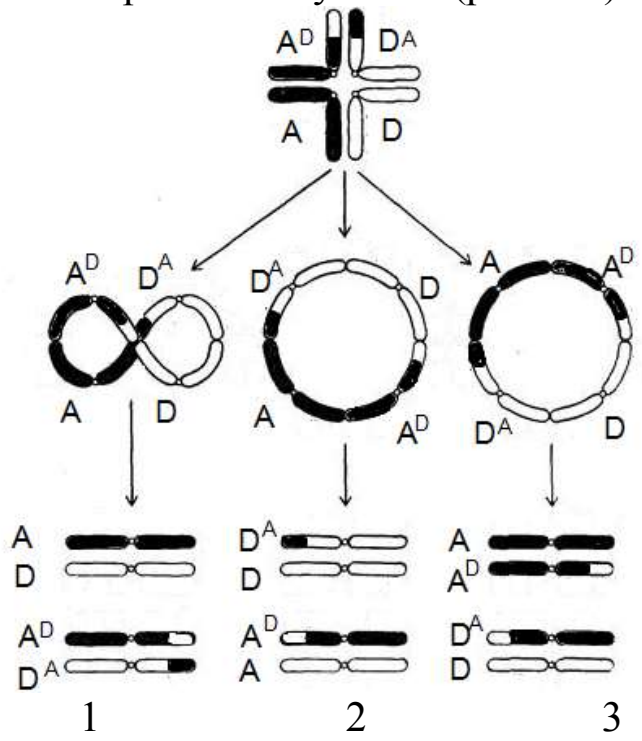


Рис. 4.7. Кон'югація хромосом внаслідок транслокації: в пахітені утворюється хрестоподібний тетравалент, який в діакінезі-метафазі I перетворюється у вісімкоподібну (1) або кільцеву (2, 3) структуру. При редукційному поділі відбувається розходження хромосом, що чергується (1) або один з двох варіантів суміжного розходження (2, 3)

Гетерозиготна за сегментним обміном рослина (рис. 4.7) містить дві змінені (A^D і D^A) хромосоми і дві незмінені (A і D). Щоб кон'югація була максимальною, ці чотири хромосоми мають утворити у профазі мейозу тетравалент. Очевидно, що із трьох можливих типів розходження хромосом, які складають тетравалент – суміжне розходження I ($A+D^A$ і A^D і D); суміжне розходження II ($A+D^A$ і D^A+D); через одну ($A+D$ і D^A+A^D) – тільки при розходженні, що чергується, утворюються генетично збалансовані продукти мейозу. При обох типах суміжного розходження утворюються продукти мейозу, що одночасно несуть значні нестачі та дуплікації, які, однак, не компенсують один одного, а, навпаки, підсилюють генетичну незбалансованість. Якщо у гетерозиготи за сегментним обміном орієнтації тетрава-

лента у вигляді кільця і вісімки рівновірогідні, то суміжне розходження відбувається у 50 % мейоцитів і, отже, 50 % гамет – стерильні.

Основні методи виявлення транслокацій – генетичний і цитогенетичний. Перший заснований на виявленні змін у зчепленні генів, другий – на демонстрації характерних конфігурацій у мейозі у гетерозигот за транслокацією.

Для пошуку транслокацій необхідна розробка систем схрещування між генетично маркірованими формами, які дозволили б ефективно використовувати генетичний метод виявлення транслокацій – по зміні характеру зчеплення.

Крім пошуку характерних мейотичних конфігурацій, цитологічно транслокація може бути виявлена при ретельному аналізі каріотипу (мітотичні хромосоми), якщо використання методів диференціального забарвлення дозволяє надійно ідентифікувати хромосоми і ті ділянки, якими вони обмінюються за транслокацій.

При генетичному картуванні точки, у якій відбувся розрив при виникненні досліджуваної транслокації, визначається частота рекомбінації між даною точкою і будь-якими генами цієї хромосоми. При схрещуванні [гетерозигота за транслокацією] х [гомозигота за транслокацією] половина нащадків одержує цю точку в складі транслокованої хромосоми (умовно «алель Т»), а інша половина – у складі нормальної, незміненої хромосоми (умовно «алель N»). У зазначеному схрещуванні перший тип нащадків – гетерозиготи за транслокацією, у другого типу транслокація відсутня. Розщеплення можна враховувати, аналізуючи мейоз кожної рослини у досліджуваних нащадків. Якщо досліджується транслокація в одного з видів рослин, де гетерозиготність за транслокацією визначає стерильність 50 % спор, то «алель Т» можна умовно позначити як «алель напівстерильності, а «алель N» – як «алель фертильності» (у даному типі схрещування). Таким чином, досліджувана точка маркірується ефектом «фертильність – напівстерильність» і в розщепленні простежується саме за цим ефектом.

Дослідження хромосомних наборів видів у межах роду, а також хромосомних наборів споріднених родів дозволяє зробити висновок про те, що еволюція каріотипів, які характеризують роди та види, більшою мірою здійснювалася завдяки появі та закріпленню транслокацій. Імовірність такого шляху еволюційних перетворень каріотипів особливо велика в тих родах, де значна частина хромосом (а у деяких видів усі хромосоми) акроцентричні (або субтелоцентричні). У таких

родах для каріотипів різних видів характерно правило збереження константної кількості плечей хромосом у ході каріотипових перетворень. Уперше інтерпретацію такого роду перетворень каріотипів запропонував У. Робертсон (1916). Робертсонівські транслокації можуть приводити як до злиття акроцентриків у метацентрики, так і до поділу метацентриків на акроцентрики. Однак, зворотний процес утруднений тим, що необхідний «донор» центромери, на яку може транслокуватися плече. Внаслідок виникнення серії транслокацій кількість хромосом може не тільки зменшуватися, але й збільшуватися. Обміни цілими плечима при робертсонівських транслокаціях, імовірно обумовлені багаторазово повтореними подібними послідовностями ДНК у блоках прицентромерного гетерохроматину. Робертсонівські транслокації розповсюджені досить широко як у тварин, так і у рослин.

Характер експресії гена може залежати від положення цього гена. Термін *ефект положення* запропонував А. Стертевант у 1925 р., показавши, що самиці дрозофіли, гомозиготні за мутацією *Bar* (*B/B*), відмінні за числом фасеток від самиць, гетерозиготних за мутацією «подвійний *Bar*» (*BB/+*), хоча за дозою алеля ці самиці не відрізнялися. Отже, відмінності між ними за кількістю фасеток у очах – це результат неоднакового розташування зазначених алелів у двох Х-хромосомах.

Пізніше виявили і мозаїчні ефекти положення: внаслідок зміни генетичного оточення експресія алеля є мозаїчною. Розглянемо це на прикладі енотери (*Oenothera blandiana*). Алель P^r (темно-червоні чашолистки) домінує над алелем p^s (рожеві чашолистки). У гетерозигот по транслокації $R(P^r)/p^s$ – чашолистки мозаїчні, з темно-червоними і зеленими смугами. Коли алелі у такій гетерозиготі міняються місцями внаслідок кросинговеру, у нащадків, утворених кросоверними гаметами, зникає мозаїчність і проявляється ефект домінантного алеля. Від англ. variegation – мозаїчність, цей тип ефекту положення називають ще ефектом V-типу. Прояв ефекту положення V-типу має ряд закономірностей:

- властивий генам, які в нормі локалізовані в еухроматинових районах, якщо при перебудові вони опиняються по сусідству з гетерохроматином;

- чим більше розмір гетерохроматинової зони, яка опинилася поруч з геном при перебудові, тім більше виражена мозаїчність (тім

рідше алель дикого типу в аберантній хромосомі проявляється як такий);

- ефект положення здатний до розповсюдження вздовж хромосоми від місця розриву.

Мозаїчний ефект положення може бути модифікований. Мозаїчний прояв генів у дрозофіли придушується при додаванні Y-хромосоми. Збільшення у каріотипі матеріалу з будь-яких гетерохроматинових районів також сприяє придушенню мозаїчності, але ефект додаткової Y-хромосоми найбільш сильний. Добір може привести до посилення або послаблення мозаїчності. Це показує, що є гени, здатні модифікувати мозаїчний ефект положення. Вони були виділені, серед них *Su-V* на III хромосомі, який має досить сильну дію. Суттєвим є і вплив температури: підвищена температура придушує мозаїчність, а понижена – підсилює її.

В деяких випадках при перебудовах хромосом реєструється не мозаїчний прояв дії гена, а стійка зміна його експресії. При цьому один з розривів обов'язково розташований у безпосередній близькості від гена, що вивчається, і обидва розриви локалізовані в еухроматинових районах. Таким чином, для стабільного (від англ. stable), або S-типу ефекту положення не властиво розповсюдження його вздовж хромосоми від місця розриву.

Дані генетики і цитогенетики свідчать, що хромосоми є певним чином організованими генними комплексами, у межах яких і здійснюється робота генів. Порушення в організації цих комплексів при хромосомних перебудовах часто приводить до змін в експресії генів.

4.6. Геномні мутації. *Поліплоїдія.* Явище зміни числа хромосом в клітині називають поліплоїдією. Поліплоїдія виникає в наступних випадках:

1. Нерівне розходження хромосом до полюсів в анафазі.

2. Поділ ядра без поділу клітини.

3. Подвоєння хромосом без їх поділу через те, що центромери втрачають властивість взаємного відштовхування.

Організми, у яких відбулося множення цілих гаплоїдних наборів, називають власне поліплоїдами, або еуплоїдами. Поліплоїди, у яких число хромосом не є кратним гаплоїдному, називають гетероплоїдами або анеуплоїдами. Якщо організм мав $n=4$ хромосоми, $2n=8$, то тетраплоїд має 16 хромосом. Якщо диплоїд був гомозиготний, тетраплоїд теж буде

гомозиготою. Якщо диплоїд був гетерозиготою, тетраплоїд теж гетерозиготний.

Поліплоїдизація може відбуватися в результаті мітозу – це *соматична поліплоїдія*. При цьому виникають *мозаїчні*, або *химерні* організми – *міксоплоїди*. Прикладом такого організму може бути людина. У більшості клітин людини 46 хромосом, однак у клітинах печінки 92 хромосоми. Якщо подвоєння геномів відбувається в першому поділі зиготи – така поліплоїдія називається *зиготичною*, всі клітини організму будуть поліплоїдні.

Г. Вінклер (1916) вперше описав поліплоїди томатів і пасльону. До теперішнього часу встановлено, що 1/3 всіх покритонасінних рослин є поліплоїдами. Група споріднених видів, у яких набори хромосом складають ряд зростаючого кратного збільшення числа хромосом, називається *поліплоїдним рядом*, наприклад, рід *Triticum*: *T. monococcum* (пшениця-однозернянка) *2n=14*, *T. durum* (тверда пшениця) *2n=28*, *T. aestivum* (*м'яка пшениця*) *2n=42*. Таким чином, основне число хромосом поліплоїдного ряду (*x*) – найменше гаплоїдне число хромосом в поліплоїдному ряді у пшениць становить 7, а *T. monococcum* називають диплоїдом, *T. durum* – тетраплоїдом, *T. aestivum* – гексаплоїдом.

Соматична поліплоїдія поширена у всіх видів, а зиготічна – головним чином у рослин. У тварин вона зустрічається у круглих хробаків і, дуже рідко, у деяких амфібій.

Автополіплоїдія. Поліплоїди, що виникають на основі множення ідентичних наборів хромосом, тобто наборів хромосом того ж виду, називають автополіплоїдами. Наприклад, у роді *Sorghum* виявлений автополіплоїдний ряд при *x=5: 2x, 4x, 8x.* У природі автополіплоїди можуть виникати у рослин з будь-яким способом розмноження. Однак, у нащадків вони краще зберігаються при самозапиленні, вегетативному і безстатевому розмноженні.

Серед природних і експериментально отриманих автополіплоїдів добре вивчені автотетраплоїди. Для них іноді характерний гігантизм, що виражається у збільшенні розмірів стебел, листів, квіток, плодів і насіння у порівнянні з вихідними диплоїдними формами. Ряд культурних рослин – картопля, кавове дерево, банан, люцерна, земляний горіх (арахіс), батат, тимофіївка – є автотетраплоїдами. Експериментально автотетраплоїди отримані у кукурудзи, гречки, жита, цукрового буряка, конюшини, винограду, кавуна, декоративних рослин.

Різні види по-різному реагують на подвоєння числа хромосом. Так, автотетраплоїдне жито значно перевершує диплоїдне по розвитку вегетативних органів і розмірам насіння, а переведення 42-хромосомної пшениці на 84-хромосомний рівень викликає депресію росту і розвитку. Останнє особливо чітко проявляється в тих випадках, коли вихідний матеріал уже був поліплоїдним. Вочевидь, існують певні рамки для збільшення числа хромосом.

Плідність автотетраплоїдів часто знижена. Частково це обумовлене генетичними причинами, але головним чином пов'язане з порушеннями мейозу. Це є причиною їх часткової стерильності. Стерильність більшою мірою виражена у пилку, ніж у яйцеклітин. Частина яйцеклітин з відхиленням у числі хромосом здатна функціонувати, і в результаті виникають анеуплоїдні рослини. Звичайно анеуплоїдні рослини елімінуються, що забезпечує збереження поліплоїдних рядів у природі. Цьому сприяє і наявність бар'єра несхрещуваності.

Майже повна стерильність автотриплоїдів обмежує їх практичне використання, однак деякі мають практичний інтерес. Так, триплоїдна осика (*3x*=57) відрізняється швидким ростом і сильним розвитком вегетативних і генеративних органів. Деякі цінні сорти яблуні є триплоїдами (*3x*=51). Ці рослини можна розмножувати вегетативно і культивування триплоїдних форм не важке. Інша річ, коли можливості вегетативного розмноження обмежені або воно виключене.

В 1940 р. Ф. М. Пето і Дж. В. Бойс показали, що у триплоїдного цукрового буряка крупніше корінь і більше цукру в соку, ніж у диплоїдного. Пізніше з'ясували, що по врожайності на одиницю площі триплоїди перевищують і тетраплоїди. Сьогодні посіви триплоїдного цукрового буряка майже повністю витіснили посіви диплоїдних і тетраплоїдних форм. Але насінництво триплоїдного цукрового буряка через його стерильність засноване на щорічних схрещуваннях диплоїдних і тетраплоїдних форм.

У 1951 р. Х. Кіхара одержав триплоїдний кавун, уведений в Японії у промислову культуру. Він більш урожайний, ніж диплоїдні і тетраплоїдні форми. Крім того, насіння в його плодах рудиментарні і тому вони їстівні, подібно неспілим насінням огірків. Триплоїдні насіння одержують при схрещуванні тетраплоїдних рослин (♀) з диплоїдними (♂). У зворотному схрещуванні нормальне насіння не утворюється.

Спостерігався і більш високий ступінь автополіплоїдності (наприклад, октоплоїди і т. і.). Однак рослини з дуже великим ступенем автополіплоїдії повністю стерильні та нежиттєздатні як у природі, так і в експерименті.

Особливості мейозу автополіплоїдов. У нормі, в диплоїдів, у профазі мейозу утворюються біваленти, у тетраплоїда в профазі крім бівалентів утворюються триваленти, унівалентиі квадриваленти. У диплоїда *Aa* (2*n*) утворюються гамети *A* і *a* в співвідношенні 1:1. У тетраплоїда *AAaa* (4*n*) розходження гомологічних хромосом можливо в співвідношеннях 2:2, 3:1, 1:3, 4:0, 0:4.

При правильному розходженні хромосом автотетраплоїд, гетерозиготний по алелям *AAaa* утворює три типи гамет: 1*AA*:4*Aa*:1*aa*, і наступні зиготи:

	1*AA*	4*Aa*	1*aa*
1*AA*	1*AAAA*	4*AAAa*	1*AAaa*
4*Aa*	4*AAAa*	16*AAaa*	4*Aaaa*
1*aa*	1*AAaa*	4*Aaaa*	1*aaaa*

Розщеплення замість 3:1 в F_2, буде 35:1, тобто при моногібридному схрещуванні ймовірність появи гомозиготних рецесивних форм у багато разів нижче, ніж у диплоїдів. Тому селекціонерам відбір за ознаками раціональніше вести на низькому рівні плоїдності. Крім правильного розходження хромосом в мейозі у автотетраплоїда можливо також розходження хромосом у співвідношенні 3:1 і 4:0. При цьому виникнуть гамети *AAA* і *a*, *Aaa* і *A*, а також *AAaa* і 0. Частина таких гамет нежиттєздатна. Тетраплоїди найчастіше мають більшу вегетативну масу (листя, пиляки, насіння). Збільшені розміри клітин. Однак, може різко зменшитися плодючість (до 5 % від норми) через порушення розходження полівалентів в мейозі.

В результаті схрещування тетраплоїда з диплоїдом утворюється триплоїд. Ці рослини більші і потужніші, ніж рослини з кратними числами хромосом (наприклад, цукровий буряк), але повністю стерильні.

Алополіплоїдія. Поліплоїди, що виникають на основі множення різних геномів, називаються алополіплїдами. Ще у 1917 р. О. Вінге припустив, що поліплоїдні ряди в природі можуть виникати внаслідок міжвидової гібридизації з наступним збільшенням числа хромосом схрещуваних видів. Потім довели, що такий процес дійсно відбувається в природі і його можна відтворити експериментально.

Поліплоїди, що виникли в результаті гібридизації і які мають диплоїдні набори хромосом обох батьків, називають *амфідиплоїдами* (М. С. Навашин, 1927). При сполученні у міжвидового гібрида двох геномів *А* і *В* (*АВ*) утворюється *амфігаплоїд*. Подвоєння цих геномів (*ААВВ*) приведе до утворення амфідиплоїда.

Для виявлення вихідних форм алополіплоїдів проводять *геномний аналіз*. Суть його полягає у використанні диплоїдних геномів-аналізаторів, які вводять в аналізовані форми шляхом схрещувань. Одночасно оцінюють кон'югацію хромосом у профазі I та метафазі I та перевіряють плідність гібридів. Якщо алотетраплоїд має в гаплофазі два різні хромосомні набори, у кожному з яких *х* хромосом, то його схрещують із диплоїдними формами (*АА* і *ВВ*), які ймовірно є для нього вихідними. Якщо між яким-небудь геномом даного алополіплоїда і геномами-аналізаторами (*А* або *В*) немає гомології, то в мейозі у таких гібридів має з'явитися *3х* унівалентів. Якщо ж буде нормально відбуватися кон'югація хромосом генома-аналізатора з одним із хромосомних наборів алополіплоїда, то це доводить наявність генетичного зв'язку між аналізованими формами. Всі гібриди, отримані від схрещування з неспорідненими диплоїдними аналізаторами, у мейозі матимуть лише унівалєнти. Результати такого аналізу можна перевірити шляхом експериментального синтезу існуючого в природі алополіплоїда. У такий спосіб установлюють диплоїдні види, які могли брати участь у походженні аналізованого алополіплоїда.

У 1925 р. Р. Е. Клаузен і Т. Х. Гудспід одержали новий константний 72-хромосомний вид тютюну в результаті схрещування 48- і 24-хромосомних видів. Цей амфідиплоїд утворювався з нередукованих гамет, які виникли у гібридних рослин F_1.

Основоположною для розуміння амфідиплоїдії є експериментальна робота Г. Д. Карпеченко, який у 1927 р. одержав редько-капустяний амфідиплоїд. Він використовував в схрещуваннях два види з різних родів – *Brassica oleacea* (капуста) і *Raphanus sativus* (редька). У обох видів диплоїдне число хромосом *2n=18* (рис. 4.8). Гібрид мав 18 хромосом, був потужним, сильно цвів, але насіння не утворювалося. Окремі гамети були нередукованими, тобто мали по 9R і 9B хромосом. Від них вийшли константні рослини, яким автор дав нову видову назву – *Raphanobrassica* (*4х=36,* з них 18 редькових і 18 капустяних хромосом). У цього амфідиплоїда будова плодів сполучала ознаки обох батьків. У 1931 р. Г. А. Левитський і Г. К. Бенецька довели амфідиплоїдність

дну природу плідного пшенично-житнього гібрида, отриманого В. Рімпау у 1888 р.

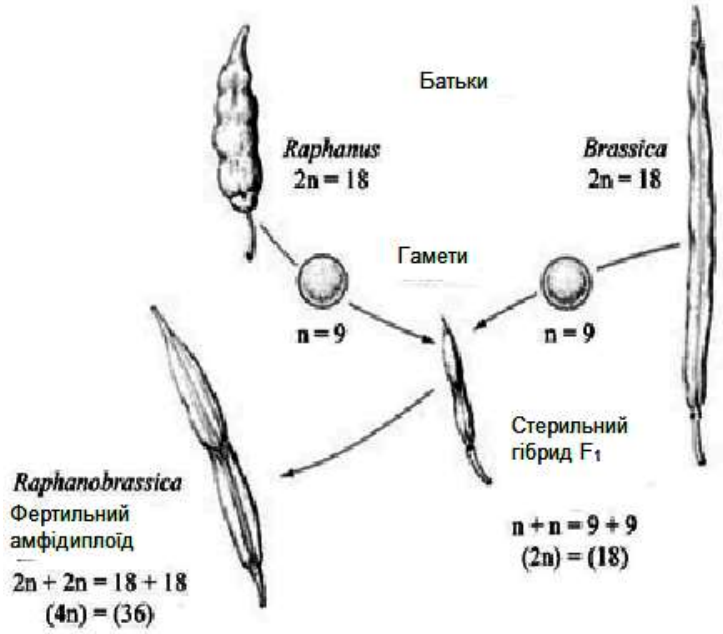


Рис. 4.8. Утворення рослини *Raphanobrassica* внаслідок гібридизації редьки та капусти і наступного подвоєння хромосом у гібрида

Походження ряду культурних рослин на основі алополіплоїдії було доведено роботами з ресинтезу видів. В 1930-х рр. А. Мюнтцинг на основі гібридизації видів *Galeopsis pubescens* (*2n*=16) і *G. speciosa* (*2n*=16) ресинтезував 32-хромосомний алотетраплоїдний (*2n*=32) вид жабрію *G. tetrahit*. В. А. Рибин ресинтезував культурну сливу *(Prunus domestica*) при схрещуванні терну *P. spinosa* (*2n*=32) з аличею *P. divarcata* (*2n*=16). Серед гібридів була виявлена одна рослина, яка мала 48 хромосом. Цей амфідиплоїд виявився константною і плідною формою, цілком подібною з домашньою сливою. Д. Костов ресинтезував вид тютюну *Nicotiana tabacum* (*2n*=48) на основі гібридизації *N. sylvestris* і *N. tomentosiformis*. При схрещуванні пшениці *T. dicoccoides* (*2n*=28) з *Aegilops speltoides* (*2n*=14) з наступним подвоєнням хромосом у гібридів F_1 удалося одержати пшеницю (*2n*=42), дуже подібну з *T. spelta* і добре з нею схрещувану. Подібним чином довели походження капусти, вівсюга, бавовнику, тонконога тощо. Ресинтезовані види не завжди є копією природних видів, тому що останні зазнали тривалого природного або штучного добору. Ці роботи важливі не тільки як доказ походження видів, але й для створення

методів одержання зовсім нових організмів, які, як наприклад тритикале, навіть увійшли в культуру.

Штучне отримання поліплоїдів. Можливість експериментального одержання поліплоїдних клітин уперше була показана І. І. Герасимовим (1889) на зеленій водорості спірогирі за впливу низької температури (–4 °С) і хімічних речовин (хлоралгідрат, хлороформ, ефір). Це викликало порушення поділу клітин, виникали без'ядерні клітини і клітини із двома ядрами. Поділ клітин з подвоєним вмістом ядерної речовини уповільнюється, такі клітини стають крупніше за рахунок інтенсивного зростання. У 1920-х рр., після встановлення поліплоїдної природи багатьох рослин, з'ясувалося значення цього явища і почалася розробка методів експериментального одержання поліплоїдів.

Перші результати отримали методом близнюків. Потім застосовували короткочасні обробки зародкової тканини рослин високими або низькими температурами. Так одержали тетраплоїдну кукурудзу. Більш ефективним виявилося використання регенерації нових пагонів з калюсу. Так отримали поліплоїди багатьох рослин, але особливо ефективним цей метод виявився для томатів і капусти. У тютюну, тюльпана, жита поліплоїди отримані за впливу рентгенівських променів. Поліплоїди рослин одержують також при використанні в схрещуваннях диплоїдних гамет, при аномаліях запліднення, наприклад поліспермії, при схрещуванні диплоїдних рослин з поліплоїдними або поліплоїдних між собою. Але перелічені методи малоефективні. Ефективніше виявилися методи з використанням хімічних речовин. Використовували хлороформ, ефір, хлоралгідрат, сірчанокислий хінін, хлористий літій та ін. Ними обробляли насіння, корінці, точки росту, молоді пагони, квітки і т. і. Після повідомлення А. Ф. Блекслі та О. Т. Евері (1937) про дію *колхіцину*, що забезпечує одержання поліплоїдів у великій кількості, його стали широко використовувати всі дослідники.

Колхіцин – алкалоїд, виявлений в *Colchicum autumnale* із сімейства лілейних. Він діє на веретено в процесі мітозу і мейозу, що виключає розходження дочірніх хромосом в анафазі та цитокінез, а це приводить до подвоєння числа хромосом. Колхіциновані мітози називають К-мітозами. Колхіцин використовується у вигляді водних розчинів, розчинів в агарі або гліцерині у невеликих концентраціях (0,65-0,025 % розчин) для обробки насіння, паростків, точок росту, квіток і суцвіть. При роботі з колхіцином слід бути обережним, бо

доза в 10 мг *per oris* летальна. Крім колхіцину використовують аценафтен, гама-гексахлорциклогексан, авіоль-фенольний та ін.

Анеуплоїдія. К. Бріджес (1916) відкрив явище нерозходження хромосом, в результаті чого обидві Х-хромосоми відходять або в яйцеклітину (утворюється гамета ХХ) або в полярне тільце (гамета 0). При заплідненні яйцеклітин ХХ і 0 сперміями, що несуть Х або Y-хромосому, утворюються самки ХХХ, ХХУ і самці Х0. Всі вони мають нормальний диплоїдний набір аутосом. У мейозі у цих особин найбільш імовірне утворення анеуплоїдії через порушення розходження хромосом. Організм з набором *2n–1* називають моносоміком, *2n+1* – трисоміком, *2n+2* – тетрасоміком, *2n+3* – пентасоміком, *2n–2* – нулісоміком.

Американський вчений Е. Сірс (E. R. Sears) в 1954 році після 15 років роботи створив на базі сорту пшениці Чайниз Спрінг колекцію нулісоміков, моно-, три- і тетрасоміков.

У інших організмів, які у складі генома не мають дублюючих субгеномів, як у пшениці, втрата цілої хромосоми, тобто утворення нулісоміков, майже завжди летальна. Летальні також втрати великих шматків хромосом. У дурману доповнення однієї хромосоми веде до зміни форми насіннєвий коробки.

У тварин анеуплоїди життєздатні, як правило, тільки в тому випадку, якщо анеуплоїдія зачіпає статеві хромосоми. Наприклад, у мишей і людини життєздатні жіночі особини Х0 – моносомики, або особини чоловічої статі ХХУ – трисоміки за статевими хромосомами, пентасоміки ХХХХХ – жіночі особини. Тварини-анеуплоїди по аутосомам, як правило, нежиттєздатні. Серед винятків – трисомік по хромосомі 21 у людини. Він життєздатний, але хворіє на синдром Дауна.

Явище анеуплоїдії використовується для проведення генетичного аналізу і може бути використане в селекції. Аналіз серії анеуплоїдних форм м'якої пшениці дозволив Е. Сірсу точно визначити, до якого генома (*A, B* або *D*) відноситься кожна з 21 хромосом. Р. Райлі зі співробітниками (1963) установив, що хромосома 5 м'якої пшениці містить гени, що визначають парну кон'югацію хромосом у мейозі. Аналіз анеуплоїдів дозволив у ряді випадків визначити локалізацію деяких генів у певних хромосомах. Вдалося локалізувати 18 генів у дев'яти хромосомах *Nicotiana tabacum*, а на різних сортах пшениці встановити, у яких саме хромосомах знаходяться гени, що визначають стійкість до іржі, забарвлення колоскових лусок і щільність колосся.

На основі анеуплоїдії були розроблені методи хромосомної інженерії. Ідея про можливість додавання хромосом одного виду до хромосомного набору іншого виду вперше була реалізована Дж. О'Марою у 1940-1947 рр.; йому вдалося до генома пшениці додати хромосоми жита, використовуючи *Triticale.* У результаті додавання різних хромосом жита до геномів пшениці був отриманий різноманітний вихідний матеріал для селекції. Такі ж додавання хромосом були отримані й в інших міжвидових схрещуваннях.

Заміну однієї чи декількох пар хромосом одного генотипу рівним числом пар хромосом іншого генотипу називають *заміщенням хромосом.* Шляхом заміщення хромосом Ф. Холмс створив форму тютюну, стійку до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ). Він зробив кілька зворотних схрещувань *Nicotiana digluta*, фертильного амфіплоїда [*N. gluinosa* (*2n=24*)·× *N. tabacum* (*2n-48*)], з промисловими сортами *N. tabacum.* В результаті добору з гібридних популяцій був створений новий сорт Самсун Холмса (2*n*=48), стійкий до ВТМ. Пізніше Д. Герстел (1946) шляхом схрещування його з моносомиками тютюну з'ясував, що Самсун Холмса має 23 пари хромосом *tabacum* и одну пару хромосом *glutinosa,* котра і несе ген стійкості до ВТМ.

На основі аналізу заміщених ліній Дж. Унрау (1958) запропонував новий метод складання генетичних карт хромосом, оснований на тому, що нащадки від схрещувань заміщених ліній з сортом-реципієнтом гетерозиготні тільки по заміщеній хромосомі. Кросинговер у гібридів приводить до появи рекомбінантів, які можна виділити у вигляді моносомиків у потомстві від схрещувань між гетерозиготними гібридами і нулісомиками по заміщених хромосомах. При самозапиленні таких моносомиків одержують дисомні лінії, гомозиготні по різних рекомбінаціях. При підрахунку дисомних ліній визначають відносну частоту рекомбінацій, а потім просторові зв'язки генів.

При додаванні або заміщенні навіть однієї пари хромосом у схрещуваннях між дикими та культурними формами реципієнт може отримати шкідливий ген дикого батька, а це значно знизить селекційну цінність сорту-реципієнта. У зв'язку із цим стали розроблятися методи, що дозволяють переносити певні фрагменти хромосом або навіть окремі гени в хромосоми реципієнта. Обмін генами відбувається двома способами: 1) у результаті кросинговеру між гомологічними хромосомами; 2) у результаті транслокацій. З досліджень по експериментальному переносу генів від диких видів у культурні ро-

слини особливе місце займають роботи Е. Сірса. Йому вдалося перенести в м'яку пшеницю невеликий фрагмент хромосоми від дикоростучого злаку *Aegilops umbellulata*, який несе алель, що визначає стійкість до листової іржі. Здійснена інтрогресія генів, що визначають стійкість до стеблової іржі, від *Agropyron elongatum* (2*n*=70) до м'якої пшениці, а також перенос генів стійкості до плямистості листків у кукурудзи і ряд інших.

Гаплоїдія. Гаплоїдія – це явище зменшення числа хромосом, коли в наборі соматичної або статевої клітини кожна пара гомологічних хромосом представлена лише однією з них. Гаплоїдним називають організм, який має в соматичних клітинах гаплоїдний набір хромосом.

Природна гаплоїдія зустрічається в життєвому циклі спороутворюючих грибів, бактерій і одноклітинних водоростей. Вперше гаплоїди серед вищих рослин було виявлено в дурману в 1921 р., потім гаплоїди були знайдені у пшениці, кукурудзи. В даний час гаплоїдія відома для 71 виду з 39 родів і 16 родин. Гаплоїди мають такі особливості:

1. У гаплоїдів проявляються рецесивні гени, тому що їх не прикривають домінантні алелі.

2. Гаплоїди за зовнішнім виглядом як правило, подібні відповідним диплоїдними організмами, але дрібніші їх.

3. Гаплоїди перехресно запилюваних рослин мало життєздатні на відміну від гаплоїдів самозапилювачів.

4. Клітини гаплоїдів мають менший розмір.

5. Гаплоїди майже безплідні, тому що у них в мейозі не утворюється повноцінних гамет: хромосоми не мають гомологів, в силу чого вони не кон'югують і розходяться випадково, утворюючи незбалансовані гамети. У рідкісних випадках весь набір хромосом відходить до одного полюса. З цих клітин утворюються гамети з нередукованим гаплоїдним числом хромосом. При зустрічі таких гамет в процесі самозапилення утворюється диплоїд, гомозиготний за всіма генам. Рослини, отримані від гаплоїдів шляхом вегетативного розмноження, мають фенотип, повністю відповідний генотипу. У галоїдних тканинах рослин можна вловлювати корисні і усувати летальні рецесивні соматичні мутації.

Гаплоїдія у вищих рослин дуже цікава для генетиків і селекціонерів. У гаплоїдів порівняно легко виявляти корисні та шкідливі му-

тації. Після добору гаплоїдів з корисними мутаціями їх можна перевести на диплоїдний рівень. При цьому значно точніше визначається селекційна цінність мутацій і гібридних комбінацій, а також скорочується тривалість генетичного аналізу вихідного матеріалу. Гаплоїдія надзвичайно цікава і для дослідження генетики соматичних клітин при використанні методу культури клітин і тканин.

У вищих рослин гаплоїди одержують такими способами:

1. Гаплоїдний партеногенез при виключенні запилення, але поділ незапліднені яйцеклітини і розвиток гаплоїдного зародка відбувається дуже рідко.

2. Стимуляція гаплоїдного партеногенезу шляхом запилення мертвим пилком або дією незвичайних температур. Пилок убивають великими дозами рентгенівських променів або хімічними агентами. При цьому спермії нефункціональні й стимуляція розвитку незапліднені яйцеклітини відбувається за рахунок вмісту пилкових зерен. Таким методом удалося одержати гаплоїди у *Triticum monococcum* із частотою до 20 %.

3. Стимуляція партеногенезу при запиленні пилком інших видів. Так були отримані гаплоїди тютюну й картоплі.

4. Метод близнюків – добір гаплоїдів, що спонтанно виникають при поліембріонії або різних випадках апоміксису. Іноді насіння проростають двома або більше проростками, які можна розділити і виростити окремо. Серед них зустрічаються гаплоїди, які походять з незапліднених яйцеклітин додаткових зародкових мішків або з інших клітин зародкових мішків (синергід і антипод). Частота виникнення гаплоїдів серед близнюків у багатьох рослин (пшениця, ячмінь, тимофіївка, їжака, тонконіг, картопля і т. і.) у середньому становить 0,5 %, що робить метод близнюків дуже трудомістким. Однак, у ряду рослин є лінії, що дають високий вихід гаплоїдів. Очевидно, спонтанне виникнення гаплоїдів контролюється генотипом. Так, у бавовнику була відібрана лінія, яка постійно давала від 24,3 до 38,9 % гаплоїдних рослин.

5. Метод гаплопродюсера, заснований на здатності деяких видів утворювати нестабільні міжвидові та більш далекі гібриди, у яких у перших поділах дроблення зиготи відбувається елімінація хромосом виду-гаплопродюсера. Наприклад, при гібридизації пшениці з *Hordeum bulbosum*, кукурудзою, африканським просом утворюються гаплоїди пшениці.

6. Метод гіногенезу, заснований на культивуванні на штучних поживних середовищах ізольованих насінних зачатків і наступній регенерації рослин.

7. Метод андрогенезу, заснований на культивуванні на штучних поживних ізольованих середовищах пиляків і мікроспор та наступній регенерації рослин. Це найбільш ефективний спосіб одержання гаплоїдів.

Особливості мінливості у гаплоїдних мікроорганізмів. Мікроорганізми виявилися дуже зручним об'єктом для генетичних досліджень перш за все тому, що вони є гаплоїдними організмами, у них одна хромосома і вона являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, не пов'язану з білком. Крім того, мікроорганізми мають короткий життєвий цикл: деякі віруси і бактеріофаги живуть 20-30 хв., гриби – 1-2 години. За такий проміжок часу внаслідок великої швидкості розмноження вони дають численних нащадків. Це дозволяє вловити генетичні події, що відбуваються з частотою 1 на 1 млн. клітин і рідше. І, нарешті, мікроорганізмам притаманні два способи розмноження – статевий і безстатевий.

Всі мікроорганізми за способом харчування діляться на дві групи: *прототрофи* і *ауксотрофи*. Прототрофи – бактерії дикого типу. Вони можуть жити на мінімальному живильному середовищі, що містить лише мінеральні солі і вуглеводи, а потрібні їм речовини (амінокислоти, вітаміни та ін.) синтезують самі. *Ауксотрофи* – мікроорганізми, що втратили здатність синтезувати певні речовини. Вони живуть лише на повному живильному середовищі, що містить всі потрібні для них метаболіти.

Для обліку біохімічних змін (мутацій) використовується метод «відбитків» і метод «селективних середовищ». Перший зводиться до того, що на чашку Петрі з повним живильним середовищем висівається досліджуваний штам мікроорганізмів і після зростання колоній робиться відбиток їх на чашки Петрі (з мінімальним і повним живильним середовищем) за допомогою шматочка оксамиту, натягнутого на диск, однаковий по діаметру з чашкою. Потім порівнюють колонії, що з'явилися на обох чашках, і відзначають ті, які не дали зростання на мінімальному середовищі. Це ауксотрофні мутанти, що вимагають подальшого аналізу, щоб з'ясувати, здатність до синтезу яких речовин вони втратили. Даний аналіз проводиться методом селективних середовищ, тобто набору середовищ, що містять не всі метаболіти відразу, а один який-небудь (певний вітамін, амінокислоту, азотисту

основу). Залежно від того, на якому середовищі ауксотрофний мутант дає зростання, можна визначити притаманний йому біохімічний дефект.

4.7. Способи передачі спадкової інформації у бактерій

У 1928 р. Ф. Гріффіт отримав цікаві дані по зараженню мишей збудником пневмонії. Він використовував два штами пневмококу: вірулентний штам S (його клітини мають полісахаридну капсулу і утворюють гладенькі колонії) і невірулентний штам R (клітини не мають капсули і утворюють шорсткі колонії). Зараження мишей вірулентним штамом викликало їх загибель. При ін'єкції невірулентного штаму миші не хворіли. Пневмонія у них не розвивалася і після введення вірулентного штаму, вбитого нагріванням. Однак, якщо мишам вводився одночасно вбитий штам S і живий штам R, через деякий час вони гинули від пневмонії, а при посіві крові були виділені живі пневмококи з капсулою. Отже, властивості вбитого вірулентного штаму перейшли до живого невірулентного. Це явище було названо *трансформацією*. Природу цього явища в 1944 р. встановив О. Евері. Він встановив, що трансформуючий фактор, виділений ним від вбитих бактерій інактивувався лише дезоксирибонуклеазою, ферментом, що розщеплює тільки ДНК. Це означало, що трансформуючою речовиною є ДНК.

Трансформація зводиться до включення речовини хромосоми однієї бактерії (донора) в хромосому інший (реципієнта) і служить одним із способів обміну генетичною інформацією у бактерій. Однак механізм її ще недостатньо вивчений.

Довгий час вважалося, що генетична трансформація властива лише одноклітинним. В даний час встановлено, що явища, що нагадують генетичну трансформацію, можуть відбуватися і в клітинах еукаріотів. При взаємодії деяких вірусів з клітинами тварин можлива трансформація еукаріотної клітини. Одержана нею нова генетична інформація стабільно передається при наступних клітинних поділах. Отримано незаперечні докази існування генетичної трансформації в клітинах ссавців. Дж. Берг і В. Мак-Брайд при культивуванні клітин миші в середовищі з ізольованими хромосомами клітин людини виділили потомство клітин з маркерами останньої.

У 1952 р Н. Ціндер і Дж. Ледерберг описали ще один спосіб передачі спадкової інформації у бактерій. Дослідження проводилися на бактеріях мишачого тифу *Salmonella typhimurium.* В U-подібну трубку

з бактеріальним фільтром посередині засівали на повне живильне середовище 2 штами: в одну частину пробірки штам 22А (ауксотрофний мутант, не здатний до синтезу триптофану, T^-), в іншу – штам 2А дикого типу (здатний синтезувати триптофан, T^+). Через деякий час при посіві на мінімальне середовище бактерії штаму 22А дали невелику кількість колоній. Отже, вони набули здатність синтезувати триптофан (рис. 4.9).

Перехід бактерій з одного коліна пробірки в інше неможливий через бактеріальний фільтр. Перенесення інформації здійснювалося фагом. ДНК-віруси (фаги) діляться на дві групи: паразити, що призводять до загибелі бактеріальні клітини, і помірні (симбіотичні), що не викликають загибелі клітин. Помірні віруси, або профаги, існують в клітині у вигляді ДНК, інтегрованої з ДНК бактерії, і реплікуються разом з її хромосомою. Явище такого співіснування помірного фага і бактерії носить назву лізогенії. Лізогенна клітина (інакше клітина з профагом) зазвичай нічим не відрізняється від інших бактерій.

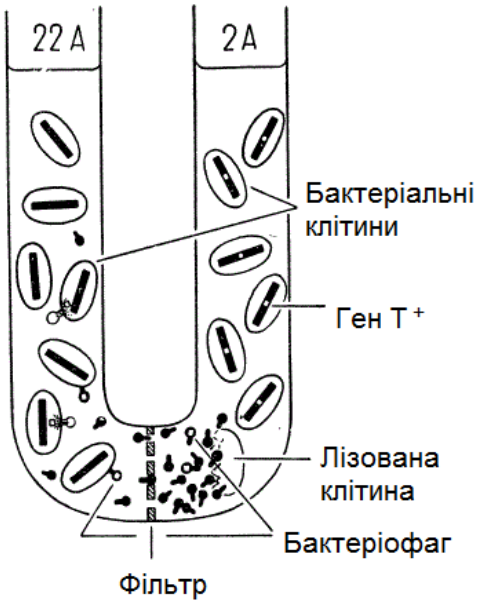


Рис. 4.9. Схема експерименту, який демонструє явище трансдукції у *Salmonella typhimurium*

Виявити профаг можна при активізації його іонізуючим опроміненням і ультрафіолетом, внаслідок чого він перетворюється в зрілий фаг, вбиває клітину і використовує ДНК бактерії на побудову своєї ДНК. Таким чином, профаг при зараженні нової клітини може передати їй частину спадкової інформації від старої. Штам 2А виявився лізогенним по фагу, який з помірного в силу якихось причин перет-

ворився в паразитичний і при зараженні нових бактерій переніс в них частину фрагмента ДНК з геном, контролюючим синтез триптофану. Бактеріальний фільтр не є перешкодою для вірусів, так як розміри їх дуже малі і вони можуть фільтруватися.

Явище перенесення спадкової інформації бактеріофагом від одних бактерій до інших назвали *трансдукцією*.

У 1946 р Дж. Ледерберг і Е. Татум при спільному вирощуванні двох ауксотрофних комплементарних мутантів *E. coli* ($B^-M^-P^+T^+$ і $B^+M^+P^-T^-$) протягом ночі отримали культуру $B^+M^+P^+T^+$, яка виявилася здатною, на відміну від вихідних штамів, рости на мінімальному живильному середовищі без додавання метіоніну, біотину, треоніну і проліну. Трансформації і трансдукції тут явно не було. При наявності бактеріального фільтра в посудинах, де вирощувалися культури, взаємного обміну інформацією не спостерігалося. Очевидно, існує дуже тісний контакт між бактеріями. На підставі цього вперше було висловлено припущення про можливість у бактерій статевого процесу. Статевий процес у бактерій, при якому здійснюється перенесення генетичної інформації при тісному контакті клітин, було названо кон'югацією. Передача інформації при кон'югації носить однобічний характер. У 1952 р Б. Хейс показав, що при кон'югації одна з клітин (чоловіча, F^+) служить донором, інша (жіноча, F^-) – реципієнтом. Донорні клітини несуть особливий фактор F, який є позахромосомною структурою. Реципієнти цього фактору не мають.

Процес кон'югації і механізм перенесення генетичного матеріалу був описаний у бактерій *E. coli* в 1955 р В. Вольманом і Ф. Жакобом. Вони показали, що при кон'югації фактор F може переходити з чоловічої клітини в жіночу і перетворювати її в F^+. При цьому інші властивості бактеріальної клітини не змінюються. Передача статевого фактору відбувається незалежно від інших генетичних маркерів. Клітини штамів F^- всередині себе не рекомбінують.

При зворотній мутації статевої фактор у бактерій може знову придбати автономний стан. Звільнений з хромосоми, подібно профагу, він іноді захоплює фрагмент бактеріальної хромосоми, прилеглий до нього, і при кон'югації разом з ним переходить в жіночу клітину, надаючи їй властивості донорної клітини і деякі інші властивості, контрольовані фрагментом хромосоми. Такий процес перенесення спадкової інформації з однієї бактеріальної клітини в іншу за допомогою статевого фактору називається *сексдукцією*.

Таким чином, статевий фактор є генетичним елементом, який здатний до самореплікації і може існувати в двох станах: в автономному і інтегрованому в хромосому. Такі ділянки генетичного матеріалу отримали назву епісом.

4.8. Транспозиції. Транспозицією називається нереципрокне переміщення генетичного матеріалу в межах одної хромосоми або між хромосомами. Транспозиції можуть бути *спрямованими*, за яких переміщення генетичного матеріалу здійснюється лише в певні місця геному, і *неспрямованими*, коли такі переміщення можливі в будь-які ділянки хромосом, незалежно від їх будови. Неспрямовані транспозиції відбуваються за участю *мобільних (транспозибельних) генетичних елементів* (МГЕ), здатних змінювати свою локалізацію в геномі. Як мобільні елементи можуть діяти і деякі віруси, у такому разі можливе переміщення ділянок ДНК не лише між хромосомами, але і між клітинами.

Транспозиція не вимагає гомології донорних і реципієнтних сайтів ДНК, тому переміщення МГЕ називають ще *незаконною рекомбінацією*, вона потребує участі особливого фермента – *транспозази*, а інколи й інших білків, які кодуються власною ДНК багатьох транспозибельних елементів. МГЕ, що не мають гена транспозази, не здатні до переміщення, але за наявності інших МГЕ, які здатні синтезувати транспозазу, вони можуть переміщатися.

Частота переміщення МГЕ коливається в межах спонтанних мутацій (10^{-4}-10^{-7} на покоління). Цей процес часто супроводжується інсерціями МГЕ всередину гена, що інактивує його. Такі інсерції можуть також виявляти *полярний ефект*, впливаючи на функцію розташованих за вставкою генів. Це може бути наслідком функціонування привнесених інсерцією нових регуляторних елементів геному. Переміщення МГЕ може супроводжуватися численними перебудовами хромосом – інверсіями, розривами, делеціями сегментів, транслокаціями, актами рекомбінацій у сайтах розташування гомологічних МГЕ.

Розрізняють наступні типи транспозиції:

Реплікативна – МГЕ реплікується і його копія переноситься на нове місце. Це найбільш розповсюджений тип транспозиції.

Нереплікативна, або консервативна – МГЕ вирізається і переноситься у новий сайт.

РНК-опосередкована, за якої в хромосому вбудовується копія МГЕ або інший сегмент ДНК, що синтезується шляхом зворотної транскрипції на РНК-матрицях.

У прокаріотів виявлено МГЕ двох типів – інсерційні послідовності, або IS-елементи (insertion sequences – послідовності-вставки) і транспозони.

IS-елементи – найпростіший тип мігруючих елементів геному (рис. 4.10). Їх розміри коливаються у межах 200-5700 п. о. Кінцеві ділянки IS-елементів мають однакові або дуже подібні короткі нуклеотидні послідовності (8-40 п. о.), які розміщені у зворотному порядку (інвертовані повтори). Інвертовані кінцеві ділянки IS-елементів відіграють важливу роль у процесах переміщення мігруючих елементів геному. IS-елементи не здатні до самостійної реплікації і не кодують розпізнавальних фенотипових ознак. Гени, які знаходяться у IS-елементах забезпечують лише їх переміщення із однієї ділянки у іншу.

IS-елементи беруть участь у регуляції активності генів бактеріальної клітини; індукції мутацій типу делецій або інверсій при переміщенні всередині геному або дуплікацій при вбудовуванні у хромосому (при транспозиції IS-елементу послідовність ДНК хромосоми у сайті вбудовування дублюється); координації взаємодій плазмід, транспозонів і профагів.

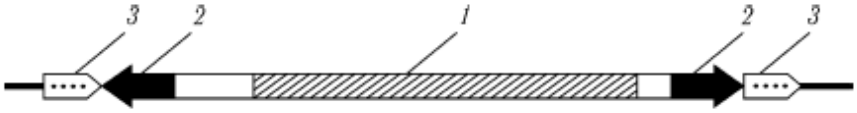


Рис. 4.10. Схема будови IS-елемента: 1 – ген (гени), що кодує транспозазу, необхідну для переміщення IS,). 2 – короткі кінцеві інвертовані повтори, 3 – дуплікація ДНК-мішені, яка виникає внаслідок вбудування IS-елемента

Транспозони – більш складно організовані МГЕ. Вони складаються із 2000-25000 п. о., містять фрагмент ДНК із специфічним геном, а також два кінцевих IS-елемента (рис. 4.11). При включенні у геном бактерій транспозони викликають дуплікації, при виході із певної ділянки ДНК – делеції, при виході і наступній інтеграції у ДНК з поворотом фрагменту на 180° градусів – інверсії. Транспозони не здатні до самостійної реплікації і відтворюються лише у складі бактеріальної хромосоми.

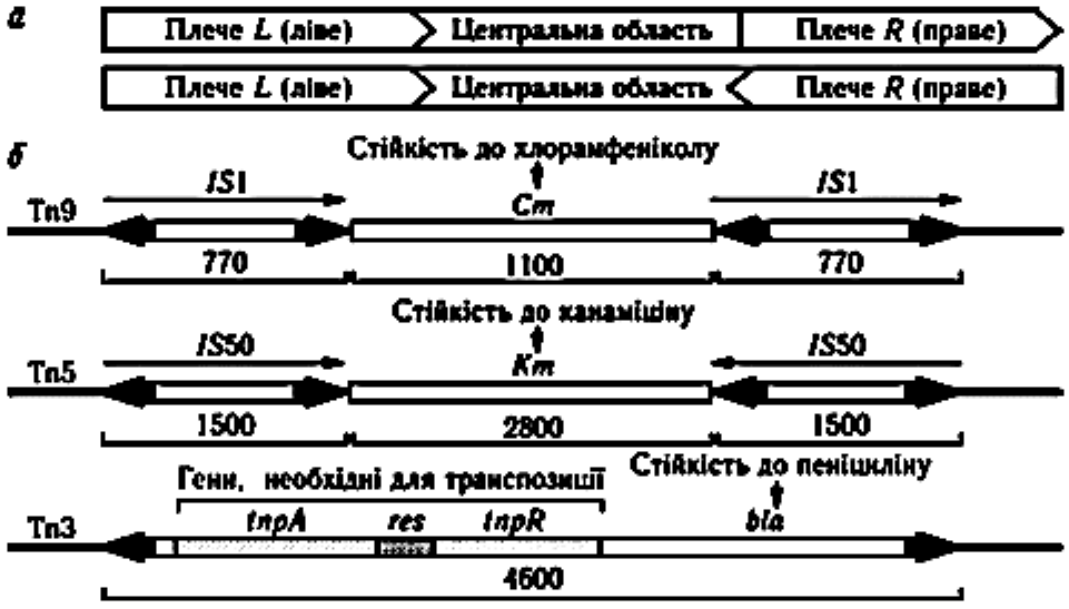


Рис. 4.11. Схема будови бактеріального транспозона (а) та структурна організація деяких з них (б)

У складі деяких транспозонів виявлені гени, що кодують синтез ферментів транспозаз і резолваз, які відповідають за процеси транспозування. Крім того транспозони можуть мати гени, які надають бактеріям ряд нових ознак (стійкість до антибіотиків та ін.). Оскільки транспозони містять гени, які надають бактеріям фенотипово виражені ознаки, то їх легше виявити, ніж IS-елементи. Загалом для транспозонів характерні ті ж гени, що і для плазмід (гени стійкості до антибіотиків, бактеріоцинів, мутагенів та ін.).

Мобільні елементи еукаріотів відрізняються структурою і особливостями транспозиції, що дозволило поділити їх на дві групи – ДНК-транспозони і ретроелементи. ДНК-транспозони переміщуються по геному у вигляді копій ДНК із використанням різних механізмів. Ретроелементи розмножуються за допомогою своїх копій РНК, використовуючи для цього зворотну транскриптазу. Ретроелементи поділяють на три класи: LINE (Long Interspersed Nuclear Elements), або довгі диспергованні повтори; SINE (Short Interspersed Nuclear Elements), чи короткі диспергованні повтори; LTR (retrovirus like elements with Long Terminal Repeats), або ретровірусоподібні елементи, до яких належать і ендогенні ретровіруси.

У грибів найкраще досліджені *транспозоноподібні елементи*. Вони можуть відігравати роль промоторів і регулювати активність генів, а також несуть мішені для білків-репресорів. Це спричиняє те,

що цілі блоки генів починають підкорятися одному регуляторному сигналу.

У рослин віднайдені так звані контролюючі елементи, що не мають власного фенотипічного прояву. Серед них розрізняють:

– автономні елементи, котрі для реалізації своєї функції не потребують участі додаткових генетичних структур і переміщуються як єдине ціле;

– неавтономні елементи, для транспозиції яких необхідний додатковий генетичний елемент, котрий може бути розташованим навіть в іншому місці геному.

З них й почалося дослідження *транспозицій* (Б. МакКлінток, 1948). При вивченні успадковування характеру антоціанового забарвлення зернівки кукурудзи був виявлений ген *Dt* (dotted – краплистий), який специфічно впливав на мутабільність іншого гена – *a1*, що визначає забарвлення зернівки. Однак повідомлень про те, що під дією гена *Dt* спостерігається підвищена мутабільність якого-небудь іншого гена кукурудзи, дотепер немає. За подальшого дослідження феномена високої мутабільності у кукурудзи виявили цикл «міст – розрив – злиття» в 9-й хромосомі. При вивченні циклу «розрив – злиття – міст» використовували маркерні гени *C-I* (незабарвлений ендосперм; *C-I* і *c* визначають відсутність забарвлення, *C* – наявність забарвлення; відношення домінування: *C-I>C>c*) і *Wx* (кременистий ендосперм). Було встановлено, що хромосома з генами *C-I Wx* здатна до виникнення в ній розривів, однак ця здатність може не реалізуватися, якщо відсутній додатковий спадковий фактор. Отримані дані дозволили не тільки виявити в хромосомі *C-I Wx* точку, здатну до розриву, але й локалізувати її щодо зазначених генів. З погляду генетичного аналізу цю точку можна розглядати як своєрідний локус у хромосомі, який можна ідентифікувати по місцю локалізації й по специфічному прояву (виникнення розриву). Цей локус Б. Мак-Клінток позначила символом *Ds* (від англ. dissociation – розрив, роз'єднання). Додатковий фактор, без якого в локусі *Ds* розриви не виникають, одержав символ *Ac* (activator). Активатор розглядається як домінантний фактор, оскільки однієї його дози досить для індукування розривів у локусі *Ds*.

Істотною характеристикою локусів *Ac* і *Ds* виявилася їх здатність до переміщення. У кожному новому положенні їх локалізація може бути встановлена за допомогою звичайного генетичного аналізу. У ряді випадків у ході такого аналізу можна показати повне зчеп-

лення між *Ds* і яким-небудь маркерним геном. У цих випадках локус *Ds* при переміщенні вбудовується поруч із цим маркерним геном або навіть усередину нього. При цьому незмінно виявлялося, що даний маркерний ген проявляється так само, як рецесивний алель. Ці своєрідні рецесивні алелі, утворені шляхом вбудовування локусу *Ds* по сусідству з геном або усередину його, залишаються досить стабільними, якщо в генотипі відсутній фактор *Ac*. У присутності ж цього фактора кожний з таких «рецесивних алелів» виявляється високомутабільним, даючи часті мутації до домінантного стану. Очевидно, при цьому локус *Ds* вирізається і вилучається з даного місця розташування, можливо, переміщаючись в інший район тієї ж або іншої хромосоми (рис. 4.12).

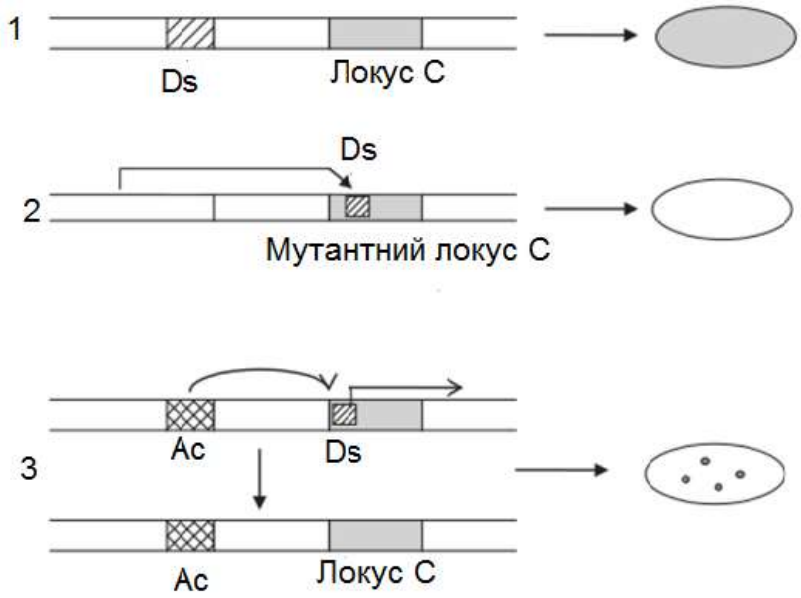


Рис. 4.12. Схема взаємодії активатора (Ac) та дисоціатора (Ds), який інактивував локус С у кукурудзи: 1) Ds віддалений від локусу С (ендосперм забарвлений); 2) Ds перемістився у локус С та інактивував його (ендосперм незабарвлений); 3) Ac стимулює переміщення Ds, внаслідок чого він залишає локус С, відображенням чого є поява забарвлених плям після ряду мітотичних поділів

Отже, у локусі *Ds* можуть відбуватися дві різні події: 1) розрив хромосоми і 2) вирізання локусу *Ds* і його переміщення в інше місце тієї ж хромосоми або в іншу хромосому. При цьому система локусів *Ac-Ds* впливає на прояв третіх генів. Тому локуси *Ac* і *Ds* назвали контролюючими (регуляторними) елементами.

Дослідження методами молекулярної генетики блискуче підтве-

рдили ці висновки. Ділянки ДНК кукурудзи по 14-20 т. п. н., вставлені усередину фага λ, клонували в складі фагової ДНК. В «бібліотеці» таких клонів виділяли клон, що містить, наприклад, ген *Wx*. Клон, що несе ДНК нормального алеля *Wx,* відрізняється від відповідного клону, що несе ДНК мутабільного алеля *wx-m,* тим, що останній містив вставку додаткової послідовності ДНК, як і очікувалося відповідно до теорії мобільних генетичних елементів. Вивчення «алелей» *wx-m7* і *wx-m9* (по Мак-Клінток − комбінації *WxAc*) показало, що в кожному випадку усередину гена *Wx* вставлений фрагмент довжиною 4,3 *kb*. Елемент *Ds*, нездатний до самостійного переміщення, розглядається як недосконалий елемент *Ac*, що втратив частину своєї нуклеотидної послідовності.

Дослідження мутабільних алелей гена алкогольдегідрогенази кукурудзи (*Adh1-2F11* і *Adh1-fm33S*) дозволило виявити вставку усередину гена фрагментів у *1,3kb* у першому випадку і *0,4kb* – у другому. Ці алелі виявлялися мутабільними тільки в присутності *Ac,* тобто в ген *Adh1* були вбудовані елементи *Ds,* значно більш короткі, ніж елемент *Ac(4,3kb).* Однак усі виявлені елементи *Ac* і *Ds* у кукурудзи незмінно мали ідентичні кінцеві інвертовані повтори з 11 п. н. Показано, що зміна від мутабільного алеля *Adh*1-fm*335* до стабільного активного алеля *Adh*1 дійсно пов’язана з вилученням з гена *Adh* нуклеотидної послідовності елемента *Ds*.

Виявлені закономірності носять загальний характер. Це підтверджують дослідження мобільних генетичних елементів у дрозофіли, що розвернулися в останні десятиліття. У людини МГЕ складають майже 45 % геному. Значна частина унікальної ДНК також походить від древніх копій МГЕ, але вони мутували і вже не розпізнаються як транспозони. Геном людини містить не лише власні МГЕ або їхні фрагменти. Є дані про наявність В2 елементів миші, а також фрагментів еукаріотних ретроелементів та бактеріальних IS-елементів у складі мтДНК та мітохондріально-подібних послідовностей у ядерній ДНК. SINE-елементи (довжина 50-700 п. о.) є пасивними транспозонами, оскільки не кодують ніяких білків. Alu-повтори (довжина близько 300 п. о.) найчисленніші із SINE-елементів. Назву вони одержали від Alu I рестриктази, для якої більшість із повторів мають внутрішній сайт пізнавання. Усі члени Alu I родини ДНК ссавців і людини гомологічні на 75-85 % і можуть переміщуватися по геному. У них відсутні кінцеві повтори, які характерні для МГЕ бактерій, грибів і комах. Крім того, вони можуть транскрибуватися *in vitro*

РНК-полімеразою III, причому починається транскрипція поблизу одного кінця МГЕ і закінчується на різних відстанях від іншого його кінця. РНК-полімераза III звичайно зчитує інформацію з генів аденовірусів, тРНК та 5S рРНК. Той факт, що МГЕ входять у число субстратів РНК-полімерази III, свідчить про наявність у них локусу для розпізнавання цього ферменту і його спільність з вірусами та тРНК.

Транспозони відіграють важливу роль у процесах еволюції мікроорганізмів, забезпечуючи специфічну форму їх внутрішньовидового і міжвидового генетичного обміну (так зване горизонтальне перенесення генів). Здатність МГЕ реорганізувати функціонування структурних генів і змінювати регуляцію їх експресії дозволяє організмам швидко адаптуватися до нових умов існування. Завдяки цьому переважна більшість таких перебудов генетичного матеріалу, які приховані від безпосереднього впливу еволюційних факторів, може брати участь в оптимізації швидкостей мутаційного і рекомбінаційного процесів, становленні статевого розмноження і навіть у видоутворенні.

5. Генетичні основи онтогенезу

Диференціація і детермінація. Розділ генетики, що вивчає генетичні основи індивідуального розвитку (онтогенезу), називається *онтогенетика*. Онтогенез включає збільшення маси організму (зростання) і структурно-функціональну диференціацію складових його клітин. Поняття «зростання» і «розвиток» застосовні як до одноклітинних, так і до багатоклітинних еукаріотичних організмів, однак специфіка онтогенезу тих і інших обумовлена глибокими еволюційними відмінностями між ними, пов’язаними з виникненням багатоклітинності. У даній темі розглядаються в основному питання, що стосуються генетичної регуляції онтогенезу багатоклітинних тварин.

Індивідуальний розвиток починається із запліднення яйцеклітини. Однак, організм новонародженої дитини вже містить близько 10^{14} клітин, а тіло дорослої людини складається з 10^{15}-10^{16} клітин. В результаті процесів, що відбуваються в онтогенезі, формуються органи і тканини, що виконують, як правило, обмежене число функцій. Структура клітин тканин дорослого організму відрізняється, і досить помітно, від структури яйцеклітини і пристосована до виконання тканино-специфічних функцій, що виникають в ході диференціювання. Диференціація – це процес формування структурно-функціональної організації клітин багатоклітинних тварин і рослин, в результаті яко-

го клітини набувають здатність до виконання певних функцій в складному організмі. Диференційований стан в нормі стабільний: клітини нервової тканини не перетворюються на печінкові або епітеліальні клітини кишечника, і навпаки.

А. А. Заварзін відкрив основну тенденцію в еволюції тканинних клітин: в міру ускладнення організації їх носіїв вони все більше і більше стають частинами цілого, втрачають самостійність і у своїх проявах цілком залежать від надклітинних регуляційних систем: внутрішньо- і міжтканинних відношень, гуморальних і нервових чинників. Соматичні клітини тварин еволюціонують як субодиниці цілісного організму. Зрозуміло, що цей принцип був би порушений, якби відбувалося постійне перетворення одних клітин в інші. У свою чергу, це порушило б гомеостатичні реакції організму і різко знизило б його стійкість до зовнішніх чинників. Взаємодія клітин тканин і надклітинних регуляційних систем заснована на *компетентності*, тобто сприйнятливості клітин до регуляційних впливів. Фактично всі основні функції диференційованих клітин контролюються організмом. Цей принцип порушується в злоякісних пухлинах.

Кінцеве диференціювання часто пов’язане з втратою здатності клітин до розмноження – проліферації. Активна проліферація і функціонування – процеси в нормі, як правило, взаємовиключні. Це, ймовірно, і є причиною того, що, наприклад, нервові клітини ссавців діляться останній раз в ембріональному і ранньому постембріональному періодах, а клітини нервових гангліїв дрозофіли – в личинковій стадії. За розвитку дорослого організму формуються комплекси, які складаються з багатьох нервових клітин, що виконують різні функції, починаючи від чутливого нейрона і закінчуючи руховим. Якби нервові клітини постійно ділилися в дорослому організмі, то підтримка цілісності цих комплексів була б неможливою і це, безсумнівно, мало б катастрофічні наслідки для нервової регуляції.

Отже, диференційований стан проявляється в специфічному «портреті» соматичних клітин і їх функціональній характеристиці. Однак, у проліферуючих тканинах клітини диференційовані в різному ступені. Наприклад, в епітелії на вершині ворсинки знаходяться клітини, які досягли кінцевої стадії диференціювання, тоді як клітини в криптах – камбіальних відділах кишкового епітелію – морфологічно сильно відрізняються від клітин вершини ворсинок. Однак з недиференційованих клітин крипт можуть виникнути тільки епітеліальні клітини кишечника. В цьому випадку можна стверджувати, що кліти-

ни крипт детерміновані, тобто можуть розвиватися тільки в якомусь певному напрямку. Детермінація починається в ранньому ембріогенезі і поступово звужує число можливих перетворень клітин до одного будь-якого диференційованого стану або дуже небагатьох.

У дослідах з пересадки ядер у амфібій, проведених у 1950-і рр., було показано, що повноцінний розвиток може бути забезпечений тільки ядрами, взятими на самих ранніх стадіях розвитку тварин. Такі ядра називаються *тотіпотентними*, тобто здатними повторити усі стадії розвитку організму і дати всі типи клітин. Ядра, взяті з клітин первинних зародкових тканин, які вже сформувалися, таку здатність втрачають. Наприклад, ектодермальні ядра, пересаджені в енуклейовану яйцеклітину, приводили до розвитку зародка з дефектною ентодермою, і, навпаки, ентодермальні ядра не здатні утворювати ектодерму. Пізніше було показано, що при певних експериментальних умовах тотіпотентность ядер клітин навіть диференційованих тканин може бути відновлена, проте важливо підкреслити, що в нормі процеси звуження потенцій ядер соматичних клітин розвиваються незворотно.

Цікаві факти, що стосуються детермінації, були отримані на дрозофілі. Як відомо, багато комах, у тому числі і дрозофіла, розвиваються шляхом повного метаморфозу. Це означає, що на стадії лялечки відбувається лізис личинкових тканин, крім нервових гангліїв, гонад та імагінальних дисків. З імагінальних дисків шляхом проліферації і диференціювання розвиваються органи дорослої мухи. Вони складаються з диференційованих постмітотичних клітин, що не діляться. Імагінальні диски можна виділити з личинки і трансплантувати в черевце дорослих самок. Там під впливом гормонів реципієнта вони проліферують без диференціювання. Якщо їх повернути в порожнину тіла личинки незадовго до утворення лялечки, то вони диференціюються в суворій відповідності зі своїм походженням. Так, імагінальні диски, що визначають розвиток очей, навіть якщо вони пересаджені в інше місце, наприклад, в черевну частину тіла іншої личинки, розвиваються в очі.

Епігеномна спадковість. Виникає питання: який механізм підтримки стабільності диференційованого стану; чому клітини, детерміновані в певному напрямку, скільки б раз вони ні ділилися, зберігають свою специфічність? А. Вейсман вважав, що в основі детермінації лежать поділи, наслідком яких є нерівна спадковість похідних клітин. Носієм повної генетичної інформації, тобто детермінантів (генів)

всіх ознак дорослого організму, є запліднена яйцеклітина. Тканинні клітини отримують набір генів, що відповідають їх структурі і функціям. Це означає, що в нервових клітинах немає генів гемоглобіну, а в клітинах печінки – генів, що кодують білки м'язів. Для підтвердження своєї гіпотези А. Вейсман використовував дані по дімінуції хроматину у кінської аскариди. Він вважав, що дімінуція – це якраз той процес, при якому тканинні клітини звільняються від зайвого генетичного матеріалу. Ця гіпотеза виявилася помилковою. Дімінуційні поділи (зазвичай один або два) відбуваються в ранньому ембріогенезі, коли тканино-специфічні гени ще не починають функціонувати. Власне кажучи, дімінуція – це перший акт детермінації, що розділяє зародкові статеві і соматичні клітини. Всі типи тканинних клітин розвиваються після дімінуційних поділів. Не можна не відзначити, що дімінуція спостерігається у незначного числа з нині відомих видів тварин. Дані цитогенетики показують, що у видів, у яких дімінуція відсутня, каріотипи всіх тканинних клітин однакові; цитофотометрія свідчить про те, що клітини різного диференціювання за вмістом ДНК не розрізняються; нарешті, дані молекулярної гібридизації нуклеїнових кислот вказують на ідентичність спектра нуклеотидних послідовностей в клітинах різних тканин. Отже, гени гемоглобіну присутні не тільки в еритроїдних клітинах, де вони активно функціонують, але і в клітинах мозку, печінки, нирок та інших тканин.

Таким чином, диференціація відбувається на основі незмінного в кількісному відношенні геному, що зберігає повний спектр всіх своїх компонентів. Однак допускається, що в процесі диференціювання окремі гени вибірково ушкоджуються і в даних тканинних клітинах вже ніколи не будуть функціонувати. В такому випадку в клітинах кишкового епітелію гени гемоглобіну не працюють не тому, що вони там відсутні, а внаслідок пошкодження їх структури або випадання незначних за розмірами послідовностей, що регулюють транскрипцію.

Експериментальні дані, які спростували і цю точку зору на механізм диференціації, були отримані англійським вченим Дж. Гердоном на початку 1960-х рр. (рис. 5.1) на *Xenopus laevis*. Незапліднені яйцеклітини опромінювали великою дозою ультрафіолету, яка інактивувала ядра, але практично не ушкоджувала цитоплазму. За допомогою мікрохірургічної техніки в такі енуклейовані яйцеклітини пересаджували ядра з диференційованих клітин – епітелію кишечника пуголовка. У деяких випадках вдалося отримати повністю норма-

льні плідні дорослі особини. Якщо для експерименту брали ядра однієї особини, то всі тварини, що розвинулися, представляли собою клон, тобто були подібні між собою так само, як однояйцеві близнюки людини. З дослідів Дж. Гердона можна зробити два висновки: по-перше, в процесі детермінації і диференціювання не відбувається незворотних ушкоджень геному; по-друге, перенесення ядра тканинної клітини в незапліднене яйце принаймні в деяких випадках приводить до повного повернення дедиференційованого стану і детермінації.

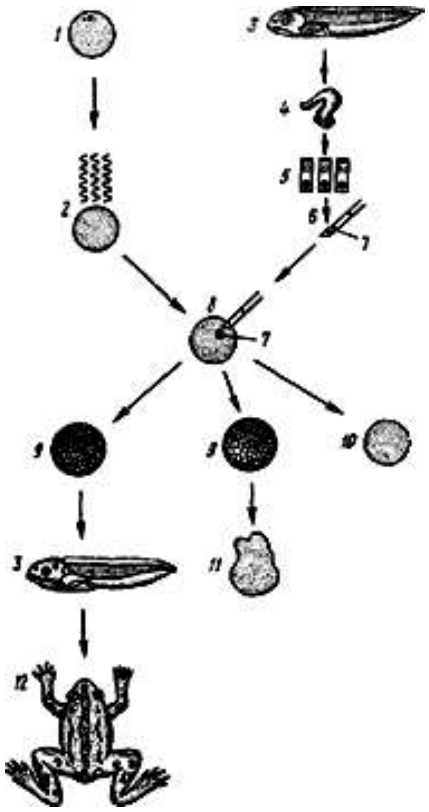


Рис. 5.1. Клонування *Xenopus laevis* –розвиток дорослої особиниз яйцеклітини, ядро якої замінено ядром з соматичної клітини кишкового епітелію пуголовка: *1 – незапліднене яйце, 2 – УФ-опромінення, 3 – пуголовок, 4 – кишечник пуголовка, 5– клітини кишкового епітелію, 6 – мікропипетка, 7 – ядро епітеліальної клітини, 8 – яйце-реципієнт, 9 – бластула, 10 – клітина, що не ділиться, 11– аномальний ембріон, 12– доросла жаба*

Інші приклади часткової зворотності диференційованого стану можуть бути показані за допомогою гібридизації соматичних клітин *in vitro*. В даний час техніка подібних експериментів досить висока, тому досить легко можна отримати гібриди між клітинами навіть далеких видів з різними типами молекулярної організації геному, на-

приклад, між клітинами птахів і ссавців. Якщо злити еритроцити птахів, ядра яких повністю втратили генетичну активність, з клітинами *HeLa* (людського походження), то в отриманих гібридних клітинах швидко активуються еритроцитарні ядра; в них синтезуються РНК, ДНК і білки, специфічні для даного виду птахів. Однак в природі навряд існують умови, при яких різко порушується стабільність диференційованого стану, а тим більше відбувається передетермінація.

Таким чином, оскільки детермінація та диференціювання не пов'язані з кількісними або якісними змінами геному (в абсолютній більшості випадків), то прийнято вважати, що ці процеси засновані на епігеномній спадковості. Суть її полягає в постійному відтворенні в ряді поколінь соматичних клітин такої надмолекулярної організації хромосом, яка дозволяє функціонувати в кожному типі клітин строго певним наборам генів.

У вищих рослин геном соматичних клітин також в основному репресований, і ця репресія підтримується епігеномною спадковістю. Однак в цьому випадку повна дерепресія геному в культурі рослинної тканини спостерігається частіше. Наприклад, із соматичних клітин моркви і тютюну можна отримати повноцінні фертильні рослини.

Механізм становлення детермінації поки невідомий, проте ясно, що у багатьох тварин, наприклад у амфібій, первинна детермінація пов'язана з хімічною неоднорідністю різних ділянок яйцеклітини. Тому і детермінація ядер, які опинилися в ході дроблення в районі вегетативного полюса, буде іншою, ніж у тих, які потраплять в цитоплазму анімального полюса.

Транскрипція і ампліфікація генів в оогенезі. Диференціація цитоплазми яйця обумовлена функціонуванням хромосом, яке є особливо актуальним у видів з хромосомами типу лампових щіток. Вони мають чітко виражену хромомерну будову. З хромомер у вигляді петель витягнуті ДНК-ові вісі хромосом. Оскільки хромосоми типу лампових щіток існують в диплотені і складаються з чотирьох хроматид, кожна ділянка такої хромосоми представлена чотирма хромомерами і чотирма петлями. Петлі – це ділянки хромомерів з інтенсивною транскрипцією. Зазвичай в них легко розрізняють тонкий кінець, де починає свій рух РНК-полімераза, і товстий кінець, де транскрипція закінчується. Так званий матрикс, яким покриті петлі, являє собою гранули або фібрили, які складаються із знов синтезованої РНК і білка. Деякі петлі мають специфічну морфологію і легко ідентифікуються. Істотно відзначити, що число петель у тритонів – об'єктів, у

яких хромосоми типу лампових щіток вивчені найбільш детально, – близько до числа типів іРНК, присутніх в цитоплазмі. Ця іРНК використовується не тільки для формування цитоплазми яйця. Велика частина молекул іРНК, синтезованих хромосомами типу лампових щіток, не пов'язана з рибосомами. Вона використовується пізніше під час раннього ембріогенезу.

До числа інших важливих подій, що здійснюються під генетичним контролем під час оогенезу, відноситься селективна ампліфікація (множення числа копій) рибосомного гена, що спостерігається у деяких тварин, наприклад, у амфібій. Причина ампліфікації – різке збільшення обсягу яйцеклітини в порівнянні з середньою соматичною клітиною, яке досягає іноді трьох порядків. Щоб заповнити такий величезний обсяг клітини рибосомами, гени рДНК самі збільшуються в числі настільки, що, наприклад, у *Xenopus laevis* після закінчення ампліфікації вміст рДНК майже дорівнює кількості ДНК, укладеним в диплоїдний набір хромосом. Число ядерець – ділянок хромосом, де відбувається синтез рибосом, – відповідно зростає з двох до 1,5 тис. Чудова особливість молекулярного механізму ампліфікації полягає в тому, що він здійснюється за принципом кільця, що котиться. Одна з копій гена рДНК залишає хромосому, потім замикається в кільце, з якого як би витягується хвіст довжиною в кілька десятків мікрометрів. Потім ця структура знову циклізується, утворюючи велике кільце, на основі якого формується ядерце.

В останні десятиріччя явище ампліфікації окремих генів було відкрито не тільки в оогенезі. Так, стійкість клітин до протиракових препаратів може бути обумовлена гіперпродукцією тих ферментів, котрі інактивують зазначені препарати.

Диференціальна активність генів в онтогенезі. Для розвитку характерна зміна активності різних генів. Для того, щоб наочно уявити цей процес, досить згадати основний біогенетичний закон Е. Геккеля, згідно з яким в ембріогенезі кожного виду повторюються основні риси ембріонального розвитку його еволюційних попередників. Ясно, що гени, які контролюють утворення зародкових зябрових щілин й інших подібних органів, функціонують в онтогенезі плацентарних ссавців лише обмежений час.

Чітка впорядкованість у зв'язку зі стадіями індивідуального розвитку встановлена для зміни функціонування генів гемоглобіну в ссавців. Подібних прикладів можна навести чимало, проте з точки зору

генетики розвитку найбільш цікаві ті випадки, де диференціальна активність генів може бути простежена безпосередньо за зміною деяких особливостей хромосом. Найбільш яскравим прикладом такого роду служать пуфи в гігантських політенних хромосомах (рис. 5.2).

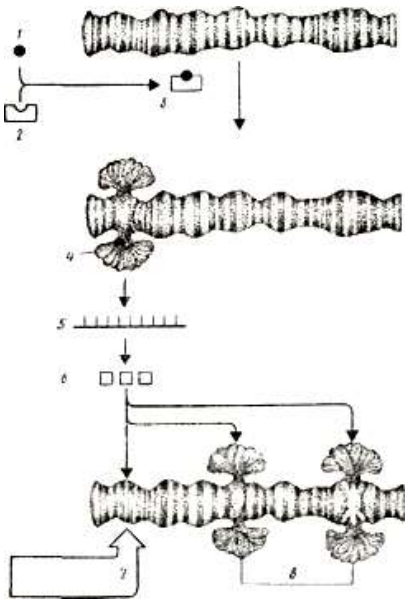


Рис. 5.2. Пуфінг гігантських хромосом в клітинах слинних залоз дрозофіли под дією екдизону: 1 – екдизон, 2 – рецепторний білок, 3 – комплекс екдизону і рецепторного білка, 4 – ранній пуф, 5 – іРНК, 6 – білки-продукти раннього пуфа, 7 – регресія раннього пуфа, 8 – пізні пуфи, що виникли під дією продуктів раннього пуфа

Морфологічно пуфи представляють собою здуття певних районів хромосом, обумовлені декомпактизацією окремих дисків і інтенсивним синтезом в них РНК. Отже, пуфи можна розглядати як високоактивні у функціональному відношенні тканино-специфічні і стадіє-специфічні гени. Встановлено роль гормонів (зокрема, екдизону – гормону, що викликає линьку та метаморфоз) в індукції пуфів, а також роль білків, синтезованих ранніми пуфами, в індукції пізніх пуфів.

Таким чином, стероїдні гормони і білки, ймовірно, не єдині фактори, відповідальні за переключення генів в онтогенезі, а отже, і за зміну фаз індивідуального розвитку організму. Особливо велика роль стероїдних гормонів в регуляції генної активності у тварин. Відомо, що гормони синтезуються в спеціалізованих клітинах залоз внутрішньої секреції і циркулюють по всьому організму. Однак окремі гормони активують гени не в усіх клітинах, а тільки в клітинах-мішенях,

які містять спеціальні рецепторні білки, з якими специфічно зв'язуються молекули гормону. Це зв'язування відбувається в цитоплазмі, а потім комплекс, що утворився, проникає в ядро, де він взаємодіє з певними негістоновими білками хромосом. У відсутності гормонів ці білки блокують або промоторні, або інші, поки невідомі регуляторні ділянки певних генів. Комплекс «гормон – рецепторний білок» знімає блокуючу дію негістонового білка-репресора, наслідком чого є транскрипція даного гена, дозрівання іРНК, транспорт її в цитоплазму і синтез білка.

Роль генетичних факторів у визначенні тривалості життя. Тривалість життя окремих видів генетично детермінована. Які б ідеальні умови не були створені для лабораторних мишей, вони живуть не більше 3-3,5 років, причому є лінії короткоживучі і довгоживучі. На середню тривалість життя зовнішні чинники впливають істотно, тоді як максимальну тривалість життя змінити дуже важко. Так, середня тривалість життя людини за останні 100 років збільшилася приблизно в два рази, тоді як на максимальній тривалості життя це ніяк не позначилося.

Молекулярні механізми генетичної детермінації тривалості життя поки невідомі. Останнім часом значного поширення набула точка зору про те, що генетичний матеріал – хромосомна ДНК – служить ініціальним субстратом старіння. Це означає, що старіння починається з накопичення пошкоджень в ДНК, які поступово руйнують систему генетичної регуляції. Численні порушення внутрішньоклітинної регуляції, які проявляються і на рівні тканин, органів і організму, складають найважливішу характеристику процесу старіння в цілому. Іонізуючі випромінювання і хімічні мутагени, дефекти репарації ДНК, що прискорюють накопичення пошкоджень в геномі, знижують тривалість життя. Нарешті, ендогенні фактори, зокрема вільні радикали – побічні продукти клітинного метаболізму, в числі інших хімічних компонентів клітини ушкоджують і генетичні молекули. Вважають, що порушення генів регуляції систем репарації, яке поступово розвивається під дією ендогенних факторів, призводить до накопичення помилок в процесі «поточного ремонту» ДНК аж до її деградації з подальшою загибеллю клітини.

Молекулярні основи процесу старіння і генетична картина онтогенезу. Давно відомо, що у старих організмів активність і життєздатність клітин різко знижені, що і є головною причиною старіння і природної смерті. Л. Сцилард (Szilard, 1959) першим висловив припущення, що знижена в старості життєздатність клітин викликається накопиченням помилок при репродукції молекул нуклеїнової кислоти і утворенням під контролем таких дефективних молекул ДНК молекул білків-ферментів, що мають неправильну будову і нездатні до нормального здійснення своїх ферментативних функцій.

Пізніше ряд генетиків (Г. Д. Бердишев, Л. Хейфлик, Д. Саудерс та ін.) запропонували кілька інших трактувань цього питання. Вони висловили припущення, що смерть клітин – *апоптоз*, який супроводжується відмиранням тканин, є нормальною запрограмованою подією в розвитку багатоклітинних тварин і що старіння і природна смерть клітин заздалегідь запрограмовані і визначаються тими ж механізмами, від яких залежить тривалість життя всього організму. При цьому приймається, що старіння тварини відбувається в результаті накопичення помилок в генетичній програмі, яка направляє процеси розвитку клітин. З плином часу в ДНК клітин, які діляться, збирається все більше і більше помилок, хоча система, керуюча відтворенням ДНК, працює дуже точно, але точність ця не абсолютна.

Одна із гіпотез про старіння – гіпотеза маргінотомії – ґрунтується на припущенні, що за поділу клітин відбувається часткове вкорочення теломерних ділянок хромосом і поступова втрата генетичного матеріалу, необхідного для нормальної життєдіяльності. Інтенсивність цих втрат визначає швидкість старіння і строки життя. Сьогодні є докази того, що у злоякісних клітин довжина молекули ДНК в теломерній області хромосоми після її реплікації відновлюється за допомогою спеціальних ферментів – *теломераз*. Штучним введенням гена теломерази в ізольовані клітини людей вдається досягти безмежних поділів цих клітин без ознак старіння.

В теперішній час молекулярна генетика малює таку картину онтогенезу. Зигота, що виникає в результаті злиття чоловічої і жіночої гамет, отримує від них два гаплоїдних набори хромосом, в яких містяться молекули ДНК, що знаходяться в неактивному, дволанцюговому стані.

Потім деякі з молекул ДНК переходять в одноланцюговий стан і визначають синтез відповідних їм молекул РНК-посередника і білків-ферментів, активних на самому початку онтогенезу. Але більшість молекул ДНК, пов'язані з молекулами гістонів, зберігають свою дволанцюгову будову і залишаються в пасивному стані.

На початку спеціалізації деякі клітини отримують сигнали, що стимулюють активність певних генів-регуляторів, котрі контролюють синтез білків, що впливають на відповідні молекули ДНК. Це призводить до відокремлення від них гістонів і викликає перехід їх в одноланцюгову форму з утворенням РНК-посередника і білків-ферментів, що визначають зміну біосинтезу в напрямку, відповідному характеру спеціалізації цих клітин.

За різної спеціалізації стимулюється активність різних генів-регуляторів, які, у свою чергу, активують ДНК різних структурних генів. Сигнали приходять з інших клітин або виникають в цитоплазмі самої клітини в результаті зміни обміну речовин та місцезнаходження клітини.

З плином часу відбувається накопичення помилок при синтезі молекул ДНК, настає старече ослаблення і загибель клітин. Всі ці особливості онтогенезу сформувалися і зберігаються в результаті природного відбору, який забезпечує характер індивідуального розвитку і тривалість життя окремих особин, найбільш сприятливі для успіху в боротьбі за існування і процвітання виду.

6. Генетика популяцій і генетичні основи еволюції

Генетична структура популяцій. Типи популяцій. На всіх рівнях організації живої матерії (молекулярному, хромосомному, клітинному, організмовому) діють однакові механізми і закони спадковості і є чинники, що порушують ці закономірності і призводять до змін ознак і властивостей організмів. Але всі види на Землі існують у формі не розрізнених особин, а їх сукупностей. Група, або сукупність особин, які відносяться до одного виду, заселяють певний ареал і мають подібні механізми адаптації до умов проживання, називається *популяцією*. Вивченням генетичних процесів на рівні популяції займається *популяційна генетика*.

Перші дослідження структури популяцій були проведені ще в 1903 р. В. Йогансеном. Слідом за цим почалося інтенсивне вивчення генетичних процесів у популяціях. У той час еволюціоністи усього світу вороже ставилися до менделізму. Їх уявлення про спадковість і мінливість носили розпливчастий характер, а основну роль в еволюційному процесі вони відводили змінам окремих особин. У 1926 р. була опублікована робота С. С. Четверикова «Про деякі моменти еволюційного вчення з точки зору сучасної генетики», в якій була зроблена спроба зв'язати еволюційне вчення з генетикою. С. С. Четвериков намагався показати, що еволюційний процес треба вивчати не на рівні окремих особин, оскільки це веде до ламаркізму, а на рівні популяцій.

Інтенсивне дослідження генетичної структури популяцій почалося в 1930-60-ті рр. і продовжується дотепер. Теорію популяцій розвили глибше і запропонували математичні методи для вивчення її структури С. Райт, Р. Фішер, Дж. Холдейн, Н. В. Тимофєєв-Ресовський, Н. П. Дубінін та ін.

Все популяції можна умовно розділити на три категорії в залежності від ступеня їх ізольованості, а також регулярності і сталості зв'язків особин різних популяцій.

Найбільші *географічні популяції* роз'єднані географічними факторами (гори, річки, водоймища тощо). Такі популяції відносно незалежні, самостійні (наприклад, материкові і острівні популяції тварин, рослин одного і того ж виду). Зв'язки між ними здійснюються епізодично, та й то переважно в прикордонних районах. Тому великі географічні популяції відносно стійкі.

До складу географічних популяцій входять *екологічні популяції*, роз'єднані між собою внаслідок дії екологічних факторів (клімат, сезонність і т. і.). Такими можна вважати популяції літнього та осіннього льоту метеликів, двокрилих та інших комах; прісноводні і морські популяції лососевих риб і т. д. Ізоляція екологічних популяцій відносна, внаслідок чого можливі більш регулярні міграції особин однієї популяції в іншу. Зв'язки в таких популяціях набувають періодичний, сезонний характер.

Кожна велика географічна або екологічна популяція складається з порівняно дрібних *елементарних популяцій*, самостійність яких носить епізодичний характер. Елементарні популяції часто роз'єднані в результаті дії біологічних факторів ізоляції. До останніх можна віднести *фізіологічні* (інстинкти, добова і сезонна статева активність, рі-

вень останньої тощо) і *генетичні* (наявність у особин в популяції хромосомних аберацій, поліплоїдії, підвищеного рівня концентрації летальних мутацій, ядерно-цитоплазматичної несумісності і т. і.), а також фактори, що впливають на деякі фізіологічні властивості особин (життєздатність, тривалість життя, статева активність, плодючість) та їх поведінкові реакції. В елементарних популяціях спостерігаються досить регулярні і часті міграції особин з однієї популяції в іншу, що робить зв'язки таких популяцій порівняно широкими і постійними.

Будь-які категорії популяцій складаються з особин різних вікових груп, які іноді живуть зовсім окремо (пуголовки, цьоголітки і дорослі особини у амфібій; личинки, лялечки і імаго у комах та ін.). Популяції включають також різні функціональні групи особин (чоловічі та жіночі особини; соціальні касти у бджіл і мурах і т. і.).

Однак, популяція – не просто сукупність, безліч самостійних особин одного виду, що відрізняються фенотипово і генотипово; це єдина, цілісна жива система, організм, що складається з багатьох особин одного виду. Цей організм, як і все живе, сформувався під впливом певних екологічних факторів в результаті дії природного добору. Як цілісна жива система, популяція володіє такими властивостями, як спадковість і мінливість. Спадковість популяції проявляється певними закономірностями розподілу в ній фенотипів, генотипів і алелів. Генетичний склад популяції відносно постійний і може змінюватися під дією факторів довкілля. Популяції властиві два типи мінливості: *групова* (відмінності між популяціями) і *індивідуальна* (відмінності між особинами однієї популяції). І групова, і індивідуальна мінливість можуть мати екологічний, модифікаційний характер. Модифікаційна мінливість в ряді випадків виявляється пристосувальною, але переважно для окремих особин. В основі пристосування до екологічних умов популяції в цілому лежить генотипова мінливість (мутації, комбінації).

Генетична інформація популяції, тобто сукупність генів всіх її особин, що склалася в процесі еволюції, становить *генофонд популяції*. Кожна особина популяції є тимчасовим носієм частини її генофонду. Вона може привнести один або кілька нових генів внаслідок мутації, але в цілому цей внесок невеликий.

Виходячи з характеру і способу розмноження особин, розрізняють три групи популяцій:

популяції *агамних* організмів;
популяції *автогамних* організмів;
популяції *алогамних* організмів.

Генетична структура популяцій багато в чому визначається типом розмноження особин і являє собою сукупність таких процесів, як особливості успадковування і розподілу алелів, генотипів і фенотипів в популяції, а також типів її мінливості.

Генетична структура популяції апоміктів. Апоміксис – це один із способів безстатевого розмноження. Він спостерігається у деяких видів рослин (роди *Rubus*, *Potentilla*, *Hypericum*, *Hieracium*, *Crepis* та ін.), у яких розмноження відбувається за допомогою справжнього насіння, але воно утворюється без запліднення. При апоміксисі яйцеклітина містить нередукований набір хромосом внаслідок зміни процесу мейозу. Така яйцеклітина розвивається партеногенетично. Апоміксис виключає запліднення, а також генетичне розщеплення. Тому генетичний склад апоміктичної популяції змінюється незначно. При апоміксисі в популяції утворюються клони з ізогенними особинами, які повторюють ознаки батьківських. У зв'язку з цим і генетична структура, і фенотип популяції відносно однорідні. Переважаючим типом мінливості тут слід вважати модифікації; комбінативна мінливість практично виключається, а частка спонтанних мутацій невелика. В умовах оптимального пристосування популяції до певних екологічних умов апомікти добре виживають і широко розповсюджуються. Однак, зміна умов проживання може привести їх до вимирання, так як серед генетично однорідних особин не опиниться рекомбінантів, які надають популяції певну пластичність в процесі пристосування до нового середовища.

Генетична структура популяції автогамних організмів (самозапилювачів). Генетична структура популяції самозапильних організмів (родина Тонконогових – ячмінь, пшениця; родина Бобових) характеризується певним ступенем гомозиготності особин по ряду генів. Самозапилення, приводячи до гомозиготизації особин, не робить популяцію генетично однорідною. При самозапилення особин, гетерозиготних по одній парі алелів, наприклад *Aa*, в ряду поколінь буде зменшуватися число гетерозигот, але при цьому вищепляться принаймні дві генетично неоднакові гомозиготні *чисті лінії*: *AA* і *aa*. Якщо врахувати, що гомозиготизація йде не по одній, а по багатьом парам алелів, легко припустити, скільки чистих ліній з різною комбінацією гомозигот по кожній парі алелів може утворитися в популяції. Напри-

клад, гомозиготизація по двох парах алелів призведе до формування чотирьох чистих ліній: *ААВВ*, *ААвв*, *ааВВ* і *аавв*.

Чиста лінія являє собою потомство одного гомозиготного організму. Особи в межах чистої лінії генетично однорідні і мають подібний фенотип – відмінності особин всередині чистої лінії носять, як правило, модифікаційний характер (наприклад, у злаків одного виду подібні за генотипом особини можуть відрізнятися по довжині колоса, кількістю колосків у колосі, розміром і вагою насіння). Не виключається і можливість порушення генетичної чистоти лінії за рахунок виникнення мутацій. Популяція самозапилювачів складається з чистих ліній і тому генетично і фенотипово неоднорідна. Фонд генетичної мінливості такої популяції складають фенотипові і генотипові відмінності між чистими лініями. Чудовою ілюстрацією цього є селекційні досліди (відбір за масою насіння) в популяціях і чистих лініях квасолі, проведені В. Йогансеном в 1903 р. Мінливість за вагою насіння у вихідній популяції квасолі виражалася варіаційною кривою, де крайні значення маси насіння становили 150 і 750 мг. В. Йогансен провів добір і надалі окремо висівав насіння з масою 250-350 мг і 550-650 мг. У нащадків середня маса насіння був відповідно 443,4 і 518,7 мг. При подальшому доборі великого і дрібного насіння в чистих лініях зміни середньої маси насіння не спостерігалося ні в одному з наступних шести поколінь. На основі отриманих даних В. Йогансен зробив висновок, що мінливість особин в межах чистих ліній обмежена модифікаціями і тому добір в них безперспективний. Добір діє лише на популяцію, так як вона являє собою генетично неоднорідний матеріал.

Дослідження В. Йогансена – добра теоретична основа для селекції. Генетично грамотний селекціонер не стане вести відбір за ознакою у самозапилювачів в межах чистої лінії, бо він успіхів не принесе.

Таким чином, в популяції автогамних організмів спостерігається тенденція до гомозиготизації та розпаду популяції на генетично однорідні чисті лінії. Однак у зв’язку з тим, що поряд з самозапиленням іноді можливо перехресне запилення, а також внаслідок постійно виникаючих мутацій в популяції завжди зберігається деякий рівень гетерозиготності за окремими локусами. Це обумовлює певну пластичність її в процесі пристосування до середовища проживання. Якщо ж при гомозиготизації в популяції відбувається вищеплення шкідливих мутацій, це нерідко призводить до її депресії і навіть виродження.

Генетична структура популяцій алогамних організмів. До популяцій алогамних організмів відносяться популяції більшості видів тварин і рослин, що розмножуються статевим шляхом за допомогою вільного схрещування особин одна з одною. Вважають, що в такій популяції всі особини мають однакову ймовірність випадкового вільного схрещування, що називається *панміксією*. Особливості та закономірності спадковості і мінливості в популяції алогамних організмів зазвичай досліджуються на прикладі панміктичної популяції, де випадкове вільне схрещування особин протікає за відсутності добору. Природно, що існування такої *ідеальної* популяції в природі малоймовірно.

При перехресному розмноженні в популяції йде постійна, безперервна гібридизація, результатом якої є її максимальна гетерозиготність за багатьма генами. В основі гетерозиготності популяції лежать такі явища, як генетична різнорідність особин, що вступають в схрещування, і постійний процес рекомбінації генів при перехресному статевому розмноженні. Отже, гібридні особини кожного наступного покоління мають шанси все більш відрізнятися один від одного, а також від особин попередніх поколінь і генотипово, і фенотипово. Прикладом служить більша фенотипова різнорідність у перехреснозапилюваного жита, ніж у самозапилюваної пшениці.

Вільне схрещування особин з безперервним процесом виникнення нових комбінацій генів, на перший погляд, може привести до безладної мінливості популяції. Однак саме вільне схрещування оберігає її від хаосу в успадковуванні та призводить до стану відносної рівноваги генотипів, алелів і фенотипів. С. С. Четвериков писав: «У самому механізмі вільного схрещування закладений апарат, який стабілізує чисельність компонентів цієї спільноти. Будь-яка зміна співвідношення цих чисельностей можлива тільки ззовні і можлива тільки до тих пір, поки діє та зовнішня сила, яка цю рівновагу порушує».

У 1904 р. К. Пірсон встановив закон стабілізуючого схрещування, який в 1908 р. підтвердили математик Г. Харді і лікар В. Вайнберг, запропонувавши незалежно один від одного формулу (*закон Харді-Вайнберга*), яка відображає характер розподілу алелів, генотипів і фенотипів в популяції. Позначивши частоту гена *А* буквою p, а гена *а* – q, за допомогою решітки Пеннета можна уявити в узагальненому вигляді розподіл алелів в популяції (табл. 6.1).

В умовах вільного схрещування співвідношення алелів і генотипів в описаній популяції буде виглядати наступним чином:

$$p^2(AA) : 2pq(Aa) : a^2(aa).$$

Сутність закону стабілізуючого схрещування зводиться до того, що «в умовах вільного схрещування при будь-якому початковому співвідношенні чисельності гомозиготних і гетерозиготних батьківських форм в результаті першого ж схрещування всередині спільноти встановлюється стан рівноваги ...» і, як би не було порушено ззовні цю рівновагу, «... в результаті першого ж за тим схрещування всередині спільноти встановлюється нова рівновага і зберігається до тих пір, поки якась зовнішня сила знову не виведе її з цього стану» (С. С. Четвериков).

Таблиця 6.1

Розподіл частот генотипів в умовах вільного схрещування при заданих співвідношеннях гамет

Самці	Самиці	
	p A	*q a*
p (*A*) *q* (*a*)	$p^2(AA)$ *pq* (*Aa*)	*pq* (*Aa*) $q^2(aa)$

Формула Харді-Вайнберга відображає співвідношення в популяції особин з домінантними і рецесивними ознаками, відносну частоту гомозигот і гетерозигот, частоту алелів по одному локусу. За допомогою цієї формули можна розрахувати в заданій популяції зазначені частоти.

Наприклад, в Балтіморі в популяції з 5000 чоловік 3200 (64 %) мають здатність згортати язик трубочкою (домінантна ознака, детермінована геном *R*), а 1800 (36 %) осіб такою здатністю не володіють (рецесивний ген *r*). Отже, частота гомозигот *rr* дорівнює 0,36, а осіб з генотипами *RR* і *Rr* – 0,64. Виходячи з того, що частота *rr* складає $q^2 = 0{,}36$, $q = 0{,}6$ ($q = \sqrt{q^2}$), а так як $p + q = 1$, то $p = 1 - q = 0{,}4$, тобто, частота аллеля *R* (p) складе 0,4. За формулою Харді-Вайнберга можна визначити і частоту гомозигот *RR* і гетерозигот *Rr*. Якщо $p = 0{,}4$, то $p^2 = 0{,}16$, отже, частка осіб з генотипом *RR* складе 16 %. Частота гетерозигот дорівнює $2pq = 2*0{,}4*0{,}6 = 0{,}48$, або 48 %.

Таким чином, користуючись формулою Харді-Вайнберга і маючи дані по частоті в популяції будь-якої рецесивної ознаки (наприклад, альбінізм, глухота), можна визначити приблизну частоту алелів і гетерозиготних носіїв його в популяції. Вона демонструє зв’язок

між частотами алелів одного гена, співвідношення в популяції особин з генотипами *АА*, *Аа* і *аа*, відображає закономірності успадковування тільки в панміктичних популяціях і лише для простих випадків моногенного аутосомного успадковування. При цьому частота певних фенотипів залежить не тільки від частоти алеля, а й від того, домінантний він або рецесивний. Прояв домінантної ознаки, у свою чергу, пов'язаний як з частотою контролюючого його гена в популяції, так і зі ступенем експресивності і пенетрантності самої ознаки.

Формула Харді-Вайнберга може бути застосовна для визначення частот генів і генотипів лише на певний момент в конкретній популяції, де виконуються наступні необхідні умови:

популяція повинна бути досить численною, щоб уникнути помилок в статистичному аналізі;

всі особини популяції повинні мати однакову ймовірність до схрещування;

всі особини повинні з однаковою ймовірністю утворювати всі типи гамет;

всі типи гамет повинні бути однаково життєздатними;

мутації гена, за яким ведеться розрахунок, мають бути дуже рідкісними, щоб їх частотою можна було б знехтувати, або ж частота прямих і зворотних мутацій повинна бути однаковою;

всі особини мають бути однаково життєздатними, тобто виключається дія природного добору;

популяція має бути максимально ізольованою, а процеси міграції рідкісними або ж зовсім відсутніми.

Ці умови в природних популяціях нереальні. Популяція постійно змінює свою генетичну структуру внаслідок виникнення нових мутацій, дії природного відбору, міграції особин однієї популяції в іншу тощо. Зміна рівноважного стану за алелями і генотипам в популяції характеризує мінливість популяції, або її *генетичну динаміку*.

Основні фактори генетичної динаміки популяцій. Основними механізмами, які викликають зміни частот генів в популяції, є:

Мутації. Мутації призводять до виникнення спадкових змін. Генні мутації можуть виникнути в будь-який момент, але виявляться не завжди. Найбільш важливими є мутації, що виникають при гаметогенезі. Накопичення в популяції рецесивних летальних, напівлетальних і інших мутацій утворює своєрідний «генетичний тягар» даної популяції. Генетичний ефект такого тягаря проявиться не відразу, але недооцінювати небезпеку таких генів для майбутніх поколінь не мо-

жна. Хоча мутації генів і хромосом слугують єдиним джерелом всієї генетичної мінливості, відбуваються вони з дуже низькою частотою. Мутації – процес надзвичайно повільний, так що самі по собі вони змінюють генетичну структуру популяції з дуже малою швидкістю.

Дрейф генів передбачає швидку зміну частот генів в популяції. Дрейф генів часто називають ефектом Райта, який з'ясував вплив випадковості як еволюційного фактору. У невеликих популяціях можуть виникати коливання частот генів, алелі фіксуватися або втрачатися випадковим чином. У минулому структура популяції створювала ідеальні умови для дрейфу генів. Генетичним дрейфом називається зміна частот алелів в ряду поколінь, що викликається випадковими причинами, наприклад, нечисленністю популяції. У таких популяціях не утворюються всі можливі комбінації гамет, деякі генотипи з'являлися з найбільшою ймовірністю. Випадковість виявляється істотним чинником, що призводить до дрейфу генів в наступних ситуаціях:

ген, що створює еволюційні переваги, може неодноразово виникати шляхом мутацій перш, ніж стане фіксованим; будучи дуже рідкісним, він легко втрачається, не потрапляючи в зиготу;

при переселенні на нові території невелика група може втратити певні гени, а генний комплекс може пристосуватися до їх відсутності (*ефект засновника*). Випадкові зміни частот алелів, подібні тим, що обумовлені ефектом засновника, виникають і в тому випадку, якщо популяція в процесі еволюції проходить через «*пляшкове горлечко*». Коли кліматичні або інші умови існування стають несприятливими, чисельність популяції різко скорочується і виникає небезпека її повного вимирання. В подальшому такі популяції можуть відновити свою чисельність, однак, внаслідок дрейфу генів в той час, як популяція проходить через «пляшкове горлечко», в ній суттєво змінюються частоти алелів, і ці зміни зберігаються протягом наступних поколінь. Відмінності між популяціями людини в частотах алелів, які визначають групи крові системи АВ0, могли виникнути, по крайній мірі частково, в результаті ефектів засновника і «пляшкового горлечка».

Дрейф генів – процес абсолютно випадковий: він відноситься до особливого класу явищ, обумовлених помилками вибірки. При цьому вірогідність елімінації алеля, або навпаки, його фіксації, прямо пропорційна його частоті в начальний період часу.

Правильне уявлення про чисельність популяції дає не загальне число особин в популяції, а так звана *ефективна чисельність*, яка ви-

значається за кількістю особин, що дають початок наступному поколінню. Це пояснюється тим, що в генофонд наступного покоління вносять вклад лише особини, які в попередньому поколінні є батьками, а не вся популяція в цілому.

Гібридизація, або *потік генів* (спосіб передачі існуючих генів з однієї популяції в іншу). У результаті гібридизації виникають абсолютно нові комбінації генів, а також змінюються частоти алелів, але не у виду в цілому, а в локальних популяціях, якщо у старожилів і прибульців вихідні частоти алелів різні.

Внаслідок міграції змінюється структура популяції в залежності від нових генотипів, які надійшли, часто з'являються нові алелі, які в популяції не спостерігалися.

Інбридинг. У тих випадках, коли схрещування не випадкове, тобто особини з певними генотипами спаровуються між собою частіше, ніж цього слід очікувати на основі випадковості, говорять про *асортативні* схрещування. Особливою формою такого схрещування є інбридинг, при якому схрещування між спорідненими особинами відбувається частіше, ніж можна було б очікувати на основі випадковості.

Оскільки родинні особини в генетичному відношенні більш подібні між собою, інбридинг веде до підвищення частоти гомозигот і зниження частоти гетерозигот порівняно з теоретично очікуваною при випадковому схрещуванні, хоча і не змінює частот алелів. Крайнім випадком інбридингу є самозапліднення або самозапилення. Інбридинг часто застосовується в садівництві і в тваринництві. У популяції інбридинг підвищує частоту прояву шкідливих рецесивних алелів.

Мірою генетичних наслідків інбридингу служить коефіцієнт інбридингу (F). Він представляє собою ймовірність того, що у будь-якої особини в даному локусі виявляться два алелі, ідентичні за походженням. Два алелі з однаковою нуклеотидною послідовністю ДНК ідентичні за структурою, але не обов'язково ідентичні за походженням, оскільки вони могли бути успадковані від предків, які не перебувають між собою у родинних стосунках.

У популяції, що схрещується випадково, і має алелі A і a з частотами p і q, частота гетерозигот дорівнюватиме $2pq$. В популяції з коефіцієнтом інбридингу F частота гетерозигот складатиме $(1–F)$ від їх частоти в популяції, що схрещується випадково. Частоти генотипів в інбредній популяції можна представити таким чином:

Генотип	*AA*	*Aa*	*aa*
Частота	p^2+pqF	$2pq–2pqF$	q^2+pqF

За відсутності інбридингу (F=0) частоти генотипів задовольняють закону Харді-Вайнберга.

Коефіцієнт інбридингу F відображає надлишок в популяції особин, гомозиготних по якомусь локусу. Він відображає також збільшення долі гомозиготних локусів в генотипах окремих особин.

Селекціонери намагаються вивести сорти рослин і породи тварин, які відрізняються за максимальними показниками господарсько-корисних ознак (урожайність, жирномолочність, яйценосність і т. п.). При цьому в кожному поколінні як батьки використовуються «найкращі» організми, тобто проводиться штучний добір. Селекціонери намагаються також отримати якомога більш однорідні сорти і породи. Для цього застосовують систематичний інбридинг, який підвищує гомозиготність. Однак давно відомо, що інбридинг звичайно приводить до зниження пристосованості нащадків внаслідок погіршення таких важливих характеристик організму, як плодючість, життєздатність і стійкість до хвороб та несприятливих абіотичних факторів. Це явище прийнято називати *інбредною депресією*. Інбредна депресія обумовлена підвищенням ступеню гомозиготності за шкідливими рецесивними алелями.

Існує важлива риса, притаманна процесам мутагенезу, міграції і дрейфу: ні один з них не приводить до підвищення або зниження пристосованості організмів. Ці процеси змінюють частоти алелів незалежно від того, чи викликає це підвищення чи зниження пристосованості організмів до умов довкілля. З цього витікає, що, оскільки дані процеси випадкові з точки зору пристосованості організмів, вони самі по собі здатні приводити до руйнації організації і зниження пристосованості організмів.

Однак є ще один, найбільш важливий процес, що змінює частоти генів в популяції – *природний добір*. Природний добір – це процес, що сприяє підвищенню пристосованості і запобігає руйнівним наслідкам всіх інших процесів. В цьому смислі природний добір представляє собою найбільш важливий фактор еволюції, оскільки тільки природним добором можна пояснити адаптивну високоорганізовану природу живих істот. Природний добір пояснює також різноманітність організмів, оскільки він сприяє їх адаптації до різних умов існування.

Добір, який діє на фенотипові ознаки, буває трьох типів: стабілізувальний, дизруптивний і рушійний. Ці три типи добору відповідають способам, що використовуються даною популяцією для збереження пристосованості до середовища, котре може: 1) залишатися постійним і стабільним (*стабілізувальний добір*), 2) ставати більш мінливим і розпадатися на різні підсередовища (*дизруптивний добір*), 3) безперервно змінюватися в одному і тому ж напрямку (*рушійний добір*).

Остаточним результатом дії природного добору може бути або повна елімінація того чи іншого алеля (хоча мутації в цьому випадку можуть підтримувати частоту шкідливих алелів при низькій, але все ж не нульовій частоті), або виникнення стійкого поліморфізму, коли в популяції одночасно присутні два або більше алелів одного локусу. Дію природного добору нескладно зрозуміти, якщо в одному локусі є тільки два алелі і, отже, в популяції існує три генотипи.

У випадку добору проти рецесивного алеля його частота сильно знизиться, але він ніколи не буде елімінований з популяції, тому що переважна більшість рецесивних алелів фенотипово не проявиться і отже, буде укрита від дії добору в гетерозиготах. За добору проти домінантного алеля існує велика вірогідність повної елімінації алеля, адже усі вони будуть проявляться фенотипово. Такі алелі можуть з невеликою частотою зберігатися в популяції за рахунок мутаційного процесу.

Якщо має місце добір на користь гетерозигот, це приведе до стійкого поліморфізму, коли в популяції присутні обидва алелі, а їх частоти визначаються коефіцієнтами добору проти гомозигот. За добору проти гетерозигот в популяції також існує точка поліморфної рівноваги частот, однак ця рівновага хитлива, так що добір веде до фіксації того чи іншого алеля в залежності від їх початкових частот.

Існує ще частотно-залежний добір. При цьому типі добору пристосованість залежить від частот алелів: чим рідше зустрічається алель, а отже, чим менший ареал займають його володарі, тим краще вони пристосовані до досить вирівняних умов довкілля. Як і добір на користь гомозигот, частотно-залежний добір може приводити до стійкої поліморфної рівноваги.

Генетична коадаптація. Гени існують і репродукуються в цілісних організмах: алель, що нормально функціонує, може не потрапити до наступного покоління, якщо він опиниться в організмі, який не здатний до розмноження. Прояв генів залежить не тільки від зовніш-

нього середовища, але й від дії інших генів, що входять до складу геному даного організму. В кожному локусі природний добір сприяє алелям, які добре взаємодіють з алелями, що містяться в інших локусах. Термін *генетична коадаптація* означає адаптивну взаємодію між генами, які утворюють геном організму.

Коли виникає нова генна або хромосомна мутація, яка погано взаємодіє з рештою геному, під впливом природного добору вона або елімінується, або підтримується при дуже низький частоті, хоча в іншому генетичному оточенні та ж мутація може мати високу частоту. Генетична коадаптація – це властивість як виду в цілому, так і окремих локальних популяцій.

Ізоляція. Ізоляція є важливим фактором зміни генетичної структури популяції і, врешті-решт, видоутворення. Якщо індивіди однієї популяції не схрещуються з індивідами іншої популяції, то така популяція називається ізольованою. Розрізняють 3 типи ізоляції:

- географічна;
- екологічна;
- біологічна.

Географічна ізоляція з'являється завдяки географічним умовам (гори, річки, болота), які не дозволяють індивідам інших популяцій перейти ці бар'єри для відтворення.

Екологічна ізоляція є результатом дії факторів довкілля. Наприклад, популяції риб, які повертаються з моря в річки для нересту специфічні для кожної річки.

Біологічна ізоляція підрозділяється на *генетичну* і *фізіологічну*. Коли відбуваються порушення в мейозі, мутації, поліплоїдія тощо, відбувається генетична ізоляція з генетичною ознакою.

При фізіологічній ізоляції відбуваються різні зміни в умовних рефлексах, в структурі і в фізіології статевих органів, полюванні і т. д.

Питання для самоконтролю

1. Які типи мінливості вам відомі?
2. Що таке модифікаційна мінливість?
3. Назвіть властивості модифікаційної мінливості.
4. Що таке морфози?
5. Що таке фенокопії?
6. Що таке норма реакції?

7. Які фактори впливають на варіювання ознак у межах норми реакції?

8. Які групи виділяють у спадковій мінливості?

9. Наслідком яких процесів є комбінаційна мінливість?

10. Назвіть основні положення мутаційної теорії?

11. За якими категоріями побудовані класифікації мутацій?

12. Як виникають множинні алелі?

13. Охарактеризуйте генні мутації.

14. Охарактеризуйте хромосомні мутації.

15. Чим відрізняється транслокація від кросинговеру?

16. Які геномні мутації вам відомі?

17. Що таке химери?

18. Які типи поліплоїдії вам відомі?

19. Які фактори здатні викликати поліплоїдію?

20. Що таке поліплоїдний ряд?

21. Дайте визначення терміну «основне число хромосом».

22. Опишіть особливості мейозу у автополіплоїдів.

23. Що таке алополіплоїдія?

24. Що таке рафанабрісіка?

25. Які з культурних рослин є алополіплоїдами?

26. Як отримують алополіплоїди?

27. Що таке анеуплоїди?

28. Як анеуплоїди використовують у генетиці рослин?

29. Охарактеризуйте властивості гаплоїдних організмів.

30. Які методи використовують для обліку біохімічних мутацій у мікроорганізмів.

31. Що таке трансформація?

32. Що таке трансдукція?

33. Що таке сексдукція?

34. Дайте визначення транспозиції.

35. Які види транспозицій вам відомі?

36. Назвіть ключовий фермент транспозицій.

37. Охарактеризуйте IS-елементи.

38. Назвіть функції IS-елементів.

39. Опишіть будову транспозонів.

40. Які мобільні елементи еукаріотів вам відомі.

41. Що вивчає онтогенетика?

42. На якому явищі заснована взаємодія клітин в організмі?

43. Що означає термін «тотіпотентність»?

44. Які висновки витікають з дослідів Дж. Гердона?

45. Як здійснюється онтогенетична регуляція активності генів?

46. Як здійснюється транскрипція і ампліфікація генів в онтогенезі?

47. Про що свідчить явище пуфінгу і де воно відбувається?

48. Поясніть роль генетичних факторів у визначенні тривалості життя.

49. Поясніть суть явища апоптозу.

50. Поясніть суть гіпотези маргінотомії.

51. Що вивчає популяційна генетика?

52. Які типи популяцій вам відомі?

53. Дайте визначення терміну «популяція».

54. Опишіть генетичну структуру популяції апоміктів.

55. Опишіть генетичну структура популяції автогамних організмів (самозапилювачів).

56. Опишіть генетичну структурупопуляції алогамних організмів.

57. Що таке панміксія?

58. Поясніть закон Харді-Вайнберга.

59. Перелічите основні фактори генетичної динаміки популяцій.

60. Як мутації впливають на генетичну структуру популяцій?

61. Як дрейф генів впливає на генетичну структуру популяцій?

62. У чому суть ефектів засновника і пляшкового горлечка?

63. Як потік генів впливає на генетичну структуру популяції?

64. Як інбридинг впливає на генетичну структуру популяції?

65. Які типи добору вам відомі?

66. Як генетична коадаптація впливає на генетичну структуру популяції?

67. Як ізоляція впливає на генетичну структуру популяції?

68. Які види ізоляції вам відомі?

РОЗДІЛ ІІІ. СЕЛЕКЦІЯ І ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

7. Селекція рослин

Селекція (лат. selection – добір) – це наука та діяльність по створенню нових сортів та гібридів рослин.

Селекція вирішує це завдання шляхом пристосування до існуючих умов, створює рослини з новими ознаками, більш пристосовані, такі, що дають більш якісну продукцію або мають інші господарсько-корисні ознаки (довгі або зсунуті строки цвітіння, декоративність тощо) – тобто створюють нові сорти та гібриди.

Селекція виникла ще в епоху зародження землеробства, однак і в пору збиральництва існували зачатки добору. Людина намагалася збирати більш крупне насіння з більш розвинутих рослин. Насіння таких рослин випадково попадало на ґрунти, удобрені відходами і проростали. В результаті отримували більш крупне насіння. Так поступово почався добір. У подальшому людина почала свідомо добирати для сівби кращі насіння з кращих рослин. Виник штучний добір, в результаті тривалої дії якого (протягом тисяч років) виникли культурні рослини. Однак добір у той час був неспрямованим.

Накопичений досвід практичної селекції і власні спостереження узагальнив Ч. Дарвін. Він показав, що сучасна різноманітність рослин і тварин, не виключаючи і людину, є результатом їх тривалого історичного розвитку від найпростіших істот, яке відбувалося внаслідок природного та штучного добору. Ч. Дарвін показав, що добір є потужним засобом створення рослин і тварин з потрібними ознаками. Разом з тим, при штучному доборі за певними ознаками збільшується їх мінливість, відбувається швидке накопичення та успадковування змін, що виникли.

Велике значення для селекції рослин мали роботи І. В. Мічурина, який довів можливість управління процесом створення нових сортів з бажаними ознаками, розробив та успішно застосував нові оригінальні методи та створив сорти плодових та ягідних рослин. Велике значення для селекції мають роботи М. І. Вавилова. Здійснивши ряд експедицій, М. І. Вавилов зібрав цінний матеріал по розселенню культурних рослин на земній кулі і описав 8 центрів походження культурних рослин. Знання природних умов на батьківщині тої чи іншої рослини дозволяє виключити деякі безглузді напрямки в селекції і дає

можливість здійснювати її на науковій основі з урахуванням властивостей і самих рослин, і впливу факторів середовища на їх формування. Цінність роботи М. І. Вавилова полягає в тому, що він заклав основи збору і зберігання генофонду рослин. Така колекція, перша в світі, була створена в Ленінграді у Всесоюзному інституті рослинництва. В теперішній час це важливий напрям використання генетичних ресурсів рослин, і кожна країна має національні колекції. Існують також міжнародні колекції, наприклад CIMMYT – міжнародний центр покращання пшениці та кукурудзи у Мексиці, роботи якого по коротокостебловим пшеницям поклали початок «зеленій революції».

Основи вчення про сучасну селекцію розроблені М. І. Вавиловим, який виділив наступні розділи селекції:

1) вчення про вихідний сортовий, видовий і родовий потенціали;

2) вчення про спадкову мінливість (закономірності мінливості, вчення про мутації);

3) вчення про роль середовища у виявленні сортових ознак (вплив окремих факторів середовища, вчення про стадії в розвитку рослин стосовно до селекції);

4) теорія гібридизації як в межах близьких форм, так і віддалених видів;

5) теорія селекційного процесу (самозапилювачі, перехресноопилювачі, рослини, що розмножуються вегетативно і апогамно);

6) вчення про основні напрямки в селекційній роботі, такі як селекція на імунітет, на фізіологічні властивості (холодостійкість, посухостійкість, фотоперіодизм), селекція на технологічні якості, хімічний склад;

7) окрема селекція рослин.

Важко переоцінити значення для селекції встановленого М. І. Вавиловим *закону гомологічних рядів* мінливості у генетично споріднених видів і родів рослин. З урахуванням цієї закономірності селекціонерам вдалося отримати сорт безалкалоїдного люпину на основі тільки природного мутаційного процесу. Люпин зазвичай застосовується як добриво, оскільки на коренях його знаходяться бульбочкові азотфіксуючі бактерії. Зелена маса при цьому не використовується, так як рослина містить отруйний алкалоїд. Разом з тим відомі культурні безалкалоїдні форми бобових. Селекція люпину йшла по шляху виявлення безалкалоїдної форми (приблизно одна з 10 млн. рослин).

Наукова селекція рослин в Україні має давні традиції. У 1887 р. у с. Мліїв Черкаського повіту Л. П. Симиренко створив розплідник та сад, який став однією з найбагатших у світі садівницьких колекцій, яка нараховувала понад три тисячі сортів, форм та видів рослин. У 1888 р. у Вінницькому повіті почала функціонувати Уладово-Люлинецька дослідно-селекційна станція, у 1893 р. була заснована Білоцерківська дослідно-селекційна станція. У 1905 р. В. Є. Таїров заснував під Одесою «Виноробну станцію російських виноградарів та виноробів» (нині Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова). У 1908 р. професор П. В. Будрин заснував Харківську сільськогосподарську дослідну станцію (нині Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва – Національний центр генетичних ресурсів рослин України). У 1911 р. В. В. Таланов заснував Катеринославську (нині Синельниківську) селекційно-дослідну станцію, а С. П. Кулжинський – Носівську сільськогосподарську дослідну станцію Чернігівської губернії. У 1912 р. приват-доцент Новоросійського (нині ОНУ імені І. І. Мечникова) університету А. О. Сапєгін організував Одеську селекційну станцію (нині Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення).

7.1. Поняття про сорт. *Сорт* – це створена людиною для задоволення своїх потреб сукупність культурних рослин, що походять від одного або декількох родоначальників і володіють відносно однаковими, спадково закріпленими ботаніко-біологічними і господарськими ознаками і властивостями, які дозволяють в конкретних природних і виробничих умовах отримувати високі і стійкі врожаї продукції необхідної якості. Отже, сорт – складне поняття. Сорти утворюються внаслідок людської праці, вони є лише серед культурних рослин, однак, шляхом тривалого опрацювання з диких форм можливо виділити цінні генотипи. Людина створює і обробляє сорти для отримання певного продукту, з метою задоволення своїх потреб, тобто, сорт є одним з основних засобів сільськогосподарського виробництва. Сорт – це поняття господарське, але разом з тим і біологічне, адже це група живих рослин, що мають певні, притаманні даному сорту ознаки і властивості, спадково обумовлені та константні. При втраті цих ознак, обробіток сортів стає безглуздим.

Місце сорту в систематиці рослин. Згідно з доповіддю Королівського ботанічного саду в Единбурзі у 2016 р. нараховувалося трохи менше 400 тис. видів рослин, понад 21 тис. видів знаходилася під

загрозою зникнення. Саме з метою збереження пулів генів, необхідних для подальшої селекції рослин, і створюються національні та міжнародні установи по збереженню генетичних ресурсів рослин.

Для пізнання та використання наявної різноманітності рослин потрібна їх класифікація. Таку класифікацію у XVIII ст. створив К. Лінней, основною одиницею якої є вид. У допрацьованому вигляді вона існує і донині. Вид нині розуміють як репродуктивний ізолят з власним генофондом, відмінним від інших видів (репродуктивних ізолятів). Особини одного виду схожі між собою, легко схрещуються і дають плідне потомство. Вони пристосовані до життя в певних умовах і внаслідок цього займають певний ареал (район поширення). Система зав'язків між видами та їх основними угрупуваннями (тип, клас, порядок, родина, рід) спирається на філогенетичні зв'язки між ними, з'ясовані за допомогою різних методів (морфологічних, анатомічних, фізіологічних, цитогенетичних, молекулярно-генетичних).

З численних одиниць, що пропонувалися для позначення внутрішньовидових таксонів у культурних рослин, найбільш прийняті наступні:

підвид – *subspecies*,
група різновидів – *convarietas*,
різновид – *varietas*,
підрізновид – *subvarietas*,
сортотип – *concultivar*,
сорт, або культивар – *cultivar*.

Ботанічний різновид (*varietas*) являє собою поєднання певних генеративних ознак, легко відмітних і зручних для систематики і апробації. Ознаками різновидів є характерні спадкові морфологічні ознаки, за якими встановлюється приналежність рослин до даного різновиду. Наприклад, при визначенні різновидів м'якої пшениці використовують п'ять ознак: забарвлення зерна, опушення і забарвлення колоскових лусок, наявність остюків і їх забарвлення. Так, рослини м'якої пшениці різновиду лютесценс мають червоне зерно, неопушені колоскові луски і білий безостий колос.

Крім різновидів у деяких культур виділяють ще підрізновиди, наприклад, у гороху посівного їх виділяють за формою і розміром насіння, забарвленням насіннєвий шкірки, сім'ядоль і насіння, а також забарвленні рубчика.

Споріднені сорти рослин, які мають схожі господарські і біологічні ознаки, для зручності вивчення і інвентаризації об'єднують в групи – сортотипи. Наприклад, сорти гібридної (мінливої) люцерни по морфологічним ознакам і біологічним властивостям об'єднані в чотири сортотипи – синегібридний, сине-строкатогібридний, строкатогібридний, жовтогібридний. В межах сортотипу відрізнити сорти люцерни досить важко, бо в результаті перехресного запилення вони представляють собою популяції, що містять ряд перехідних форм. Арахіс – за формою куща, формою і величиною бобів, величиною, формою і забарвленням насіння та тривалістю вегетаційного періоду ділиться на чотири сортотипи: іспанський, покращений іспанський, теннессі і валенсія. Айстри розділено на зрізні, обсаджувальні та універсальні сортотипи. Універсальні та зрізні сорти мають високе стебло та великі суцвіття, а обсаджувальні – низький або карликовий ріст та велику кількістю одночасно квітучих суцвіть на рослині.

Еколого-географічна систематика культурних рослин. Ботанічна систематика дає знання про подібність, відмінності та походження таксономічних одиниць, але для практичної селекції і насінництва їх недостатньо. Необхідне знання не лише видового складу культури та її різновидів, але й диференціації її за біологічними особливостями, з якими пов'язане пристосування рослин до різних умов зростання.

Рослини, що відносяться до одного і того ж ботанічного різновиду, але різного географічного походження можуть різко відрізнятися по стійкості до посухи, низьких температур, ураження хворобами і ушкодження шкідниками, а також за біохімічними властивостями. З іншого боку, рослини двох форм можуть ставитися до різних різновидів, але характеризуватися подібними біологічними особливостями. У зв'язку з тим, що в природі є біологічні відмінності між формами рослин в межах одного виду, в селекції існує важливе поняття – екологічний тип або екотип. Екотип (від грец. eikos – будинок, житло; tipos – місце) – це відносно стійка за анатомо-морфологічними і фізіологічними особливостями форма даного виду, властива певним ґрунтово-кліматичним умовам і пристосована відбором до існування в цих умовах. Тобто екотип – це екологічна одиниця рослинного світу, яка об'єднує близькоспоріднені групи рослин, приурочені до якогось місцезростання і мають внаслідок цього певні пристосувальні ознаки. Наприклад, північна і південна форми стоколосу безостого – два ок-

ремих екотипи цього виду, вони істотно розрізняються по біологічним властивостям.

Відомі три загальних важливих екотипи: ксерофіт – рослинна форма, пристосована до посушливих умов існування, гігрофіт – форма, пристосована до існування в умовах надлишкового зволоження, і мезофіт – форма, пристосована до умов середнього зволоження.

Характеристика рослинних форм, встановлення ступеня їх подібності і відмінностей за багатьма біологічними особливостями дається в результаті їх еколого-географічної диференціації (угруповання). Різні географічні форми рослин завжди ростуть в різних умовах і пристосовуються до них шляхом відбору як певні екологічні форми. Тому географічні форми можуть одночасно розглядатися як екологічні.

М. І. Вавилов встановив певні закономірності в диференціації видів на еколого-географічні групи або типи. Кожна еколого-географічна група характеризується схожими для всіх культур ознаками, сформованими під впливом добору в одних і тих же природно-географічних умовах. Схема внутрішньовидової систематики культурних рослин, заснована на еколого-географічних принципах, наступна: вид → еколого-географічні типи → ботанічні різновиди → форми і сорти. Згідно з цією схемою сорт постає як завершальна, далі неподільна ланка в цій системі. Але згідно з численними дослідженнями сорт являє собою складну біологічну систему, що складається з декількох біотипів.

Біотипи слід сприймати як групи рослин в межах сорту, які розрізняються між собою по ряду біологічних властивостей, морфологічних і господарських ознак. Виникнення біотипів – природний процес екологічного диференціювання сортів, рослини якого знаходяться в різноманітних взаємних зв’язках з факторами навколишнього середовища, включаючи агротехнічні.

Характер внутрішньосортової біотипової мінливості у різних сортів неоднаковий: особливо сильно біотипове розмаїття виявляється у сортів гібридного походження. Внутрішньосортова мінливість непереборна в будь-якому селекційному сорті, оскільки вона є його відповіддю на коливання зовнішніх умов. При цьому біотиповий склад сорту не залишається постійним, він змінюється в залежності від умов зростання.

За рахунок диференціації на біотипи і зміни співвідношення їх в мінливих погодних умовах сорт набуває адаптаційну *пластичність*,

тобто здатність в будь-яких місцевих умовах давати стабільну врожайність (або зберігати іншу цільову ознаку).

В залежності від походження розрізняють місцеві та селекційні сорти. Місцеві сорти – це сорти народної селекції, які виникли в даному регіоні внаслідок тривалого обробітку та пристосовані до характерних для даної зони умов. Більшість місцевих сортів не вирівняні, якість їх продукції часто невисока і вони не пристосовані до механізації.

Розрізняють наступні *типи сортів*:

1. Чистолінійні сорти, які є нащадками одної, первісно відібраної самозапилюваної рослини (лінія).

2. Сорти гібридного походження, створені шляхом добору стійких рослин з цінними ознаками; вони не мають високого ступеня вирівнювання, але стійкі. Більшість сучасних сортів відноситься до цього типу.

3. Багатолінійні сорти – сорти самозапилювальних рослин, створені шляхом об'єднання декількох однотипних ліній. Вони мають високу пластичність та добру адаптивність.

4. Сорти-клони – сорти вегетативно розмножуваних рослин, які представляють собою клони. Мають високий ступінь вирівнювання, константні.

Крім сортів використовують також гібриди – рослини (насіння), отримані шляхом схрещування спеціально добраних батьківських форм, які мають посилений розвиток певних ознак і властивостей; використовуються лише в першому поколінні.

Сорти плодових і декоративних культур представляють собою зазвичай сорти-клони. За походженням це складні гібриди, але створений селекціонером гібрид в подальшому розмножують вегетативно, завдяки чому стабільно зберігають властиві даному сорту ознаки.

При насіннєвому розмноженні такі сорти зазвичай не відтворюються, а виходить велика різноманітність рослин, переважно не культурного типу. Однак є деякі сорти кісточкових, у яких сорт відтворюється при насіннєвому розмноженні. Це зазвичай місцеві стародавні сорти, що виникли в процесі розмноження посівів насіння, наприклад, середньоазіатські сорти абрикосів, місцеві дагестанські персики.

Комплекс ознак, за якими один сорт відрізняється від іншого, називається сортовими ознаками. У якості сортових ознак обирають такі, що зовні добре визначаються, константні. В першу чергу це

морфологічні ознаки, цільові властивості, а також реакції на біотичні та абіотичні чинники довкілля, різноманітні молекулярні маркери.

7.2. Загальна схема селекційного процесу. Рушійними факторами селекції, так само як і еволюції, є мінливість, спадковість і відбір. Однак результативність цих факторів в селекційній роботі значно вище, ніж в природі. Селекціонер, знаючи характер успадковування цінних ознак і використовуючи різні методи гібридизації, підбираючи батьківські пари з необхідним набором ознак, при застосуванні методів посилення мінливості рослин за допомогою мутагенів, може не тільки багатократно підсилити мінливість організмів, а й направити її в потрібну сторону.

Важливою особливістю селекції є провідна роль штучного добору, якій здійснюють на фоні природного добору. Використовуючи точні методи оцінки, виділення потрібних рослин, застосування різних способів їх розмноження, ізоляції від інших, менш цінних зразків, можна значно підвищити ефективність штучного добору. Часто напрями природного і штучного добору не співпадають. Особливо яскраво це виражене в селекції овочевих рослин: намагання людини отримати рослини з крупними та високопоживними органами для використання у харчуванні протирічить загальнобіологічним властивостям рослин. Теж саме можна казати й про декоративні властивості рослин, які часто сполучені зі зниженням адаптивних властивостей рослини, наприклад махровість квіток часто сполучена зі стерильністю.

Комплекс заходів, виконуваних селекціонером від початку роботи до створення селекційного матеріалу, який в якості нового сорту може бути включений в станційне і потім у державне сортовипробування, називають селекційним процесом. Виконання всіх таких заходів вимагає великих витрат коштів і особливо часу. Часто реальні результати праці отримують лише через 15-20 років після початку роботи, особливо, якщо мова йде про багаторічні рослини, які вегетативно розмножуються і пізно вступають в пору плодоношення (груша, яблуня) або перехреснозапильні рослини з дво-, трирічним циклом розвитку, які розмножуються насінням (цибуля, капуста, буряк, морква). При селекційній роботі з самозапильними рослинами, які розмножуються насінням (томат, горох, салат) для виведення сорту необхідно близько семи-десяти років; дещо менше – при роботі з рослинами, які вегетативно розмножуються і рано вступають в пору плодоношення (малина, смородина, суниця).

На початку роботи селекціонер визначає, з якими властивостями і ознаками необхідно створити сорт з урахуванням кліматичних умов; потім добирає, або, використовуючи різні методи, сам активно створює вихідний матеріал. На основі ретельного вивчення проводиться відбір окремих рослин з потрібними цінними ознаками, відповідними завданням селекції. Відібрані рослини та їх нащадків висівають і ретельно вивчають окремо-індивідуально. На основі такого вивчення відбирають і розмножують кращих нащадків, все інше відбраковується. З цих кращих нащадків, що мають потрібні цінні ознаки, й відбирають і формують новий сорт, який представляють на районування та реєстрацію. Нові сорти випробовують у різних зонах країни на спеціальних сортовипробувальних ділянках. Кращі сорти рекомендують для виробничого обробітку – районують та вносять до державного реєстру.

7.3. Етапи селекційного процесу. Селекційний процес складається з наступних етапів:

1 етап: створення виробничого завдання на сорт;

2. етап: збір, створення та вивчення вихідного матеріалу;

3 етап: добір окремих кращих рослин;

4 етап: індивідуальна сівба кращих рослин та розмноження нащадків відібраних рослин;

5 етап: оформлення кращих селекційних зразків як нового сорту;

6 етап: сортовипробування і районування.

Виробниче завдання на сорт – це перелік основних ознак і властивостей, якими має володіти сорт. При розробці виробничого завдання враховуються запити та потреби виробництва, причому в перспективі, до моменту створення сорту, враховуються природні, агротехнічні, екологічні умови передбачуваної зони обробку, умови механізації.

Вихідним матеріалом називають форми культурних і диких рослин, які використовуються для створення нових сортів і гібридів. Вихідний матеріал – це сировина для створення нових сортів. Чим багатше вихідний матеріал, більше у нього потрібних цінних ознак, тим легше робота селекціонера, тобто тим багатше у нього вибір. Вихідний матеріал для плідного використання необхідно вивчити, виявити і перевірити у нього потрібні цінні ознаки, треба врахувати що «цінність» вихідного матеріалу багато в чому залежить від екологічних і агротехнічних даних.

Вихідним матеріалом для селекції служать:

– існуючі в природі форми рослин (місцеві сорти, селекційні сорти, дикорослі форми, колекції генетичних ресурсів рослин селекційних установ, ботанічних садів, центрів генетичних ресурсів рослин окремих країн та міжнародних установ);

– нові форми рослин, створені шляхом акліматизації, мутагенезу та гібридизації.

У кожному регіоні є так звані місцеві сорти культурних рослин, що виникли в результаті тривалого обробітку, це цінний вихідний матеріал для селекції. Такі рослини добре пристосовані до місцевих умов і мають окремі видатні цінні ознаки. Місцеві форми відіграли й відіграють велику роль при створенні нових сортів. Наприклад, кращі американські пшениці були створені за участю інорайонних сортів. Матеріал з інших зон є цінним вихідним матеріалом для створення нових сортів, і тому селекціонер мобілізує і вивчає величезний матеріал, в першу чергу з країн з подібними природними умовами.

Збирання вихідного матеріалу здійснюють виписуванням його з центрів генетичних ресурсів рослин, ботанічних садів, шляхом обміну з іншими науковими установами, здійснення експедицій для виявлення і збору вихідного матеріалу. При цьому необхідно дотримуватися карантинних заходів та заходів з охорони природи.

Весь вихідний матеріал селекціонер вирощує і ретельно вивчає на окремої ділянці – розпліднику вихідного матеріалу. Сівбу здійснюють без повторності, обліки ведуть окомірно.

7.4. Методи створення вихідного матеріалу. Акліматизація – це пристосування організмів до нових незвичайних умов. Акліматизації передує репродукція, тобто перенесення рослини в нові умови з метою обробітку; в деяких випадках сорт приживається в нових кліматичних умовах, успішно обробляється і дає нормальний урожай продукції нової якості. Відбувається *натуралізація сорту*, це явище досить рідкісне, спостерігається при перенесенні зі схожих умов для збагачення нашого сортаменту. Однак, частіше все ж потрібна акліматизація сорту, тобто пристосування до нових умов на основі зміни завезеного сорту. В цьому випадку завезений сорт фактично є вихідним матеріалом, і на його основі створюються нові сорти. Велика заслуга у розробці та дослідженні методів акліматизації належить І. В. Мічуріну.

Важливим методом створення вихідного матеріалу є індукований мутагенез. Мутації бувають шкідливими, нейтральними та корисними. Частота природних мутацій вкрай мала, в еукаріотичних організмів вона складає 10^{-6}, тому спонтанний мутагенез не дає хорошої бази для селекції. Це викликало необхідність розробки методу індукованого мутагенезу. Як мутагени в селекції рослин використовуються іонізуючі випромінювання і хімічні речовини. Так, Л. М. Делоне і А. А. Сапегін в 1920-30-х рр. зробили спробу застосувати індукований іонізуючою радіацією мутагенез в селекції зернових культур і отримали перші радіомутанти пшениці. Негативним моментом цього методу є те, що радіація дає значний відсоток грубих хромосомних ушкоджень, що призводять до загибелі рослин. Застосування хімічних мутагенів в селекції пов'язано з ім'ям І. А. Рапопорта. Він і його учні застосували в селекції рослин такі мутагени, як нітрозометіл- і нітрозоетілсечовину, діазоацетілбутан та інші речовини, що викликають високу частоту мутацій, але, на відміну від іонізуючих випромінювань, дають менше грубих хромосомних пошкоджень. За допомогою хімічних мутагенів створено форми вівса ярового, соняшнику, бавовнику, білого і жовтого люпину, конопель, рису, суниці.

Вищевикладене стосується насамперед генних мутацій. Однак в селекції широко використовуються і така форма геномних мутацій, як поліплоїдія. Авто- та алополіплоїдія є звичайним способом видоутворення у рослин. Існують широтні і вертикальні градієнти: при просуванні у бік полюсів або вверх у гори зростає кількість поліплоїдних видів. Поліплоїди є цінним матеріалом для селекції. Їх клітини більш крупні, а органи – більш соковиті та м'ясисті. Вони мають підвищену адаптивність та пластичність. Часто поліплоїдія виникала при окультуренні рослин. Так, пшениця-однозернянка – диплоїд, полба (яку просив Балда у попа) – тетраплоїд, а сучасна пшениця, з якої випікають хліб, – гексаплоїд. Тут ми бачимо виникнення типового поліплоїдного ряду в процесі окультурення пшениці. Поліплоїдію також використовують у селекції для відновлення плодючості віддалених гібридів (див. праці Г. Д. Карпеченко). Поліплїди отримують внаслідок обробки рослин (головним чином їх меристем) мітотичною отрутою – алкалоїдом колхіцином.

Гібридизація – це найбільш ефективний сучасний метод отримання вихідного матеріалу. Більшість сучасних сортів створені поєднанням гібридизації для одержання вихідного матеріалу і відбору ро-

слин з господарсько-цінними властивостями. Цінність його полягає у наступному:

1. Можливість отримати рослини, які поєднують цінні ознаки двох або більше вихідних форм, тобто вдається вести синтетичну селекцію.

2. Можливість отримати, особливо при віддаленій гібридизації, організми з принципово новими ознаками. Зокрема, селекція на стійкість до біотичних та абіотичних факторів довкілля базується на інтрогресивної гібридизації – різновиді віддаленої гібридизації, за якої гени стійкості до хвороб, шкідників, зимо-, морозо-, посухостійкості переносяться до генофонду культурних рослин від їх диких співродичів.

3. Можливість отримувати пластичні організми, у яких можна спрямовано підсилювати цінні цільові ознаки.

4. Можливість використовувати гетерозис.

7.5. Явище гетерозису. Генетичні механізми гетерозису. Гетерозис – це властивість гібридів першого покоління перевершувати за біологічними і господарсько-корисними ознаками вихідні батьківські форми. Вперше явище гетерозису було описано І. Кельрейтером на прикладі міжвидового гібрида, який він отримав в 1760 р., схрестивши два види махорки. Цей рослинний гібрид виявився стерильним на зразок мула, і автор назвав його «першим рослинним мулом». Науковий термін *гетерозис* з'явився набагато пізніше. Його запропонував Дж. Шелл в 1914 р. для позначення потужності гібридів і відтоді він міцно увійшов в наукову літературу як синонім старої назви «гібридна сила». У теперішній час з'ясовано, що гетерозис проявляється не лише при розведенні тварин і птахів, але і при селекції рослин та мікроорганізмів. Отже, це загальнобіологічне явище.

Про причини виникнення гетерозису існує кілька гіпотез. В основі *гіпотези домінування* лежить ідея сприятливої дії домінантних генів. Вважають, що при схрещуванні утворюється комбінація сприятливих неалельних домінантних генів, які одночасно придушують шкідливі рецесивні алелі, які у різних ліній, а тим більше сортів, знаходяться в різних локусах. Прояв гетерозису можливий також і за рахунок епістазу, коли окремі епістатичні гени придушують не тільки алельні рецесивні, але й неалельні домінантні (гіпостатичні) гени. Однак, якщо виходити з даної гіпотези, то гетерозигота *Aa* за продуктивністю буде в тій чи іншій мірі наближатися до гомозіготи *AA*, але

ніяк не перевищувати її. Однак в практиці давно встановлено, що гетерозигота може перевершувати за потужністю не тільки рецесивну батьківську форму, але і домінантну. Це явище отримало в генетиці навіть спеціальну назву – *наддомінування* або *моногенний гетерозис*.

З точки зору *гіпотези наддомінування* прояв гетерозису обумовлений відмінностями членів однієї пари алелів у гібридних організмів як результат схрещування відмінних вихідних батьківських форм. Поєднання при гібридизації різноякісних гамет батьків стимулює більш швидке зростання гетерозиготних гібридів, їх кращий розвиток тощо. У той же час гомозиготність батьків пригнічує життєздатність потомства, що виражається формулою $AA < Aa > aa$. Так, С. Даскалов отримав гібридну могутність у томатів, які відрізнялися від батьківських форм гетерозиготністю по єдиній (летальній у гомозиготі) хлорофільній мутації *xantha*.

З точки зору *гіпотези генетичного балансу* явище гетерозису не можна пояснити дією якоїсь одної генетичної причини – це сумарний ефект. Гіпотеза генетичного балансу, приймаючи положення раніше висловлених гіпотез, більше уваги приділяє взаємовпливу неалельних генів, фізіологічних і біохімічних факторів, а також зовнішнього середовища взагалі, умов вирощування гібридів зокрема. Особлива увага надається впливу цитоплазми. Передбачається, що плазматичні відмінності між гаметами повинні стимулювати життєві процеси у гібридного організму. Збалансованість систем генів робить популяції найбільш пристосованими і продуктивними в конкретних умовах довкілля.

Згідно з *біохімічною гіпотезою гетерозису* схрещування приводить до збільшення гетерозиготності по мутаціям, які регулюють синтез білка, внаслідок чого прояв гетерозису відбувається за рахунок збагачення біохімічних процесів в клітинах та тканинах гібридного організму.

Всі ці гіпотези не можна вважати єдино правильними. Можливо, кожний із зазначених механізмів грає певну роль у становленні гетерозису. Поєднати всі ці гіпотези в межах однієї загальної спробував В. О. Струнников, який запропонував *гіпотезу компенсаційних комплексів генів*. Автор вважає, що такий компенсаційний генний комплекс виникає в особин популяції у відповідь на мутацію, що зменшує життєздатність і практично компенсує негативний вплив цієї мутації. За схрещування двох інбредних ліній, кожна з яких містить свій компенсаційний комплекс, гібрид отримує два набори генів, нівелюючих

негативні ефекти гомозиготності. Наслідком сумісної дії генів двох компенсаційних комплексів є підвищення життєздатності та інших властивостей гібридних форм, що виявляється в явищі гетерозису.

Гетерозис – явище короткочасне, яке проявляється найбільш чітко лише в першому поколінні схрещування. Гібриди при їх подальшому розведенні не утворюють подібних собі гетерозисних нащадків. Гетерозис не можна закріпити спадково, його потрібно щоразу отримувати заново. Вважають, що угасання гетерозису в наступних поколіннях є результатом рекомбінаційних втрат.

А. Густафсон виділив декілька типів гетерозису у рослин, а саме:

1) *репродуктивний гетерозис*, який виявляється підвищеною плодючістю, збільшенням урожайності сільськогосподарських культур;

2) *соматичний гетерозис*, який супроводжується підсиленим розвитком і ростом, збільшенням вегетативної маси рослин;

3) пристосувальний або *адаптивний гетерозис*, який виражається у підвищенні загальної життєздатності і стійкості до несприятливих умов.

7.6. Гібриди, що застосовуються в селекції. В селекційній роботі застосовують різні типи гібридів:

звичайні – схрещування в межах одного виду (сорт х сорт, різновидність х різновидність);

віддалені – вид схрещують з іншим видом того ж або спорідненого роду (пшенично-житні, яблучно-грушеві, аргус-смородинові, ожино-малинові тощо).

За кількістю використовуваних батьківських форм:

звичайні – А х В;

потрійні (ступінчасті) – А х В → АВ х С → АВС.

За напрямом схрещування розрізняють гібриди прямі (А х В) і зворотні (В х А), які створюють систему реципрокних схрещувань. Широко використовуються також насичуючі схрещування (беккроси), які дозволяють перенесення окремих ознак одного з батьків в генофон іншого: А х В → АВ х В → АВВ х В і т. д. Батьківська форма, яка використовується для повторного запилення гібридів (в наведеному прикладі В) називається рекурентним батьком.

Успіхи гібридизації в селекції, отримання нащадків з бажаними ознаками визначається вдалим добором батьківських форм. Це скла-

дна справа, для її вирішення немає сталих рецептів, але виявлені певні закономірності.

1. Для отримання гібридних нащадків з комплексом цінних ознак слід підбирати батьківськи форми з максимумом цінних ознак і мінімумом ознак негативних. При цьому ознаки мають перекриватися і доповнювати одна одну.

2. Для схрещування широко застосовують підбір екологічно віддалених форм, які мають комплекс цінних ознак.

3. Для отримання скоростиглих форм можна застосовувати підбір батьківських пар на основі стабільності розвитку.

4. Підбір по елементам структури урожаю.

Після створення гібрида основним завданням є виділення і відбір окремих цінних рослин з комплексом необхідних ознак, родоначальників створюваного сорту. З цією метою застосовують два способи: метод пересівань і метод роздільного посіву кожної рослини.

При методі пересівань отриманий гібрид в декількох поколіннях пересівають і розмножують, при цьому йде розщеплення, тобто поява в потомстві рослин з різним поєднанням ознак, при цьому з'являються і окремі константні рослини. В 4-му або 5-му поколінні проводять відбір окремих рослин з потрібними, цінними ознаками. Відібрані рослини в подальшому висівають, розмножують і вивчають індивідуально (на окремих ділянках), якщо їх цінні якості підтверджуються, потомства цих рослин використовують як родоначальників для створення сорту.

При методі роздільного посіву кожної рослини отримують гібрид, потім перше покоління, друге і в цьому поколінні проводять добір цінних рослин, потомство яких вирощують роздільно, такі добори повторюють до отримання потрібних цінних потомств. Це складніше, але дає більш швидкі результати.

7.7. Методи добору. Добір складає основний метод селекційної роботи. В основі добору лежить мінливість організмів, тобто можливість появи або штучного отримання особин зі зміненими новими ознаками. Разом з тим, в основі добору лежить спадковість – здатність зберегти і відтворювати у потомства виникли зміни; збереження і використання корисних генотипових змін, що виникають. Добір не є механічним виділенням і збереженням отриманих форм рослин, при доборі за якоюсь ознакою посилюється мінливість, прискорюється виникнення нових форм, і тому добір відіграє творчу роль. При про-

веденні добору селекціонер відповідно до поставлених завдань виявляє, виділяє і окремо розмножує рослини з цінними потрібними ознаками. При цьому добір селекціонер здійснює по окремим, найбільш цінним, «цільовим» ознаками. Однак, при цьому треба враховувати весь комплекс ознак, добір за окремими ознаками неминуче дає негативні результати, тому що при цьому інші ознаки виявляються незадовільними. Наприклад, ще Вільморен (середина XIX ст.) вивів цукровий буряк з 35 %-м вмістом цукру, але інші ознаки виявилися незадовільними. Це був типовий продукт одностороннього добору, як і гілляста пшениця, багаторічне жито тощо.

Селекційна робота з добору ведеться на польових ділянках – розсадниках, виділені при доборі окремі рослини – це елітні рослини.

У селекційній практиці застосовуються два основні методи добору: масовий та індивідуальний.

Масовий добір – це добір особин по фенотипу, тобто за фенотиповим проявом позитивних ознак, без перевірки генотипу. Масовість означає не кількість особин, що відбираються, оскільки господарсько-цінні ознаки можуть бути лише в однієї або декількох особин в популяції, а добір без урахування прояву ознаки у нащадків кожної окремої пари. Фенотиповий прояв ознаки в ряді випадків більшою мірою залежить від генотипу (тип розвитку; форма, остисте колосся у злаків та ін.), але нерідко варіабельність ознаки обумовлена коливаннями факторів довкілля (висота рослин; розмір колоса, число колосків у колосі злаків тощо). Щоб масовий добір був ефективним, необхідно враховувати частку мінливості генотипу в загальній фенотиповій мінливості.

Фенотипова варіанса σ^2_p складається з суми генотипової та середовищної варіанс (σ^2_G і σ^2_E):

$$\sigma^2_p = \sigma^2_G + \sigma^2_E.$$

Відношення частки генотипової мінливості до загального рівня фенотипової мінливості становить *коефіцієнт успадковуваності*:

$$h^2 = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_G + \sigma^2_E}$$

Коефіцієнт успадковуваності виражається у відсотках і відображає ту частку фенотипової мінливості ознаки, яка обумовлена мінливістю генотипу. Отже, по h^2 можна судити про запас спадкової мінливості даної ознаки. Якщо h^2, наближається до 100 %, фенотипова різноманітність визначається в основному відмінностями особин за ге-

нотипом. У цьому випадку добір доцільний, оскільки він є по суті добором генотипів. Якщо коефіцієнт успадковуваності наближається до нуля, це свідчить про майже повну генотипову схожість особин. Фенотипова різноманітність в даному випадку є результатом дії факторів зовнішнього середовища і є модифікаційною. Отже, добір безперспективний.

При здійсненні масового добору з вихідного матеріалу проводять добір значної кількості елітних рослин, нащадків цих рослин в подальшому об'єднують та вивчають і розмножують. Перший добір елітних рослин виконують у розпліднику вихідного матеріалу. Зазвичай відбирають від кількох сотень до декількох тисяч рослин. Відібрані рослини додатково вивчають в лабораторії, і потомство кращих з них об'єднують. Наступним кроком є вирівнювання і вивчення потомства першого добору. Поруч висівають стандарт і вихідний матеріал. Якщо таке вивчення покаже, що отримані рослини мають потрібні цінні ознаки, їх потомство розмножують і ретельно вивчають на невеликих ділянках. Якщо якість підтверджується, то оформляють новий сорт і подають на сортовипробування. Зазвичай добір не дає добре вирівняне потомство, тому роблять повторний добір і роботу продовжують зазначеним способом, при необхідності добори повторюють. Масовий добір нескладний за технікою виконання і доступний.

Недоліком масового добору є знеособлювання потомства відібраних рослин, тому немає можливості перевірити по нащадкам і точно виділити краще потомство і вибраковувати гірші.

Іноді масовий добір ведеться не безпосередньо за селекційною ознакою, а за так званим маркером, тобто ознакою, тісно зчепленою з селекційною. Часто добір за фенотипом призводить до несподіваного результату: в потомстві господарсько-цінна ознака не виявляється або значно ослаблена. У такому випадку доцільно вдаватися виключно до *індивідуального добору*, що дозволяє оцінити якості особини по нащадкам. Вивчаючи успадковування ознаки в ряду поколінь, можна оцінити генотип особини і здатність її передавати ознаки нащадкам. При проведенні індивідуального добору у рослин популяцію зазвичай поділяють на чисті лінії за допомогою інбридингу. При цьому добір ліній ведеться за бажаними ознаками, а інші лінії вибраковуються. Чисті лінії після інбридингу і добору, в результаті яких підвищується концентрація цінних генів у нащадків, стають матеріалом для подальшої селекції.

На першому етапі роботи в розпліднику вихідного матеріалу відбирають кращі рослини. Відібрані рослини додатково вивчають в лабораторії і кращі з них висівають індивідуально на окремих ділянках для подальшої роботи. Це другий етап – вивчення і розмноження потомства обраних рослин; як і при масовому доборі поруч для порівняння вирощують стандарт і вихідний матеріал.

Якщо такий добір дозволяє отримати потомство з потрібними цінними ознаками, таке потомство надалі розмножується також окремо, ретельно вивчається протягом кількох років, піддається комплексному випробуванню в порівнянні зі стандартом. Якщо цінні якості підтверджуються – оформляють сорт. Звичайний одноразовий добір дає ефект у самозапилювачів, у перехресників в потомстві гібридів отримати вирівняні рослини не вдається. Добір повторюють. У відібраних потомствах роблять повторний добір кращих рослин, який продовжують і в наступних поколіннях аж до безперервного.

Індивідуальний відбір у перехреснозапилюваних рослин представляє великі труднощі. Якщо вирощувати відібране потомство поруч одно з одним, між ними відбудеться перезапилення і ознаки їх змішаються. З іншого боку, кожне потомство можна вирощувати ізольовано, але при цьому відбудуться близькоспоріднені схрещування в межах потомства однієї рослини, що призведе до виродження. Для подолання цих труднощів застосовуються наступні методи добору у перехресників:

добір без ізоляції – відібрані потомства вирощують на сусідніх ділянках, але перед цвітінням проводять дуже сувору оцінку цих потомств і знищують погані потомства і погані рослини у відібраних (кращих) потомствах;

груповий метод – відібрані потомства ділять на групи з подібними цінними ознаками, кожну таку групу вирощують ізольовано від іншої; перезапилення відбувається в межах кожної групи.

Інколи для збереження цінних ознак корисно дуже строго обмежити перезапилення іншими рослинами, в цьому випадку потомство кожної рослини вирощують ізольовано від інших потомств. При цьому спостерігається певне пригнічення потомства, але властиві йому цінні ознаки швидко закріплюються.

У деяких культур добір можливий тільки після цвітіння. Наприклад, у огірка відбір ведеться за якістю зеленця. Першого року здійснюють добір, наступного – виділення насіння кожної відібраної рос-

лини. Встановлюють краще потомство, гірших бракують. На третій рік здійснюють розмноження і випробування кращих відібраних потомств. Робота ускладнюється, подовжується, але вдається швидше домогтися бажаних результатів.

Добір у дворічних рослин (морква, капуста, буряк тощо) в принципі ведеться так же, але подовжується вдвічі, оскільки його здійснюють по вегетативним органам (цибулина, коренеплід), а наступного року вирощують насіння.

Індивідуальний добір рослин, які розмножуються вегетативно – це добір клонів. Клон – це вегетативне потомство однієї рослини, отримане шляхом його поділу на частини. Наприклад, бульби одного куща картоплі або вкорінені листки одної рослини фіалки – це клон. Всі особини одного клону мають один і той же генотип. Після виконання добору еліт випробування клонів проводиться так само, як випробування потомств добору у самозапилювачів. Різниця полягає лише в тому, що замість генеративного розмноження відбувається вегетативне розмноження. А ось популяції для проведення добору можуть бути отримані різними шляхами.

Один шлях – використовувати природні популяції вегетативно размножуваних видів з чітко вираженою генетичною мінливістю. У таких популяціях є що відбирати, і добір та випробування еліт проводяться традиційно.

Інший шлях забезпечує здатність вегетативно розмножуваної культури розмножуватися й генеративно. Тоді для підвищення в неї генетичної різноманітності виконують звичайне схрещування і отримують генеративне (насіннєве) потомство. Потім у вирощеній з насіння популяції виконують клоновий добір.

Третій шлях отримання популяцій для здійснення добору у рослин, що вегетативно розмножуються, пов’язаний з мутагенезом. У клонах можуть виникати мутації (природні або штучні), після цього клонові рослини будуть складатися з генетично різних клітин і тканин, тобто стануть химерами. Генетично різні клітини і тканини клону розділяють різними методами (позбавляються химерності). Наприклад, домагаються розвитку всіх бруньок химерного організму, з них вирощують повноцінні рослини, серед яких будуть і мутантні. В отриманому після цього вегетативному потомстві виконують клоновий добір.

7.8. Селекційні оцінки та їх класифікація. Всі досліджувані в процесі селекційної роботи рослини, популяції, форми, зразки і навіть сорти прийнято називати селекційним матеріалом. Селекціонеру в роботі по створенню сортів постійно доводиться по-різному оцінювати селекційний матеріал з тих чи інших господарсько-важливих ознак і властивостей. В процесі селекції матеріал, що вивчається, оцінюють за його господарськими і біологічними властивостями на відповідність раніше розробленої моделі сорту. В ідеалі сорт повинен відповідати не окремим вимогам моделі, а їх комплексу.

Вивчення селекційного матеріалу полягає в оцінці ознак і властивостей досліджуваних рослин і зразків. Під оцінкою селекційного матеріалу розуміють облік у селекційних зразків різних господарсько-важливих ознак і властивостей, спостереження за їх проявом, їх безпосередню оцінку з використанням певних методів і засобів. Оцінка матеріалу проводиться зазвичай за такими загальнозначущими критеріями:

- певний ритм розвитку, відповідний ґрунтово-кліматичним умовам, в яких планується подальша експлуатація сорту;
- висока потенційна продуктивність при високій якості продукції;
- стійкість до впливу несприятливих наслідків фізико-хімічних факторів середовища (морозостійкість, зимостійкість, жаростійкість, посухостійкість, стійкість до різних видів хімічних забруднень);
- стійкість до впливу хвороб і шкідників (оцінка по імунітету);
- чулість до агротехніки при високій технологічності.

В процесі оцінки досліджувані селекційні зразки порівнюють між собою, з вихідними батьківськими формами, але головним чином – зі стандартом. Стандарт в селекції – це кращий з районованих в даній місцевості сорт досліджуваної культури, який приймається за контрольний варіант і служить свого роду масштабом або міркою порівняння і який показує цінність нових селекційних форм рослин.

Селекціонеру в роботі по створенню сорту постійно, на всіх етапах роботи, доводиться по-різному оцінювати селекційний матеріал за тими чи іншими господарсько-важливими ознаками і властивостями. На основі цієї оцінки підбирають батьківські пари для схрещування, відбирають або бракують гібридні, мутантні, поліплоїдні рослини і навіть популяції, а потім і виділені селекційні форми на всіх

етапах селекційного процесу – від вивчення вихідного матеріалу до конкурсного, екологічного і навіть виробничого випробування.

Оцінка селекційного матеріалу – дуже складна і трудомістка робота, одночасно доводиться оцінювати величезну кількість рослин і селекційних зразків, та ще й за багатьма ознаками і властивостями, часто при обмеженій кількості насіння. Тому доводиться застосовувати особливі методи досліджень і оцінок, особливі методики їх виконання. Селекційні оцінки запроваджують у всіх ланках селекційного процесу (крім розплідника гібридизації, завдання якого – отримання гібридного насіння). Оцінки ведуться на різних фонах, на всіх стадіях онтогенезу (як на рослинах, що вегетують, так і після збирання), оскільки різні ознаки проявляються в різних вікових станах. Оцінки провадять як органолептичним методом, так і за допомогою різних приладів і пристроїв, і охоплюють різноманітні ознаки і властивості рослин. Селекційні оцінки можна класифікувати по:

- місцю їх проведення;
- фону, на якому вони проводяться;
- засобам, за допомогою яких ця інформація добувається;
- ознаками і властивостями, які вони оцінюють.

За місцем проведення оцінки поділяються на польові та лабораторні. Польові оцінки проводять в поле, на плантації овочевих і ягідних культур, в саду, в теплиці, фітотроні, ростових камерах. Це оцінки рослин, які вегетують або вже завершили вегетацію, але ще не зібрані. До польових також відносяться:

- оцінки довжини вегетаційного періоду і окремих його частин (міжфазних періодів) шляхом фіксації дат настання фенологічних фаз росту і розвитку;
- частина оцінок стійкості до несприятливих абіотичних і біотичних факторів (є і лабораторні методи таких оцінок);
- оцінки властивостей, що обумовлюють технологічність вирощування і збирання (хоча і тут є лабораторні методи).

Польові методи дають найбільш надійні результати, оскільки матеріал оцінюється в природних умовах за прямими ознаками. Однак використання польових методів не завжди можливо. Наприклад, для оцінки морозостійкості необхідна морозна безсніжна зима; якщо ж в даному році такої зими не було, то матеріал залишається без оцінки. Точно так же оцінку на імунітет на тлі природного зараження можна проводити тільки в роки сильного поширення хвороби або шкідника.

Лабораторні оцінки проводять в лабораторії. До лабораторних відносяться оцінки врожайності та елементів її структури, якості продукції та інших властивостей. Лабораторні методи дозволяють змінювати градацію факторів середовища з волі експериментатора. Але нерідко застосування лабораторних методів оцінки селекційного матеріалу вимагає спеціального обладнання; наприклад, для вивчення морозостійкості потрібні морозильні камери з інтенсивними джерелами світла. Також є група оцінок, які рівною мірою ведуться і в полі, і в лабораторії (лабораторно-польові оцінки). Йдеться про опис морфологічних, а іноді і анатомічних особливостей селекційних зразків. Наприклад, у злаків особливості куща (компактний, розлогий), листових пластинок (широкі, вузькі, опушені, неопушені) та інші ознаки вегетативних частин описують в полі, а форму зерна, особливості суцвіття – в лабораторії. Лабораторно-польові методи поєднують достоїнства і недоліки власне польових і лабораторних методів.

В особливу групу виділяються провокаційні методи, за допомогою яких штучно створюється провокаційний фон, тобто умови для виявлення реакції рослин на несприятливі фізико-хімічні та біотичні фактори. Інтенсивність провокаційних методів повинна бути оптимальною. При занадто слабкому провокаційному фоні не гарантується прояв небажаної ознаки, а на занадто жорсткому тлі можуть бути відбраковані рослини, що є достатньою стійкими до дії даного чинника. До провокаційних методів відноситься створення інфекційного фону при селекції на стійкість до шкідників і хвороб. Цей напрям селекції є вкрай важливим і в той же час дуже важким. Оцінка матеріалу ведеться на всіх стадіях онтогенезу, оскільки різні ознаки проявляються в різних вікових станах. При цьому оцінку роблять або безпосередньо за досліджуваною ознакою (пряма оцінка), або за будь-якими непрямими показниками (ознаками, властивостями), пов’язаними з досліджуваним показником кореляційною залежністю (непряма оцінка). Так, при оцінці зимостійкості озимих злаків і багаторічних рослин найбільш важливою прямою ознакою служить загальний ступінь підмерзання в балах. У той же час зимостійкість можна оцінити, визначаючи вміст цукрів у клітинному соку. Даний показник є непрямим.

Оцінка за непрямими ознаками вважається менш точною, але в ряді випадків вона може бути зручною і навіть неминучою. Прямі оцінки об’єктивніші непрямих, а відповідність їх у більшості випадків неповна. Тому основним недоліком непрямих оцінок є їх недоста-

тня відповідність прямим. У той же час непрямі оцінки мають ряд переваг, тому їх нерідко використовують в селекційному процесі замість прямих. Так, якщо в даному сезоні було відсутнє пошкодження рослин несприятливими абіотичними факторами і пряма оцінка стійкості до них виявилася неможливою, можна скористатися непрямими оцінками. Наприклад, зима була теплою, тому пряма оцінка морозостійкості в поле виявилася неможливою. В цьому випадку у плодових культур можна визначити електропровідність гілок, яка дає уявлення про ступінь їх морозостійкості. Часто селекціонер вдається до непрямих оцінок через нестачу матеріалу, необхідного для проведення прямих оцінок.

Непрямі оцінки часто вигідно відрізняються від прямих швидкістю проведення. Непрямі оцінки іноді простіше і дешевше у виконанні, ніж прямі.

Селекційні оцінки можна класифікувати за властивостями, які вони повинні характеризувати. Це, власне, ті характеристики, якими повинен володіти сорт: врожайність і її структура, тривалість вегетаційного періоду і його частин, технологічність обробки та збирання, стійкість до несприятливих абіотичних умов, стійкість до хвороб, шкідників, якість продукції. До цього потрібно додати оцінки морфологічних особливостей зразків, а також деяких індексів. Морфологічні оцінки, які не пов’язані з перерахованими властивостями, роблять головним чином на заключному етапі оцінки потомств відібраних рослин. Вони потрібні для ідентифікації сорту в разі його патентоспроможності і для судження про чистосортність посіву, заснованому на обліку домішок у посіві сорту, які можна розпізнати по морфологічним відмінностям.

Всі оцінки в селекційному процесі становлять певну систему: в проведенні оцінок селекційного матеріалу існує послідовність, обумовлена логікою селекційного процесу. Для кожної його ланки встановлюється свій набір селекційних оцінок, їх точність, методи, прилади або інше обладнання. На перших етапах роботи, коли стоїть завдання з великої кількості різних форм виділити кращі рослини і зразки, оцінку матеріалу проводять тільки за основними ознаками та часто окомірно. Тут часто використовуються різні експрес-методи, мікрометоди. У міру зменшення кількості досліджуваних зразків і збільшення кількості насіння кожного зразка оцінка матеріалу стає більш складною, а саме: проводиться за більшою кількістю ознак і властивостей, більш ґрунтовними і точними методами, і обов’язково вико-

нується випробування на врожайність. Нарешті, на завершальному етапі селекції (конкурсне сортовипробування), де вивчається невелика кількість найкращих селекційних форм, оцінка селекційного матеріалу стає найбільш повною і всебічною, виконується за комплексом господарсько важливих ознак і властивостей і обов'язково – по врожайності. Таким чином, при випробуванні потомств елітних рослин від ранніх до пізніх ланок селекції зростає число і точність виконуваних оцінок.

7.9. Методика дослідної справи в селекції і насінництві. Селекційна робота забезпечує вивчення зразків і створюваних сортів, отже, отримані результати мають бути типовими і точними (тобто селекційний дослід має бути типовим і точним). Отримані на основі даного досліду результати повинні бути типовими, тобто достовірними для даних екологічних умов (природних, агроценозу, агротехніки). Отже, для досягнення типовості досліду його треба проводити в характерних для даної зони умовах, з дотриманням характерної агротехніки.

Точність досліду означає, що отримані результати мають бути обумовлені досліджуваним фактором, а не іншими випадковими подіями; в даному випадку результат має бути проявом відмінностей досліджуваних сортів. Найбільше на точність досліду впливає строкатість родючості ґрунту в розпліднику, в якому вивчається сорт.

Для підвищення точності досліду застосовують заходи для згладжування строкатості:

правильний вибір ділянки;

внесення високих доз добрив;

правильне розміщення ділянок з охопленням відмінностей родючості;

застосування повторності (це основний метод) – посів кожного досліджуваного сорту не на одній, а на декількох ділянках, які чергуються.

7.10. Методи біотехнології в селекції рослин. Все більшого значення в селекції рослин набувають методи біотехнології, які включають мікроклональне розмноження цінних елітних рослин, ембріокультуру і культуру меристем, культуру пиляків, клітинну селекцію на основі сомаклональної та гаметоклональної мінливості, соматичну гібридизацію протопластів тощо. Суттєвою ознакою біотехно-

логічних методів, використовуваних в селекції рослин, є маніпуляції *in vitro*.

Основні завдання, які вирішуються за допомогою методів біотехнології в селекції і насінництві наступні:

- створення нового вихідного матеріалу і розширення генетичного базису для селекції рослин;

- збереження і розмноження *in vitro* селекційно цінних елітних рослин і ліній, кріозбереження вихідного рослинного матеріалу;

- прискорення селекційного процесу за рахунок швидкої гомозиготизації генотипу після проведення схрещування або отримання самозапилених ліній при селекції гетерозисних гібридів, скорочення ряду селекційних розсадників;

- підвищення ефективності відбору цінних генотипів за рахунок цілеспрямованої інтрогресії генів, зниження негативного впливу «генетичного вантажу» популяції і підвищення її селекційної цінності, постійного контролю за наявністю цінних генотипів у селекційному матеріалі, що відбирається;

- зниження трудомісткості селекційних робіт за рахунок зменшення популяцій для відбору і скорочення ряду селекційних розсадників;

- оздоровлення посадкового матеріалу від вірусів і деяких хвороб.

Широке практичне застосування в селекції, насінництві та різних галузях рослинництва має сьогодні метод стерильної культури тканин і клітин (культура *in vitro*), зокрема, при виробництві безвірусного насіннєвого і посадкового матеріалу. Розроблено метод понад півстоліття тому, він дозволяє нескінченно розмножувати одну єдину рослину шматочками її стебла, бруньки тощо. Цим методом вдається вирішити комплекс завдань наступних напрямів:

- розширення генетичного базису селекції рослин шляхом отримання нового вихідного матеріалу:

- збереження і розмноження цінних елітних рослин і ліній;

- отримання і збереження безвірусного матеріалу сільськогосподарських культур.

Найсучаснішими методами біотехнології є методи генетичної і генної інженерії. Генетична інженерія – це використання комплексу генетичних, клітинних, молекулярно-генетичних методів при створенні рослинних організмів з необхідними людині властивостями. У тому випадку, коли маніпуляції здійснюються на рівні окремих генів

або їх фрагментів, кажуть про генну інженерію. Генетична інженерія, в широкому її розумінні, здійснюється на рівні популяцій, організмів, тканин, клітин, плазмід, хромосом, генів і навіть їх окремих частин (тобто на молекулярному рівні). Якщо методи генетичної інженерії на рівні популяцій і організмів розроблені в селекції рослин досить давно, то в сучасній селекції стали використовуватися методи генетичної інженерії на рівні клітин, хромосом і навіть генів.

8. Генетична інженерія рослин

Традиційні методи селекції, засновані, головним чином, на статевий гібридизації та доборі, дозволяють отримувати нові цінні генотипи рослин. На їх основі створено більшість сучасних сортів і гібридів. Однак, для підвищення стійкості сортів і гібридів до біотичних і абіотичних стресів, надання їм принципово нових властивостей необхідно використовувати методи, засновані на трансгенних технологіях.

Застосування технологій генної інженерії робить пошук більш цілеспрямованим і значно розширює можливості маніпулювання генетичним апаратом. Важлива перевага рослин у порівнянні з тваринами – можливість отримання цілої рослини з однієї клітини, заснована на її здатності до тотипотентності. Результати генетичної інженерії рослин багато в чому залежать від розробки методів культури тканин, особливо методик регенерації цілих рослин.

Технологія генетичної інженерії складається з наступних основних етапів отримання трансгенних рослин:

- пошук, ідентифікація, вибір гена та його клонування;
- підбір генотипу рослини-реципієнта;
- введення гена в геном клітин рослини-реципієнта;
- регенерація трансформованих клітин і добір трансгенних рослин;
- тестування експресії гена в геномі трансгенної рослини.

8.1. Ферменти генетичної інженерії. Основним інструментом генетичної інженерії є ферменти, які дозволяють проводити різні маніпуляції з молекулами ДНК.

Одним з найбільш часто використовуваних в генетичній інженерії ферментів є *ДНК-полімераза I*, яка здатна подовжувати ланцюг ДНК шляхом приєднання комплементарного нуклеотиду і має корек-

торську функцію. При додаванні ферменту до одноланцюгової ДНК-матриці в присутності праймера відбудеться її подвоєння.

ДНК-лігаза здійснює з'єднання фрагментів ДНК шляхом відновлення фосфодіефірних зв'язків між сусідніми нуклеотидами. Цей процес називається лігуванням.

Нуклеази – велика група ферментів, які каталізують гідроліз молекул нуклеїнових кислот. В результаті дії нуклеаз молекула ДНК або РНК розділяється на фрагменти або окремі нуклеотиди. Природна функція нуклеаз в клітині – захист від чужорідних молекул нуклеїнових кислот, а також деградація власних непотрібних молекул.

Окрему групу нуклеаз, широко використовувану в генній інженерії, представляють специфічні ендонуклеази – *рестріктази*. До теперішнього часу з різних мікроорганізмів виділено більше тисячі різних рестриктаз. У генетичній інженерії найбільш широко використовуються близько двохсот.

Ферменти рестрикції стали ефективним інструментом досліджень. Вони дозволяють перетворювати молекули ДНК великого розміру (10^6-10^{11} п. н.) в набір фрагментів довжиною від декількох сотень до десятків тисяч пар основ. За допомогою електрофорезу фрагменти ДНК, що розрізняються за розміром, можна легко розділити, а потім досліджувати кожен фрагмент окремо. Метод заснований на розділенні фрагментів молекул ДНК, які в залежності від сумарного заряду і просторової конфігурації рухаються з різною швидкістю в полі постійного електричного струму.

Розподіл рестрикційних фрагментів дає можливість отримувати рестрикційні карти – послідовності ДНК з нанесеними на них сайтами рестрикції. Чим більше взято рестриктаз, тим більш докладна отримана карта.

Для визначення нуклеотидної послідовності ДНК застосовують методи *секвенування*. Існує два основних методи секвенування: хімічний та ферментативний сиквенс. *Хімічний сиквенс*, або метод хімічної деградації Максама-Гілберта, оснований на виборчій хімічній деградації нуклеотидів. Для секвенування цим методом необхідно отримати одноланцюгову молекулу ДНК, один з кінців якої мітять за допомогою радіоактивного фосфору ^{32}Р. Препарат міченої ДНК ділять на чотири доріжки, кожну з яких обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну з чотирьох основ у кожній доріжці. У теперішній час на основі секвенування за допомогою хімічної деградації розроблені вдосконалені і швидкі методи визначення нуклеотидної

послідовності, в тому числі твердофазного секвенування і секвенування з використанням обернено-фазової хроматографії.

Більш широко зараз застосовується метод *ферментативного секвенування*, або метод секвенування шляхом термінації синтезу ланцюга (метод Сенджера). В основі методу лежить принцип реплікації комплементарного ланцюга ДНК на одноланцюговій матриці. Основним моментом ферментативного секвенування є термінація синтезу ланцюга, що будується.

У теперішній час розшифровані послідовності більшості прокаріотів. Серед еукаріотів повністю секвеновані геноми дріжджів, арабідопсису, нематоди, дрозофіли та людини. Здійснюється розшифрування геномів рису і миші. Проведення робіт такого масштабу неможливо без автоматизації та модернізації методів секвенування. Вже повністю налагоджене автоматичне секвенування на основі обох методів, що значно спрощує і здешевлює процедуру.

Важливим кроком у проведенні генно-інженерних процедур є створення *рекомбінантних ДНК*. Під рекомбінантними розуміють молекули, утворені об'єднанням в умовах *in vitro* двох або більше фрагментів ДНК, виділених з різних біологічних джерел. Певні фрагменти ДНК, в тому числі і фрагменти, що містять гени, отримують з використанням *рестриктаз*.

Рестріктази можуть утворювати фрагменти як з «тупими», так і з «липкими» кінцями (рис. 8.1). Деякі рестріктази вносять в ланцюзі ДНК симетричні, уступчасті розриви на рівних відстанях від центру сайту впізнавання. Ці комплементарні одна одній ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок спарювання основ і тому їх називають комплементарними, або «липкими» кінцями. Парування основ відбувається тільки між комплементарними послідовностями. Але будь-які два фрагмента (незалежно від їх походження), що утворилися за дії однієї і тієї ж рестріктази, можуть «злипатися» за рахунок утворення водневих зв'язків між однонитковими ділянками комплементарних нуклеотидів. Однак після цього цілісність подвійний спирали не відновиться, оскільки залишиться два розриви у фосфодіефірному кістяку. Для їх відновлення використовують фермент ДНК-лігазу, яка «зшиває» ці розриви, завершуючи утворення рекомбінантної молекули ДНК.

Деякі рестриктази розрізають ДНК, роблячи прямий розріз всередині сайту рестрикції. При цьому утворюються так звані «тупі» кі-

нці фрагментів ДНК. Вони також можуть бути з'єднані за рахунок дії ДНК-лігази, але ефективність реакції лігування на порядок нижче. Однак цей метод має свої переваги: при з'єднанні фрагментів з «тупими» кінцями не має значення, які рестриктази їх утворювали; фрагменти, утворені в результаті дії різних рестриктаз, легко поєднувані.

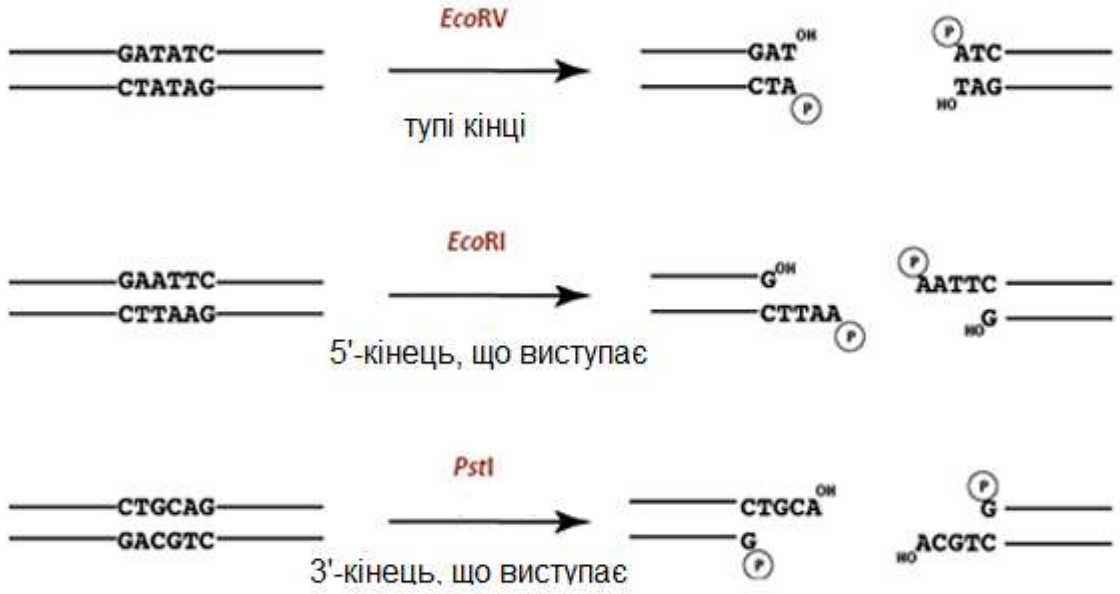


Рис. 8.1. Кінці, які утворюються після обробки рестриктазами

«Липкі» кінці можна ферментативним шляхом приєднати до молекул ДНК з «тупими» кінцями. Для цього відщеплюють нуклеотиди «липких» кінців за допомогою нуклеази, яка руйнує тільки одноланцюгову ДНК, або «забудовують»: за допомогою ДНК-полімерази I на однониткових «липких» кінцях синтезують другу нитку. В результаті з фрагмента ДНК з «липкими» кінцями виходить фрагмент з «тупими», і він з'єднується з іншим фрагментом ДНК з «тупими» кінцями ДНК-лігазою.

8.2. Вектори. Після того як фрагменти ДНК з'єднані у пробірці, їх треба ввести в живі клітини. Введення в клітину і стабільна підтримка генетичної інформації, яка міститься в рекомбінантних молекулах ДНК, є ключовою операцією в генетичній інженерії. При звичайному введенні ДНК, наприклад, в бактеріальну клітину вона, як правило, піддається атаці ферментів, які гідролізують її на складові компоненти – нуклеотиди (дія системи модифікації-рестрикції). У деяких випадках ДНК «виживає» в клітині, однак в процесі поділу клітин вона втрачається. Для того, щоб рекомбінантна ДНК стала складовою частиною генетичного апарату клітини, вона має або вбудува-

тися в її геном (інтегруватися в хромосому) і реплікуватися за її рахунок, або бути здатною до автономної реплікації. Для цього використовують спеціальні молекули – *вектори*.

Векторами називаються молекули ДНК, які здатні акцептувати чужорідну ДНК і забезпечити її реплікацію, експресію і / або трансформацію (перенесення в інші організми). Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення в клітку додаткової генетичної інформації. У якості векторів використовують, як правило, плазміди, бактеріофаги, мобільні елементи, віруси тварин. В даний час створена велика кількість векторів, і за профілем використання їх можна розділити на кілька типів.

Вектори для клонування використовують для збільшення кількості (ампліфікації) фрагмента ДНК, вбудованого в такий вектор, за допомогою реплікації. Для цього найбільш часто використовують бактеріальні плазміди і фаги. Для клонування великих фрагментів геному використовують штучні бактеріальні та дріжджові хромосоми.

Експресійні вектори використовують для аналізу конкретних послідовностей генів і їх білкових продуктів, а також для напрацювання певного білка. Існує величезна кількість експресійних систем, особливо для прокаріотів. Є також вектори для експресії генів в клітинах дріжджів, рослин і ссавців. Експресійні вектори для еукаріотичних організмів завжди містять так звану експресійну касету, яка складається з промотора, здатного працювати в даному організмі, і сайту поліаденілювання.

Для трансформації рослин шляхом введення чужорідного фрагмента ДНК в геном реципієнта використовують *інтегративні вектори*. Зазвичай такі вектори містять специфічні послідовності, які сприяють інтеграції в геном.

В цілому до векторної молекулі висуваються наступні основні вимоги:

- вектор має містити унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз, що робить можливим вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;

- вектор повинен мати певну ємність і не втрачати вбудований фрагмент;

- вектор має реплікуватися в певних клітинах за рахунок наявної послідовності точки початку реплікації (оріджин);

- вектор має містити послідовність маркерного гена, що полегшує селекцію клітин, які мають векторну конструкцію.

Використання бактеріальних плазмід в якості векторів для клонування. Клітини бактерій містять хромосомну ДНК, а також багато невеликих (1-25 т. п. н.) кільцевих молекул ДНК – плазмід. Деякі плазміди містять гени резистентності до антибіотиків, представлені великим числом копій. Високе копіювання плазмід забезпечує клітині синтез великої кількості ферментів, які нейтралізують антибіотики, що і забезпечує стійкість до них бактерії. У присутності іонів кальцію плазміди легко поглинаються бактеріями, які їх не містили. Однак, бактеріальна клітина зазвичай може містити у своєму складі плазміди тільки одного типу. Число копій плазміди в клітині може істотно варіювати. Це залежить від генетичних особливостей як клітини, так і плазміди. Деякі плазміди можуть розмножуватися до тих пір, поки їх число не досягне 10-200 копій на клітину. Інші типи плазмід реплікуються з тією ж швидкістю, що і бактеріальна хромосома. Таких плазмід в клітині одна або декілька. Для клонування використовують вектори на основі плазмід першого типу.

Вектори на основі бактеріальних плазмід широко використовуються для клонування, але у них є один істотний недолік – невелика ємність. У таких векторах можна клонувати фрагменти в середньому не більше 7-8 т. п. н., а послідовності еукаріотичних генів набагато довші. Крім того, для вивчення регуляторних послідовностей, які перебувають за межами кодувальної частини генів, необхідно клонувати ще більш протяжні ділянки геному. Для клонування таких фрагментів плазмідні вектори не підходять, оскільки плазміди, що містять великі вставки хромосомної ДНК (більше 8 т. п. н.), нестабільні і при реплікації поступово втрачають чужорідну ДНК. Клонування фрагментів ДНК від 100 т. п. н. і більше здійснюють у спеціально сконструйованих векторах.

BAC-вектори (від bacterial artificial chromosome – штучна бактеріальна хромосома) створені на основі F-плазмід бактерій і містять гени, відповідальні за реплікацію і копийность цих плазмід в бактеріальних клітинах, а також ряд додаткових послідовностей для полегшення клонування. Ємність BAC-векторів при власному невеликому розмірі (~ 7 т. п. н.) величезна – 100-300 т. п .н. Це дозволяє у багато разів зменшити число клонів при отриманні геномних бібліотек.

YAC-вектори (від yeast artificial chromosome – штучна дріжджова хромосома), які також використовуються для клонування великих

фрагментів ДНК, представляють собою штучну дріжджову мініхромосому. YAC-вектор містить центромеру, теломери і точку початку реплікації. У такий вектор можна вбудувати фрагменти чужорідної ДНК розміром понад 100 т. п. н. Така мініхромосома, введена в клітини дріжджів, буде реплікуватися і вести себе аналогічно іншим дріжджовим хромосомами при мітотичному поділі.

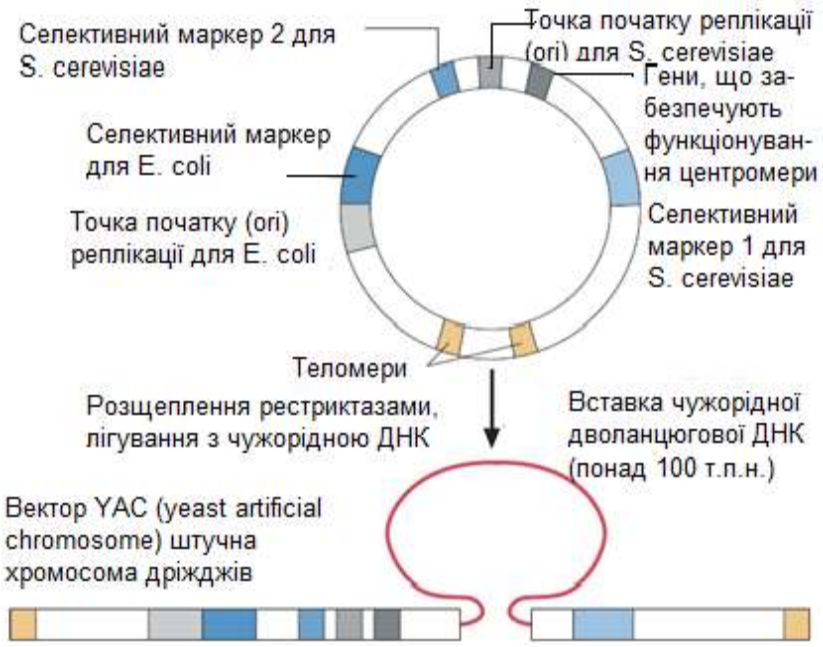


Рис. 8.2. Схема отримання YAC вектора

8.3. Банки генів. *Геномна бібліотека* (банк генів) – це клонований в складі векторів повний набір послідовностей ДНК даного організму. Фрагментація цілого геному на окремі ділянки значно полегшує всі генно-інженерні маніпуляції і дозволяє аналізувати окремі послідовності, проводити порівняльний аналіз різних геномів по певних ділянках і, головне, виділяти індивідуальні гени і працювати з ними. Фрагменти геномної ДНК отримують гідролізом високополімерної хромосомної ДНК за допомогою рестритаз. Рестриктази для гідролізу ДНК підбирають таким чином, щоб отримані фрагменти перекривалися і їх розмір відповідав ємності вектора. Отримані фрагменти лигують з плечима фага і упаковують в уже готові головки фагів. Так утворюється геномна бібліотека. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при –70 °С. У таких умовах бібліотека може зберігатися десятки років.

Розмноження отриманих геномних клонів (ампліфікацію бібліотеки), а також пошук потрібного клону проводять, заражаючи створе-

ним матеріалом бактеріальні клітини і висіваючи їх на чашки Петрі з агаризованим середовищем. Розміри секвенованих геномів рослин коливаються від 135 млн. п. о. у арабідопсісу (*Arabidopsis thaliana*) до 150 млрд. п. о. у воронячого ока (*Paris japonica*). При ємності вектора 15 т. п. н. бібліотека може містити до 10 млн. фагових частинок. Перевірка фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном на присутність необхідного гена. Так можна ідентифікувати саме ті фагові частинки, які несуть послідовність досліджуваного гена, розмножити ДНК тільки цієї послідовності і проводити з нею подальші маніпуляції.

Ідентифікація та виділення послідовностей генів. Виділення генів – один з головних етапів в генетичній інженерії. Успіх на цій стадії залежить:

1) від ступеня вивчення даного гену та його положення в геномі донора;

2) від розроблення методів виділення мРНК даного гена і методів виявлення функціональної активності його продукту;

3) від існування об'єктів, в яких даний ген знаходиться у великої кількості копій (ампліфікований) або в яких він особливо активний, що дозволяє виділити в достатній кількості його мРНК, які можна надалі використовувати для отримання ДНК цього гена шляхом зворотної транскрипції.

В принципі існує два основних шляхи отримання гена: або ген штучно синтезують, або з клонотекі відбирають ту рекомбинантну ДНК, яка містить потрібний ген.

Здійснення першого шляху стало можливим внаслідок відкриття зворотної транскриптази. Цей фермент був виділений з деяких онкогенних РНК-вірусів. Фермент являє собою специфічну РНК-залежну ДНК-полімеразу: синтез ДНК здійснюється на РНК-матриці. В результаті синтезується комплементарний ланцюг ДНК. Для верифікації отриманого гена існує кілька методів. Якщо відома послідовність амінокислот білка, що кодується даним геном, то, визначивши нуклеотидну послідовність клонованої ДНК, можна переконатися, що вона кодує саме цей білок.

Можна використати метод гібридизації молекул ДНК і РНК. Молекули кДНК піддають денатурації (вони стають однонитковими) і змішують з надлишком радіоактивно міченої мРНК. В умовах ренатурації (процес, при якому відбувається відновлення подвійної спіралі, причому остання може утворитися як з двох ланцюгів ДНК, так і з

ланцюга ДНК і комплементарного їй ланцюга РНК) буде відбуватися утворення ДНК-РНК-молекул.

Якщо кДНК у складі векторної молекули здатна до експресії (відбувається синтез мРНК, а потім з мРНК – синтез білка), то ген можна ідентифікувати за його продуктом, наприклад, за допомогою специфічного імунохімічного методу виявлення білка. Таким чином, використовуючи один з цих методів або їх комбінацію, можна довести, що отримано саме потрібний ген.

Наступним кроком є створення банку кДНК. Для цього молекули кДНК зшивають з векторними молекулами і трансформують ними бактеріальні клітини. Причому роботу проводять таким чином, що кожна бактеріальна клітка отримує тільки одну рекомбінанту плазміду і, отже, буде містити тільки один вид кДНК. Сукупність векторних плазмід, кожна з яких несе в своєму складі кДНК, називають *бібліотекою кДНК*. Отже, бібліотеки кДНК, на відміну від геномних бібліотек, представляють не все послідовності генома і навіть не всі гени, а тільки ту їх частину, яка експресується в даному організмі в певний час. При цьому слід пам’ятати, що в кДНК представлена тільки структурна частина гена без промоторних та інтронних ділянок.

Виділяючи мРНК тільки з листя або тільки з коренів, можна отримати специфічні кДНК листової або кореневої тканини, які будуть відповідати тільки тим генам, які експресуються у зазначених тканинах. Таким чином, крім бібліотеки кДНК організму можна отримати бібліотеки кДНК окремих органів і тканин (органо- або тканино-специфічні бібліотеки кДНК) або бібліотеки кДНК, характерні для різних стадій онтогенезу. Отримання і аналіз таких бібліотек дозволяє ідентифікувати тканино-специфічні гени і вивчати процеси диференціювання клітин і тканин, тканино- і органо-специфічного метаболізму, визначати гени, що беруть участь в цих процесах.

Для ідентифікації потрібного гена з клонотеки застосовуються молекулярні зонди (проби). Зонд являє собою мічену молекулу нуклеїнової кислоти, гомологічну послідовності гена. Індивідуальна радіоактивно мічена мРНК є гарним зондом для виявлення бактеріальних колоній, які несуть потрібний ген. Однак індивідуальну мРНК не завжди вдається виділити. Іноді продукт (а значить, і мРНК) потрібного гена присутній в клітині в дуже малій кількості або його мРНК дуже швидко деградує і отримати індивідуальну РНК не вдається. При наявності стабільного білка можна виділити його невелику кіль-

кість і визначити амінокислотну послідовність деякої його частини. За відомою амінокислотною послідовністю можна встановити можливі послідовності нуклеотидів (їх буде кілька через виродженість генетичного коду) в тій ділянці мРНК, який кодує дану амінокислотну послідовність. Потім з участю одного з радіоактивно мічених нуклеотидів хімічно синтезують олігонуклеотиди довжиною не менше 30 нуклеотидних пар, один з яких повністю комплементарний ділянці потрібного гена. Такі олігонуклеотиди і є пробами / зондами для пошуку потрібних клонів, відповідних кДНК, а потім і клонів в геномних бібліотеках. Після того як зонд отримано, переглядають геномну бібліотеку або бібліотеку кДНК для ідентифікації бактеріальних колоній, що містять плазміду з послідовністю, комплементарною зонду і, отже, відповідною аналізованому білку.

Аналіз ДНК методом блот-гібридизації використовується не тільки при скринінгу кДНК і геномних бібліотек, а й для аналізу геномної ДНК. За допомогою цього методу можна визначити присутність певної послідовності ДНК в геномі (наприклад, присутність чужорідного гена в геномі трансгенних рослин, копійність гена тощо). Аналіз ДНК методом блот-гібридизації заснований на ідентифікації певних фрагментів ДНК шляхом їх гібридизації зі специфічними міченими зондами. Він складається з наступних етапів:

а) рестрикція ДНК;

б) перенесення рестрикційних фрагментів з гелю на нейлоновий фільтр і їх іммобілізація;

в) гібридизація з міченим зондом.

8.4. Етапи отримання трансгенних рослин і методи трансформації рослинних клітин. Вибір гена визначається необхідністю передачі рослині певної господарсько-корисної ознаки. В даний час для трансформації рослин використовуються в основному гени, що визначають моногенні ознаки, такі, як стійкість до гербіцидів і пестицидів, стійкість до деяких інших видів стресів. Більшість генів, що визначають ці ознаки, виділені з бактеріальних геномів. Останнім часом як донори генів, що визначають ознаки стійкості, обирають геноми диких видів. Такі гени не завжди можуть бути введені в геном рослин-реципієнтів шляхом статевої гібридизації через біологічну несумісність рослин, що відносяться до різних видів, родів і навіть родин. До того ж, при інтрогресивній гібридизації за цільовим геном тягнеться шлейф небажаних ознак. Ще більш складною є проблема

отримання ознак, що відносяться до групи кількісних ознак: продуктивність, якість зерна, стійкість до посухи, низьких і високих температур.

В ідеальному варіанті як реципієнт підбирають рослини такого сорту або лінії, які відповідали б вимогам виробництва за врожайністю, якістю плодів, стійкістю до біотичних і абіотичних стресів, але мали б лише одну негативну властивість, наприклад, нестійкість до комах. Тоді введення в геном рослин цього сорту, наприклад, бактеріального гена *bt2*, що експресує білок прототоксін, який викликає загибель комах, приводив би до значного поліпшення обраного сорту. Вибір генотипу рослини-реципієнта визначається здатністю його клітин до регенерації в цілу фертильну рослину, оскільки відомо, що ця властивість значною мірою залежить від генотипу.

Проблема переносу чужорідних генів в геном рослин істотно полегшується завдяки виявленню Ті-плазмід ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens*, що дозволяють вводити чужорідні гени в геном дводольних і деяких однодольних рослин. Останнім часом досить широко, особливо для трансформації клітин однодольних рослин, використовують біолістичний метод. Важливо забезпечити експресію чужорідного гена в геномі рослини-реципієнта і стабільне успадкування ознаки у нащадків ряду поколінь. Експресія введеного гена залежить від багатьох причин, в т. ч. від місця інтеграції гена в геном рослини, подальшого метилування промоторної області і введеного гена і т. і.

Ефективність отримання трансгенних рослин безпосередньо залежить від регенераційної здатності клітин рослини-реципієнта. У свою чергу регенерація дорослих рослин з трансформованих клітин залежить від тотипотентності клітин певних тканин і тому регенераційна здатність окремих тканин істотно відрізняється. Крім того, види і навіть сорти рослин можуть відрізнятися за здатністю до регенерації.

Тотипотентність добре виражена у клітин дводольних рослин, таких як тютюн, картопля, буряк, соя, рапс, люцерна, томати, морква, капуста, деяких плодових. В той же час отримати регенерацію трансгенних рослин з клітин більшості бобових, перцю, баклажана вкрай важко. У однодольних, особливо злаків, властивість тотипотентності клітин виражена набагато слабкіше, тому процес регенерації клітин у цілу рослину утруднений. В даний час розроблені методики регенерації трансформованих клітин деяких основних зернових культур, та-

ких як кукурудза, рис, пшениця, ячмінь. З кожним роком методи регенерації розробляються для все більшого числа рослин.

Вектори на основі плазмід. Однією з основних проблем отримання трансгенних рослин є спосіб введення чужорідних генів в хромосоми рослин. Значний прорив був зроблений при відкритті можливості використання природної системи трансформації рослин Ті-плазмідами агробактерій. Було відомо, що деякі види ґрунтових бактерій (*Agrobacteria*) можуть заражати дводольні рослини і викликати утворення специфічних пухлин – корончастих галлів, які складаються з дедиференційованих клітин, які активно діляться і ростуть. При культивуванні *in vitro* клітини пухлини можуть рости у відсутності гормонів, необхідних для росту нормальних рослинних клітин. Крім підвищеного синтезу фітогормонів, пухлинні клітини корончастих галлів починають синтезувати незвичайні для рослини сполуки – опіни (продукти конденсації аміно- та кетокислот або амінокислот та цукрів), які використовуються агробактеріями як джерело азоту і вуглецю. Агробактерії самі синтезувати опіни не можуть, бо проміжні продукти синтезу інгібують ріст бактеріальної клітини, тому вони використовують рослинні клітини як «фабрики» з виробництва опінів. При зараженні рослини агробактеріями відбувається перебудова метаболізму трансформованих рослинних клітин, і вони починають синтезувати сполуки, необхідні тільки для бактерій. Опіни не можуть утилізуватися рослинною клітиною і виділяються у міжклітинний простір, де і поглинаються агробактеріями. Молекулярно-генетичні дослідження показали, що усі Ті-плазміди мають схожу будову і містять послідовності, які можна поділити на дві групи: 1) необхідні для метаболізму самої агробактерии; 2) необхідні для трансформації рослинної клітини.

Гени першої групи мають прокаріотичний тип промотора, отже, можуть функціонувати тільки в бактеріальній клітині, а гени другої групи здатні до експресії в еукаріотичній рослинній клітині. До другої групи належать гени, відповідальні за індукцію пухлини і синтез опінових амінокислот. Трансформація рослини в результаті агробактеріального зараження відбувається в кілька етапів. Сама агробактерія не входить в рослинну клітину, вона розташовується в міжклітинному просторі. Не входить в клітину рослин і Ті-плазміда, але частина Ті-плазміди переноситься в ядро рослинної клітини і може вбудовуватися в рослинний геном. Цей фрагмент Ті-плазміди, названий Т-ДНК (трансформуюча ДНК), на кінцях містить прямі висококонсер-

вативні повтори (25 п. н.), так звані ліва і права фланкуючи області, необхідні для вирізання її зі складу плазміди та інтеграції в геном рослин. Між оріджином (точкою початку реплікації плазміди) та лівою фланкуючою областю знаходиться vir-оперон, який містить гени, які відповідають за вірулентність плазміди. Продукти vir-генів необхідні для транспорту та вбудовування Т-ДНК в геном рослинної клітини (рис. 8.3).

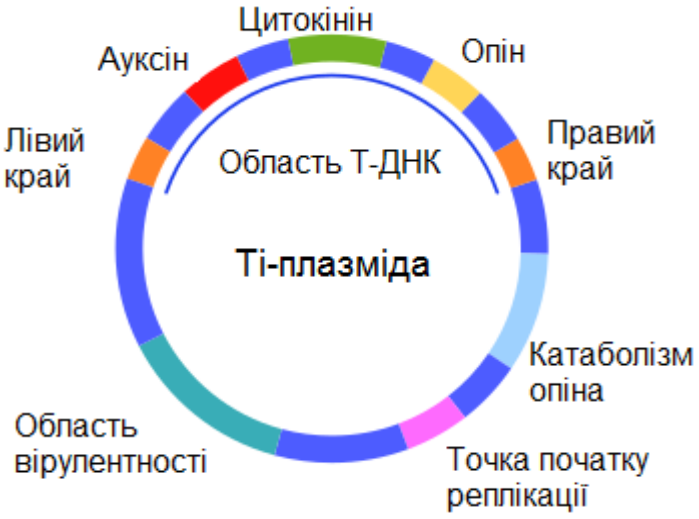


Рис. 8.3. Схема будови Ті-плазміди

Унікальні біологічні властивості Ті-плазміди роблять її ідеальним природним вектором для перенесення генів. Ті-плазміда має широке коло господарів, вбудовує Т-ДНК в хромосоми рослин, де вона може реплікуватися, а її гени транслюються з утворенням білка. Істотно також, що межі Т-ДНК позначені прямими повторюваними послідовностями довжиною 25 п. н. і будь-який фрагмент чужорідної ДНК, вставлений між цими повторами, буде перенесений в рослинну клітину. Однак маніпуляції з Ті-плазмідами утруднені через великі розміри, вставити ген в плазміду традиційними методами не представляється можливим. Тому Ті-плазміда була модифікована генно-інженерними шляхами, і на її основі були отримані вектори для трансформації рослин.

Слід зазначити, що після трансформації рослин природними Ті-плазмідами трансформовані клітини не здатні до регенерації, оскільки в них пригнічене диференціювання за рахунок активності шести генів Т-ДНК, які кодують пухлиноутворення. Якщо ж послідовності генів, які блокують диференціювання, вирізати з Т-ДНК, трансформовані клітини отримають здатність до регенерації. Тому при вико-

ристанні Ті-плазмід для отримання векторних конструкцій послідовності генів, відповідальних за пухлиноутворення і синтез опинів, вирізають, залишаючи тільки фрагменти Т-ДНК, необхідні для її перенесення в рослинний геном. В область Т-ДНК в подальшому і вбудовуються чужорідні гени, які бажано ввести в геном рослини.

Таким чином, вектори для трансформації рослин на основі Ті-плазмід агробактерій повинні містити наступні структурні елементи:

- послідовності правої і лівої межі Т-ДНК, а також послідовності, необхідні для перенесення і вбудовування області Т-ДНК в геном рослинної клітини (vir-оперон);

- послідовність гена селективного маркера, що дозволить проводити селективний відбір трансгенних рослин;

- послідовності, що полегшують вбудовування цільового гена (полілінкерні послідовності, промоторні і термінаторні послідовності);

- сайти ініціації для реплікації в бактеріальних клітинах.

Один із способів, який полегшує введення чужорідної ДНК в геном рослини, полягає в використанні *коінтегратівних векторів*. Процес введення чужорідного гена в геном рослин ділиться на два етапи: клонування гена, який слід вбудувати в рослинний геном, і власне трансформація рослинної клітини. Ці два етапи здійснюють за допомогою різних векторів. В якості допоміжного вектора, в якому проводять клонування потрібного гена, використовують вектори на основі плазміди *E. coli*, в які вставляють фрагмент Т-ДНК з фланкуючими послідовностями Т-ДНК і ген селективного маркера (зазвичай ген, що кодує стійкість до антибіотика або гербіциду), що в майбутньому дозволить проводити селективний відбір трансгенних рослин. Такий вектор невеликий за розмірами і його використовують для клонування в ньому потрібного гена, вставляючи його послідовність в область Т-ДНК. За допомогою кон'югації такий допоміжний вектор переносять в клітини штамів *A. tumefaciens*, які містять інший вектор, що несе гени, необхідні для інтеграції області Т-ДНК в геном рослини. Цей вектор має значні розміри і являє собою фрагмент Ті-плазміди, що несе vir-оперон, фланкуючі послідовності Т-ДНК і фрагменти плазміди, аналогічні допоміжному вектору. Відбувається рекомбінація між гомологічними ділянками двох векторів, в результаті фрагмент проміжного вектора, що містить потрібний ген і селективний маркер, переносяться в інший вектор з vir-опероном та фланкуючими послідовностями Т-ДНК. Таким чином, в результаті рекомбіна-

ції між двома плазмідами утворюється коінтегратівний вектор. Клітини агробактерій, які його містять, відбираються на селективних середовищах і використовуються в подальшому для трансформації рослин.

Інший, більш простий і тому більш часто застосовуваний метод введення чужорідної ДНК полягає у використанні *бінарних векторів* (рис. 8.4).

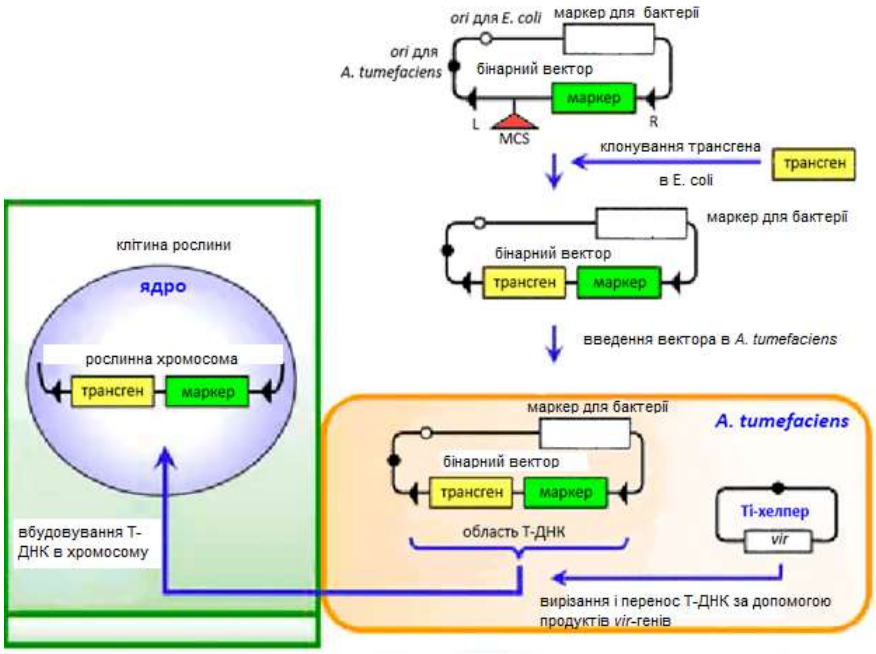


Рис. 8.4. Схема використання бінарних векторів

Як вже згадувалося, для зараження і трансформації рослинних клітин агробактеріями необхідні vir-оперон і прямі повтори, що обмежують район Т-ДНК. Більш того, vir-оперон і фланкуючи повтори Т-ДНК не обов'язково мають знаходитися в одній плазміді. Система бінарних векторів заснована на тому, що в агробактеріальній клітині, використовуваній для трасформації рослин, одночасно знаходяться дві плазміди. Одна містить фланкуючи повтори Т-ДНК, а інша – vir-оперон. Обидві плазміди можуть незалежно реплікуватися в клітинах агробактерії, однак поодинці не можуть викликати трансформацію рослин. При цьому плазміда, яка несе Т-ДНК, містить у своєму складі фрагменти плазміди *E. coli* (в тому числі і точку початку реплікації), що дозволяє проводити всі маніпуляції з клонування в клітинах *E. coli* і набагато спрощує весь процес. Аналогічно коінтегратівному вектору цільовий ген і ген селективного маркера вбудовуються в область Т-ДНК, і потім така рекомбінантна плазміда вводиться в клітини агробактерії, які вже несуть іншу плазмиду з vir-опероном. На ві-

дміну від коінтегративних векторів не відбувається гомологичної рекомбінації між двома плазмідами та їх об'єднання в єдину векторну молекулу. Білки, які продукуються vir-генами однієї плазміди, вирізають і вбудовують в рослинний геном Т-ДНК з чужорідними генами іншої плазміди. В даний час такі бінарні вектори найбільш часто використовуються для трансформації рослинних клітин.

Крім Ті-плазмід *A. tumefaciens* здатністю трансформувати рослинні клітини мають також і Ri-плазміди (від англ. root inducing – індукція утворення коренів), виділені з агробактерії *A. rhizogenes*. Ri-плазміди викликають посилене утворення коріння і, як і Ті-плазміди, призводять до синтезу опінів. Однак Ri-плазміди у більшості випадків не онкогенні і після трансформації рослинні клітини здатні регенерувати здорові плідні рослини. В даний час на основі Ri-плазмід також отримані вектори для генної інженерії рослин.

Вектори на основі ДНК-вірусів рослин. Більшість вірусів рослин – це РНК-віруси. Лише 1-2 % від числа вірусів, що інфікують рослини, відносяться до ДНК-вірусів. Саме вони найбільш зручні для використання в технології рекомбінантних ДНК і розглядаються головними кандидатами на роль векторів для перенесення генів в рослини. Найбільш перспективним у цьому відношенні є вірус мозаїки цвітної капусти CaMV (cauliflower mosaic virus), що вражає в основному рослини родини капустяних. Частинки цього вірусу мають діаметр близько 50 нм і містять кільцеву ДНК довжиною 8000 н. п. Невеликий розмір геному CaMV дає можливість маніпулювати *in vitro* з вірусною ДНК, як з бактеріальною плазмідою і потім вводити її в рослини шляхом втирання в листя. Інфікування невеликого числа клітин призводить до зараження всієї рослини, так як вірус швидко поширюється, передаючись від клітини до клітини. Використанням 1-5 мкг ДНК для інфікування однієї рослини досягається майже 100 %-ва ефективність, що значно вище, ніж при агробактеріальному зараженні. Пряма інтеграція ДНК CaMV в геном господаря після інфекції не виявлена. Розроблено методичний прийом – агроінфекція, що дозволяє здійснити пряме вбудовування вірусної ДНК після інокуляції. Для цього зі складу CaMV вирізаються послідовності, що забезпечують його вірулентність, після цього геном CaMV вбудовується в Т-ДНК і в її складі інтегрується в ядерний геном різних рослин.

До переваг векторних систем на основі вірусів можна віднести: малий розмір геному, що дає можливість легко маніпулювати вірусною ДНК; висока копійність вірусної ДНК в клітинах заражених рос-

лин (до 50 000 на клітину); наявність сильних промоторів, які можуть забезпечити ефективну експресію чужорідних генів. Серед недоліків слід відзначити невелику ємність вектора (800-1000 н. п.) та обмежене коло господарів – капустяні.

Слід зазначити, що хоча вектори на основі вірусів рідко застосовуються для трансформації рослин, вірусні промотори, і перш за все промотор 35S-РНК CaMV, широко використовуються для експресії чужорідних генів в інших векторних системах. Промотор 35S-РНК вірусу мозаїки цвітної капусти є сильним промотором, крім того, він активний не лише в клітинах капустяних, але й в клітинах інших родин, не проявляє тканиноспецифічності і експресується у всіх клітинах трансформованої рослини. Зокрема, була сконструйована рекомбінантна плазміда pBi121-ESAT6-CFP10-gIFN (рис. 8.5).

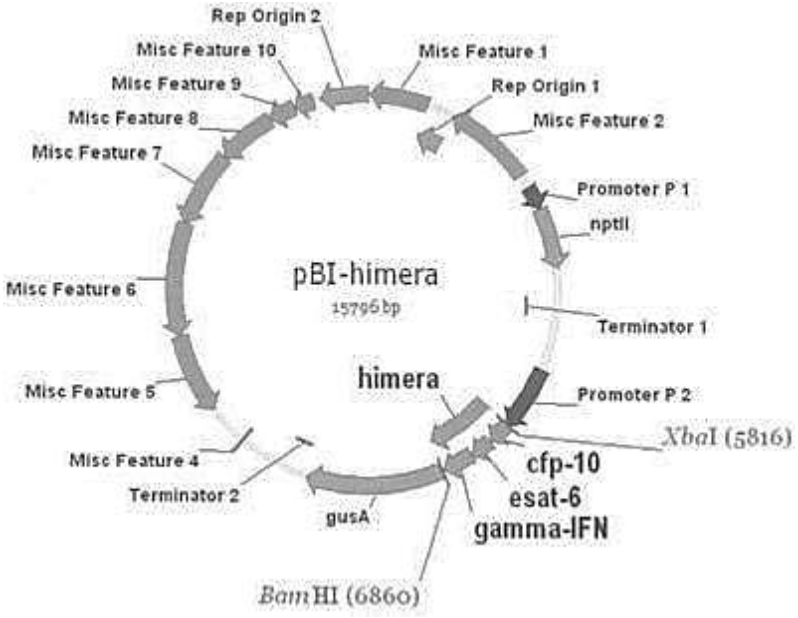


Рис. 8.5. Схема плазміди pBi121-ESAT6-CFP10-gIFN

Розмір даної плазміди 15796 п. н., вона містила:

- фрагмент ДНК векторної плазміди pBi121 розміром 14726 п. н.;
- XbaI-BamHI фрагмент, що кодує химерний ген, який складається з двох генів *M. tuberculosis* – *esat6* і *cfp10* – та гена γ-інтерферону людини;
- 5'UTR область з геному вірусу гравіровки тютюну;
- подвійний 35S CaMV промотор з геному вірусу мозаїки цвітної капусти;
- 3'UTR область з геному вірусу мозаїки цвітної капусти. Сконструйована плазміда забезпечує перенос нуклеотидної послідовності

химерного гена *cfp10-esat6-gIFN* в геномну ДНК рослин для отримання протитуберкульозної вакцини нового покоління.

Вектори на основі мобільних елементів (транспозонів). У 1990-х рр. для трансформації рослинних клітин стали використовувати вектори на основі мобільних елементів. Метод ґрунтується на тому, що мобільні елементи можуть після первинної інтеграції в хромосому рослин переміщатися по геному шляхом вбудовування та наступного вирізання. Найбільш широко для рослин використовується система Ac/Ds-векторів.

Ac (Activator) – це мобільний елемент рослин, здатний викликати хромосомні розриви в специфічних ділянках геному кукурудзи (див. розділ 4). Ac-елемент відноситься до групи мобільних елементів, здатних до активних транспозицій по геному. Ac-елемент може бути активним крім кукурудзи і в геномах інших рослин, таких, як арабідопсис, морква, картопля, томати, рис та ін. Недавні експерименти з дослідження закономірностей транспозиції Ac-елемента в геномі арабідопсиса показали можливість використання конструкцій на основі Ac-мобільного елемента для отримання *систем маркованих транспозицій*, а також для створення так званих *ліній пасток генів* (enhances trap lines), які дозволяють ідентифікувати нові гени, в тому числі і групу генів, які мають тканиноспецифічну експресію. Так можна ідентифікувати тканиноспецифічні гени і білки, характерні тільки для конкретних тканин, наприклад коренів, зародкового мішка і т. д. Використання в таких векторах репортерних генів дозволить маркувати нові сайти інтеграції транспозонних конструкцій та ідентифікувати ті місця інсерцій, які відбулися біля або безпосередньо в послідовність функціонального гена, для його подальшого клонування та секвенування.

8.5. Методи трансформації рослинних клітин і експресія чужорідних генів в геномі рослин. *Метод культивації з агробактеріями* є одним з найпоширеніших методів отримання трансгенних дводольних рослин. Він заснований на трансформації рослинних експлантів з агробактеріями, які несуть векторну конструкцію з чужорідним геном, вбудованим в Т-ДНК. Його популярність пов’язана з відносною простотою проведення трансформації та досить високим виходом трансгенних рослин (10-60 % в залежності від виду).

В якості вихідного матеріалу необхідно мати штам агробактерії з векторною конструкцією, яка містить послідовність гена, який не-

обхідно ввести в геном рослини. Походження гена (про- або еукаріотичний) не особливо важливо для трансформації, проте він має знаходитися під контролем промотора, здатного експресуватися в рослинній клітині. Крім функціонального гена вектор має містити селективний маркер трансформації. Важливим є підбір сорту рослини-реципієнта. Як експланти для трансформації зазвичай беруть стерильні листові диски, але підходять і молоді корінці (арабідопсис), гіпокотилі (томати), сім'ядолі (томати, баклажани), міжвузля (картопля). Методом культивації з агробактеріями до тепер отримані трансгенні рослини практично всіх сільськогосподарських дводольних рослин. Цей метод можна застосовувати також і для деяких однодольних (пшениця, кукурудза, рис).

Для *прямого перенесення генів в рослинні клітини* часто використовують трансформацію рослинних протопластів. При обробці клітинної стінки рослини ферментами (целюлазою, пектиназою) клітинна оболонка руйнується і залишається протопласт. Розроблено методи прямої трансформації протопластів за допомогою ДНК. Найбільшої ефективності трансформації (10^{-2}) вдалося досягти методом електропорації та додавання поліетиленгліколю. Хоча це значно нижче, ніж, наприклад, при агробактеріальній трансформації, метод прямого переноса має низку переваг. Вектор може не містити спеціальних біологічних сигналів і функцій трансформації (фланкуючих ділянок Т-ДНК і vir-оперону). Для трансформації можна використати будь-який ДНК-вектор, що несе чужорідний ген. При цьому гібридний ген інтегрується в ядерну ДНК рослини і експресується (при наявності відповідних регуляторних областей), особливо у випадку прямої ін'єкції в ядро протопласта, використовуючи механізми клітинної рекомбінації. Однак, основним недоліком такого методу є вкрай низька частота трансформації. В даний час більше 140 видів рослин були трансформовані шляхом прямого перенесення ДНК вектора в протопласти різними методами.

У ряді експериментів показано, що *метод мікроін'єкцій* може успішно застосовуватися для трансформації не лише тваринних, але й рослинних клітин. Це стало можливим після подолання низки технічних труднощів, зокрема, розробки методу отримання протопластів, які є мішенями для трангсформації шляхом ін'єкцій. Перенесення ДНК в цитоплазму або ядро рослинної клітини здійснюють мікроін'єкціями розчину, що містить ДНК цільового гена. Мікроін'єкції

дуже трудомісткий процес, який вимагає спеціального устаткування: мікроманіпуляторів і мікроголок. Трансформація рослинних протопластів відбувається з ефективністю не більше 10-15 % незалежно від типу вектора і підходить як для дводольних, так і для однодольних рослин.

Метод електропорації заснований на тому, що імпульси високої напруги збільшують проникність біомембран. Для рослинних протопластів процедура електропорації виявилася дуже ефективною. Здійснюють її так: на рослинні протопласти, що знаходяться в розчині великої концентрації, що містить ДНК-вектори, діють високовольтним імпульсом (напруга 200-350 В, тривалість імпульсу 54 мс). В результаті молекули ДНК поглинаються клітинами через пори в клітинній мембрані. Після розведення розчину протопласти висівають на середовище для регенерації. Ефективність трансформації визначають через 24-48 год після електрошоку.

Упаковка в ліпосоми – один з методів, використовуваних для захисту екзогенного генетичного матеріалу, який вводиться в протопласти рослин, від дії нуклеаз, які руйнують нуклеїнові кислоти. Ліпосоми – це сферичні утворення, оболонки яких складаються з фосфоліпідів. Їх можна отримати в результаті різкого струшування або обробки ультразвуком водних емульсій фосфоліпідів. За допомогою ліпосом в протопласти рослин були введені РНК вірусу тютюнової мозаїки, ДНК Ті-плазміди, а також цілі метафазні хромосоми. До переваг систем перенесення за допомогою ліпосом можна віднести їх низьку токсичність по відношенню до клітин і можливість використання на безлічі рослин, клітини яких здатні утилізувати ліпосоми. В даний час цей спосіб трансформації застосовують все рідше через його технічну складність і низьку частоту трансформації (0,5-1 %). Основні проблеми при описаних вище методах прямої трансформації зазвичай пов’язані з низькою регенераційною здатністю протопластів і вкрай низьким виходом трансформованих рослин.

Метод трансформації рослин за допомогою *вакуумної інфільтрації* був розроблений відносно недавно і використовується як для трансформації пагонів, так і насіння. Метод заснований на тому, що верхівки молодої рослини (конуси наростання) або попередньо оброблене насіння (з частково зруйнованим перикарпом) поміщають в розчин агробактеріями, які мають вектор з цільовим геном. Ємність з розчином і експлантами поміщається в камеру, де створюється негативний тиск. В результаті цього агробактерії проникають у міжкліт-

тинний простір рослинних експлантів, що в подальшому призводить до трансформації. Метод вакуумної інфільтрації досить дешевий та ефективний. На відміну від методів трансформації за допомогою ліпосом, мікроін'єкцій та електропорації, при вакуумній трансформації в якості експлантів не використовують протопласти і немає потреби у додаткових реактивах.

Метод біобалістичної трансформації (*біолістичний метод*) на сьогодні є одним з найефективніших методів трансформації однодольних рослин; він може також з успіхом застосовуватися на дводольних. В якості вихідного матеріалу для трансформації береться суспензійна культура, калусна тканина або культивовані незрілі зародки однодольних. На найдрібніші частинки вольфраму, платини або золота діаметром 0,6-1,2 мкм напиляють ДНК вектора, яка містить необхідну для трансформування генну конструкцію. Частки металу, що несуть ДНК, на целофановій підкладці поміщають всередину біолістичної гармати. Калус або суспензія клітин вноситься в чашку Петрі з твердим середовищем і поміщається під біолістичну гармату на відстані 10-15 см. У гарматі вакуумним насосом зменшується тиск до 0,1 атм. У момент скидання тиску металеві частинки з величезною швидкістю вилітають з гармати і, розриваючи клітинні стінки, входять в цитоплазму і ядро клітин. Зазвичай клітини, розташовані безпосередньо в центрі, гинуть, в той час як у кільцевій зоні (0,6-1 см від центру) знаходитимуть трансформовані клітини. Їх обережно переносять на середовище для подальшого культивування та регенерації. Так були трансформовані кукурудза, рис, пшениця, ячмінь, і отримані стабільні трансгенні рослини. Біолістична трансформація застосовується також для прямого перенесення ДНК в ембріогенний пилок і для отримання трансгенних дигаплоїдних рослин, які є важливим етапом в селекційній роботі. Цим методом була проведена трансформація рослин тютюну та після регенерації гаплоїдних рослин отримані стабільні трансформанти.

8.6. Докази трансформації рослин. До складу векторів для трансформації рослин крім функціонального гена входить ген селективного маркера. Зазвичай це ген, який кодує стійкість до антибіотиків канаміцину або гігроміцину, і тому первинну селекцію трансгенних рослин проводять на середовищі з відповідним антибіотиком. На такому середовищі регенерують рослини, в геномі яких є ген селективного маркера. Однак виживання на селективному середовищі не може

бути абсолютним доказом трансгенної природи рослини. Для повного доказу присутності в їх геномі послідовності Т-ДНК проводять аналіз за допомогою ПЛР або молекулярного аналізу, заснованого на блот-гібридизації хромосомної ДНК трансгенної рослини з використанням у якості зонда радіоактивно міченого фрагмента Т-ДНК. Останнім часом використовують різні способи нерадіоактивно мічених фрагментів, забарвлення ДНК сріблом, однак, слід зазначити, що ПЛР-аналіз дешевше і дозволяє скоріше отримати результати. Крім того, проводять додатковий аналіз експресії функціонального гена методом виявлення відповідної мРНК або білка.

При експресії чужорідних генів у геномі рослин виникає ряд проблем. Перші гени, які використовувалися для трансформації рослин, були виділені з бактерій. Для того щоб бактеріальні гени транскрибувалися в еукаріотичній клітині, необхідно замінити їх вихідні бактеріальні промоторні послідовності або на промотори рослинних генів, або на інші, які можуть ініціювати транскрипцію в рослинній клітині. Крім того, необхідно приєднати до 3′-кінця бактеріального гена фрагмент, який містить сигнал поліаденілування. Такі модифікації необхідні для того, щоб еукаріотична РНК-полімераза могла транскрибувати бактеріальну послідовність і потім з мРНК міг би транслюватися бактеріальний білок в рослинній клітині.

Як промотор для експресії бактеріальних генів найбільш часто використовують промотор 35S-РНК вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV). Такий вибір вирішує відразу дві проблеми: по-перше, промотори дводольних можуть в ряді випадків не працювати в геномі однодольних, і навпаки, а промотор 35S CaMV забезпечує транскрипцію в будь-яких геномах рослин. По-друге, більшість еукаріотичних промоторів є досить слабкими, а 35S-промотор CaMV забезпечує дуже високий рівень експресії гена, що знаходиться під його контролем. У ряді випадків при трансформації рослинної клітини рослинним геном все одно замінюють його власний промотор на промотор 35S CaMV як сильніший, щоб підвищити вихід білкового продукту. Промотор 35S CaMV є конститутивним, що забезпечує постійну, сильну експресію гена, який знаходиться під його регуляцією, у всіх тканинах трансгенної рослини. Саме тому промотор 35S CaMV є самим використовуваним у векторних конструкціях для трансформації рослин. Останнім часом іноді використовують штучно отриманий MAC-промотор, який являє собою подвоєну послідовність 35S CaMV.

Останнім часом все більшого значення набувають тканиноспецифічні промотори рослинних генів. Їх перевага перед промотором 35S CaMV полягає в тому, що гени під їх контролем експресуються тільки в певних тканинах. Так, будь-який ген, контрольований пататиновим промотором, буде експресуватися тільки в бульбах, бо пататин – це запасний білок бульб картоплі і його гени експресуються тільки в бульбах. Тканиноспецифічні промотори використовують в разі, коли чужорідний білок необхідний в певних органах рослини. Наприклад, в разі захисту від будь-яких ґрунтових патогенів зручно використовувати коренеспецифічні промотори, що призводило б до синтезу захисного білка тільки в підземних частинах рослин у місцях контакту з патогенами. Використання таких промоторів для рослини є більш прийнятним. Також використовують так звані індуцибельні промотори. На відміну від конститутивного промотора 35S CaMV гени під такими промоторами експресуються не постійно, а лише в певних умовах. Наприклад, промотори, які індукуються пораненням, метал-індуцибельні – активні в присутності іонів металів (міді, заліза і т. п.). Таким чином, «включення - виключення» гена під контролем таких промоторів легко регулюється. Індуцибельні промотори все частіше використовуються в генетичній інженерії, і не тільки рослин. Недоліком багатьох тканиноспецифічних і індуцибельних промоторів є їх слабка активність.

Крім промотора на експресію трансгена впливає також місце інтеграції в рослинний геном. І хоча вважається, що послідовність Т-ДНК може вбудовуватися в геном у будь-якому місці, проте, в ряді робіт показано, що це відбувається не випадковим чином. Дуже часто Т-ДНК вбудовується в гетерохроматинові ділянки, де експресії гена не відбувається, і трансген під будь-яким навіть сильним промотором транскрибуватися не буде. Ситуацію можна подолати тільки повторними трансформаціями.

8.7. Отримання трансгенних рослин, стійких до стресових факторів. Екстремальні впливи навколишнього середовища, такі як посуха, надлишкове зволоження, вплив високих або низьких температур, засолення і кислотність ґрунтів призводить до значних втрат сільгосппродукції. Тому використання сортів, толерантних до стресів, має велике економічне значення. Багато з адаптивних реакцій рослин на стрес обумовлені синхронною взаємодією багатьох генів. Тому більш доступні для генно-інженерних досліджень і перетворень є біо-

хімічні процеси, безпосередньо індуковані стресовим фактором. Відомо, що в рослинах, які були піддані тривалому водному стресу, накопичується ряд органічних низькомолекулярних сполук (пролін, гліцин, бетаїн та інш.), які служать осморегуляторами або осмопротекторами. Виявлена схожість стресової відповіді у бактерій і вищих рослин: в обох випадках в клітинах відбувається синтез молекул осмопротекторів, механізмом дії яких є встановлення осмотичного балансу між цитоплазмою і навколишнім середовищем і, крім того, часткова стабілізація білків при стресових умовах. Подібні біохімічні шляхи синтезу молекул осмопротекторів дозволили використати гени бактеріального походження для отримання трансгенних рослин, стійких до стресів.

Польові випробування сорту трансгенних газонних трав на газостійкість, посухостійкість, стійкість до засолення ґрунтів проводять, щоб у подальшому їх можна було використовувати у великих містах з характерним абіотичним фоном.

Використовуючи генно-інженерні методи, можна створювати рослини, стійкі до шкідливих комах. З'ясовано, що бактерії *Bacillus thuringiensis* продукують інсектицидний білок-прототоксин, який, потрапляючи в кишківник комах, розщеплюється під дією протеаз до активного токсину, що приводить до загибелі шкідників. На основі цього токсину створені препарати для обробки рослин в полі. Завдяки тому, що зазначені препарати були нестійкими і досить швидко розкладалися, добір на стійкість до інсектициду у шкідників був суттєво уповільнений. З іншого боку, продукція таких білків в рослинних клітинах могла забезпечити стійку резистентність рослин до комах.

З геному *B. thuringiensis* був виділений ген токсину *bt2* і поставлений під контроль промотору 35S CaMV. Інтеграцію гена в геном тютюну здійснили методом агробактеріальної трансформації. Експресія бактеріального гена *bt2* в рослинних клітинах була підтверджена як на рівні транскрипції (присутність відповідної мРНК), так і на рівні трансляції (синтезу білка-токсину). Отримані трансгенні рослини тютюну були стійкі до шкідників (рис. 8.6). Ефективність захисту сільськогосподарських культур від шкідників показана і на трансгенних рослинах томата, трансформованих генами ендотоксину. При цьому бактеріальний білок, синтезований в тканинах рослин, забезпечує захисний ефект, порівняний з використанням інсектицидних препаратів. Крім тютюну і томата бактеріальний ген *bt2* був введений в геном багатьох сільськогосподарських рослин, в тому числі картоп-

лі, кукурудзи, бавовнику, риса, сої, броколі та ін.; на їх основі були створені промислові сорти.



Рис. 8.6. Схема створення *bt*-тютюну

За дії фітопатогенів в рослинах включається каскад захисних реакцій. При цьому активна відповідь може здійснюватися у двох напрямах: у відповідь на інфекцію починається синтез сполук, що є токсичними і обмежують життєдіяльність патогенів, що врешті призводить до їх загибелі; в якості захисної відповіді можуть створюватися структурні бар'єри, які запобігають пошкодженню рослин і поширенню патогенів. Останнє досягається лігніфікацією клітинних стінок рослин або їх зміцненням за рахунок глікопротеїдів, багатих на гідроксипролін, та інших сполук, що призводить до захисту тканин від пошкодження фітопатогенами.

У відповідь на інфікування вірусами, бактеріями і грибами індукуються специфічні PR-білки (pathogenesis related proteins), в тому числі і найбільш вивчені хітинази і Р-1,3-глюканаза. Ці ферменти пригнічують ріст грибів і деяких видів бактерій. З'ясовано, що ці речовини детерміновані моногенно. Тому гени хітинази і глюканази бу-

ли використані в генно-інженерних роботах з отримання трансгенних рослин, стійких до фітопатогенів. Отримані трансгенні рослини тютюну, бавовни, кукурудзи, ріпаку, томата, рису, картоплі, люцерни, турнепсу та інших, які експресують ген хітинази під контролем промотора 35S CaMV. У цих рослин спостерігалася стійкість до грибної інфекції.

Одним з основних напрямків біотехнології рослин є створення культурних рослин, стійких до впливу гербіцидів. Гербіциди широкого спектра дії, знищуючи бур'яни, пригнічують і посіви. Отримання стійких до гербіцидів рослин ведеться у двох напрямах: пряма селекція стійких до гербіцидів форм рослин (в основному, шляхом схрещування з дикими видами рослин, стійкими до гербіцидів); створення трансгенних рослин шляхом введення генів, експресія яких призводить до стійкості до гербіцидів. Є дані про молекулярні механізми стійкості до гербіцидів, виділені гени бактеріального і рослинного походження, які визначають цю ознаку. Дія гербіцидів проявляється в інгібіруванні фотосинтезу (атразин, симазин, діурон), синтезу амінокислот (гліфосат, сульфонілсечовина, біалафос). Стійкість до гербіциду виникає або в результаті порушення спорідненості гербіциду з ферментом-мішенню, або безпосередньо пригніченням молекули гербіциду.

Отримання рослин, стійких до гербіцидів, методами генної інженерії насамперед ґрунтується на вивченні молекулярних механізмів толерантності і включає наступні етапи: виявлення мішеней дії гербіцидів в клітинах рослин, відбір рослин / бактерій, стійких до даного гербіциду (як джерело генів резистентності), ідентифікація і клонування цих генів, вивчення їх експресії для використання в трансгенних конструкціях.

8.8. Отримання трансгенних рослин для медичних цілей. Ще одним напрямом є розробка векторних конструкцій для отримання трансгенних рослин, які активно продукують білки для медичних цілей. Ці рослини можуть безпосередньо вживатися в їжу або використовуватися для виділення з них білкового продукту з подальшим його очищенням. Отримання рекомбінантних білків в рослинах має ряд значних переваг:

- експресія терапевтично важливих білків в рослинах набагато дешевше, ніж в біореакторах з використанням культури клітин ссавців;

- більша безпека рекомбінантних білків, синтезованих в рослинах, порівняно з отриманням їх в трансгенних тваринах, оскільки в рослинах не розвиваються патогенні для людини віруси і бактерії, завдяки чому можливість зараження кінцевих продуктів мінімальна;

- посттрансляційні зміни білків в рослинних і тваринних клітинах відбуваються однаково, що призводить до утворення правильної третинної структури, в той час як саме правильна упаковка еукаріотичної білкової молекули є головною проблемою при синтезі її в прокаріотичних клітинах;

- напрацювання терапевтично важливих рекомбінантних білків в їстивних частинах рослини різко знижує кінцеву ціну продукту через відсутність проблем з очищенням.

8.9. Трансформація пластомного геному рослин. Пластиди – цитоплазматичні органели, присутні в кожній рослинній клітині. Еволюційно пластиди походять від ціанобактерій і зберегли багато характерних рис прокаріотичного геному: прокаріотичний тип промотора, наявність оперонів, специфічний генетичний код, прокаріотичні механізми транскрипції та трансляції.

Останнім часом інтерес до пластид різко зріс у зв'язку з можливістю їх використання в генній інженерії. Це пов'язано з високим рівнем білкового синтезу в пластомі, материнським типом успадковування і відсутністю епігенетичних процесів, таких як ефект положення і замовкання (сайленсинг) гена, що значно ускладнюють експресію трансгенів в ядерному геномі.

Для хлоропластної трансформації використовують векторні конструкції, які побудовані на основі плазмід *E. coli* і містять гени селективного маркера, а також цільовий ген. Трансформація пластому спирається на те, що інтеграція в геном хлоропластів відбувається за механізмами гомологічної рекомбінації. Ділянку векторної плазміди, що несе ген, який необхідно вбудувати в геном хлоропластів, фланкований послідовностями, гомологічними двом фрагментам хлДНК. Довжина таких фланкуючих послідовностей може досягати 400-2000 п. н. Така протяжність гомології значно збільшує частоту рекомбінації між векторною конструкцією і гомологічними ділянками хлоропластного геному і збільшує ймовірність інтеграції частини вектора в хлоропластний геном і отримання транспластомних рослин. Як селективний маркер в конструкціях для хлоропластної трансформації зазвичай ви-

користовувався бактеріальний ген *aadA*, який визначає стійкість рослини до стрептоміцину. У його присутності в середовищі для регенерації рослини з трансформованим хлоропластним геномом несуть ген стійкості *aadA* і залишаються зеленими, в той час, як нетрансформовані – білі.

Для трансформації пластидного геному також використовують біолістичний метод, трансформацію за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) і за допомогою мікроін'єкцій з використанням рідкого сплаву галінстан (галій+індій+олово). Біолістичний метод застосовується аналогічно трансформації ядерного геному, трансформація з ПЕГ вимагає попереднього виділення протопластів, мікроін'єкції здійснюють надтонкою скляною голкою безпосередньо в хлоропласт, сплав використовується як шток шприца за рахунок теплового розширення.

Подальші етапи відбору транспластомних рослин аналогічні таким за трансформації ядерного геному і проводяться в присутності високих концентрацій селективного агента. Істотною відмінністю є те, що при пластидній трансформації проводять кілька додаткових циклів (до 4) селекції і регенерації. Це пов'язано з плоїдністю геному і мультикопійністю пластид в клітині. Оскільки інтеграція векторної конструкції відбувається лише в кілька хлоропластів, проведення декількох послідовних 3-4 етапів регенерації при дуже жорсткому доборі призводить до того, що розмножуються лише трансформовані хлоропласти і в результаті всі хлоропласти в клітині та рослині будуть нести фрагмент векторної конструкції. В даний час хлоропласти все ширше використовуються в якості біореакторів. Публікується все більше робіт, що показують перспективність використання пластид для напрацювання білкових продуктів.

На теперішній час отримані транспластомні рослини тютюну, картоплі, томатів стійкі до різних біотичних і абіотичних факторів. Окремим напрямом є використання транспластомних рослин для виробництва лікарських препаратів і їстівних вакцин. Показана можливість експресії білка крім листя в хромопластах плодів томата і амілопластах бульб картоплі, хоча кількість очікуваного продукту була значно нижчою. Однак можливість експресії цільових генів в їстівних частинах транспластомних рослин відкриває перспективи новому напрямку – створення їстівних вакцин.

В цілому створення трансгенних і транспластомних рослин є одним з напрямів біотехнології, що найбільш бурхливо розвиваються. У 2016 р. посівна площа генномодифікованих (тобто створених мето-

дами генетичної інженерії) агрокультур, згідно з щорічною доповіддю Міжнародної служби по впровадженню агробіотехнологічних розробок (ISAAA), у світі досягла рекордних 185,1 млн га, збільшившись на 3 % у порівнянні з 2015 р. У 2006 році ГМ-рослини займали 102 млн га. При цьому, якщо в 2015 році спостерігалося скорочення посівів до 179,7 млн га з 181,5 млн га в 2014-му, то в 2016 році знову зафіксована позитивна динаміка. У 2016 р. зростання відбулося в основному за рахунок Бразилії, де площі під ГМ-агрокультури збільшилися на 11 %, або 4,9 млн. га, а також США, які наростили посіви на 3 %, або 2 млн га. На 600 тис. га, або 5 % зросли площі в Канаді, на 370 тис. га (17 %) – в ПАР. Лідером за відносним приростом площ стала Австралія, де сівба генномодифікованих агрокультур за рік додала 29 % до 852 тис. га, хоча в абсолютному значенні вони, як і раніше, займають менше 1 % всіх сільгоспземель у країні. У той же час в ряді країн виробництво навпаки скоротилося. Так, в Китаї площі під ГМ-рослинами в 2016 р. зменшилися на 870 тис. га, або 24 %, в Індії – на 800 тис. га, або 7 %, в Аргентині – на 670 тис. га, або 3 %.

Лідерами серед культур є соя – 81 % світового виробництва (93 % в США, 100 % в Аргентині, 88 % в Бразилії), бавовник – 81 % (94 % в США, 93 % в Індії, 80 % в Китаї), кукурудза – 35 % (88 % в США, 75 % в Бразилії), канола (від англ. ***Can**adian **O**il **L**ow **A**cid* – «канадська олія пониженої кислотності», сільськогосподарська культура, до складу якої входять канадські сорти ріпаку (*Brassica napus*) і капусти польової (*Brassica campestris*), в насінні яких знижений вміст ерукової кислоти і глюкозинолатів) – 30 % (93 % в США, 97,5 % в Канаді). Серед інших культур обробляються цукіні, папая, люцерна, цукрові буряки, картопля, томати, паприка.

8.10. Екологічні проблеми генетичної інженерії. Піднявши на новий рівень біотехнологію, генетична інженерія знайшла також застосування в розробці способів визначення і усунення забруднень навколишнього середовища. Зокрема, сконструйовані штами бактерій, які є своєрідними індикаторами мутагенної активності хімічних забруднень. З іншого боку, генно-інженерним способом сконструйовані штами бактерій, що містять плазміди, під контролем яких відбувається синтез ферментів, здатних руйнувати багато хімічних сполук – забруднювачів довкілля. Зокрема, деякі плазмідомісткі бактерії здатні розкладати до нешкідливих сполук нафту і нафтопродукти, що опи-

нилися в середовищі в результаті аварій або інших несприятливих причин.

Однак генетична інженерія – це перетворення генетичного матеріалу, яке в природі відсутнє. Отже, продукти генної інженерії, так звані ГМО, містять нехарактерні для організмів гени, зокрема, гени бактерій у вищих рослин, які функціонують на незвичайному генетичному тлі. Такі організми створюються набагато швидше, ніж передбачає навіть квантове видоутворення і через введення їх в екосистеми через агроценози інши елементи екосистем не встигають адаптуватися до цього.

Трансгенні культури, проблемні в екологічному відношенні. За останні десятиріччя генноінженерно-модифіковані рослини (ГМР), стійкі до гербіцидів та шкідників, стали невід'ємним компонентом аграрного виробництва у багатьох країнах. У перспективі очікується широке використання ГМР у фармакології, лісовому господарстві, зеленому будівництві, ландшафтній екології, декоративному садівництві, а також як перспективне джерело моторного палива.

Інсектицидна кукурудза, захищена *Bt*-генами від гусениць лускокрилих і ложногусениць перетинчастокрилих, а також личинок жорсткокрилих шкідників – одна з найбільш перспективних зернових і фуражних культур. Однак, обробок *Bt*-кукурудзи (захищеної геном *cry1ab*) практично всюди пов'язаний з найбільшим екологічним ризиком. За вегетаційний період її посіви продукують сумарно 1-10 кг/га інсектицидного дельта-ендотоксину (Cry1Ab-білка). Його токсична для лускокрилих концентрація (~3-15 мг/кг сирої маси рослини) постійно підтримується протягом життя рослини всіма її тканинами та органами, включаючи насіння. Біля 10 % Cry1Ab-білка, який продукують такі рослини, надходить з опадом і кореневими екскудатами в ґрунт. Пилок *Bt*-кукурудзи – традиційний корм багатьох комах, включаючи червонокнижних (*Danaus plexippus*). Розповсюджуючись анемохорно, пилок ГМР забруднює токсином грунт і відкриті водойми, створюючи потенційну небезпеку для геобіонтів (включаючи *ризосферні мікроорганізми*) і гідробіонтів.

За дослідження впливу інсектицидних Cry-білків на нецільову біоту виявлені поодинокі факти негативного впливу Cry1Ab-білка на геобіонтів: зниження поїдання *Bt*-кукурудзи мокрицями (*Prorcello scaber*), деяке зменшення чисельності колембол (*Folsomia candida*) і ґрунтових нематод (*Caenorhabditis elegans*). За дії Cry-білка виявлене гальмування росту арбускулярної мікоризи у деяких мікроміцетів та

зміна характеру їх спороношення, збільшення співвідношення «гриби : бактерії», зниження чисельності деяких видів бактерій (зокрема, частки грамнегативних у порівнянні з грампозитивними). Нарешті, виявлене зниження інтенсивності ґрунтового дихання. Однією з причин цього може бути підвищений плейотропний ефект трансгенозу, який викликає збільшення (на 33-97 %) вмісту лігніну в клітинах та тканинах, а отже і у післяжнивних рештках *Bt*-кукурудзи та інших *Bt*-культур (риса, тютюну, бавовника, картоплі). Вважають, що знижена швидкість розкладання рослинних залишків трансгенних культур може мати віддалені екологічні наслідки.

Інша проблема криється у розвитку резистентності цільових фітофагів до *Bt*-ГМР. При внесенні в агроландшафт великої кількості ксенобіотиків можливо лише тимчасово стримувати розмноження шкідників. В процесі мікроеволюції відбувається добір шкідливої цільової біоти, який приводить до виникнення форм, резистентних до діючого фактора. Так, в західних кукурудзяних штатах США стійка до тотального гербіциду гліфосату *Bt*-кукурудза (з геном *cry3bb1*) всього за декілька років втратила стійкість до одного з найнебезпечніших шкідників – західного кореневого кукурудзяного жуку діабротика (*Diabrotica virgifera*). І якщо на початку культивування такої кукурудзи для протидії резистентності цільових фітофагів рекомендували створювати для шкідників «острівці безпеки» з ізогенної кукурудзи (до 20 % від загальних посівних площ), на яких проти шкідників застосовували хімічні інсектициди, то на тлі з кукурудзою з геном *cry3bb1* площу таких острівців рекомендовано збільшити до 50 %.

Ще одна проблема пов’язана з сукцесією фітофагів в агроценозі. *Bt*-кукуруза і *Bt*-бавовник (з Cry1Ab-білком), маючи стійкість до лускокрилих (багатоїдні совки, кукурудзяний стебловий метелик), сильніше ушкоджувалися фітофагами з колючо-сисним ротовим апаратом – попелицями і павутинними кліщами. Врешті решт, посіви, захищені геном *cry1ab* ставали більш привабливими для комах-фітофагів ряду *Homoptera*, а шкода від цих вторинних шкідників була не меншою, ніж від лускокрилих фітофагів.

Можлива передача нових ознак стійкості в природні популяції дикорастучих рослин (співродичів культурних рослин) є серйозним негативним наслідком обробку ГМР. Навіть у типових самозапилювачів, наприклад, у сої в природних умовах можливе утворення між-

видових гібридів «дикоростуча соя × ГМ-соя», якщо запилювач – ГМР.

8.11. Інші проблеми генетичної інженерії. Оскільки можливості клонування генів безмежні, то ще на самому початку цих досліджень серед вчених виникли питання про природу створюваних організмів. Одночасно були висловлені припущення про низку небажаних наслідків цієї методології, причому ці припущення знайшли підтримку і серед широкої громадськості. Зокрема, з'явилися розбіжності про властивості бактерій, які отримали в генно-інженерних експериментах гени тварин. Наприклад, чи зберігають бактерії *E. coli* свою видову приналежність через вміст введених в них генів тваринного походження (наприклад, гена інсуліну) або їх слід вважати новим видом? Далі, наскільки довговічні такі бактерії, в яких екологічних нішах вони можуть існувати? Але найголовніше стало полягати в появі побоювань, що в ході виробництва і маніпуляцій з рекомбінантними молекулами ДНК можуть з'явитися генетичні структури з властивостями, непередбаченими і небезпечними для здоров'я людини, для історично сформованої екологічної рівноваги. Тоді ж почалися і заклики до мораторію на генетичну інженерію. Ці заклики викликали міжнародний резонанс і призвели до міжнародної конференції, яка відбулася в 1975 р. в США і на якій широко обговорювалися можливі наслідки досліджень в цій області. Потім в країнах, де почала розвиватися генетична інженерія, були вироблені правила роботи з рекомбінантними молекулами ДНК. Ці правила спрямовані на виключення попадання в середовище проживання продуктів діяльності генно-інженерних лабораторій.

Інший аспект небажаних наслідків генно-інженерних робіт пов'язаний з небезпекою для здоров'я персоналу, що працює в лабораторіях, де застосовують методи генетичної інженерії, оскільки в таких лабораторіях використовують фенол, етидію бромід, УФ-випромінювання, які є шкідливими для здоров'я чинниками. Крім того, в цих лабораторіях існує можливість зараження бактеріями, що містять рекомбінантні молекули ДНК, які контролюють небажані властивості, наприклад, лікарську резистентність бактерій. Ці та інші моменти визначають необхідність підвищення рівня техніки безпеки в генно-інженерних роботах.

Нарешті, широко обговорюються в суспільстві проблеми небезпеки генетично модифікованих продуктів (генетично трансформова-

них томатів, картоплі, кукурудзи, сої), а також таких продуктів як хліб, пасти, цукерки, морозиво, сир, рослинне масло, м'ясні продукти, які в ряді країн, особливо в США, набули широкого поширення. Протягом 12 000 років сільського господарства людина вживала продукти природного походження. Тому припускають, що з генетично модифікованою їжею в організм людини потраплять нові токсини, алергени, бактерії, канцерогени, що призведе до абсолютно нових хвороб майбутніх поколінь. У зв'язку з цим виникає питання про дійсно наукові оцінки генетично модифікованої їжі.

Питання для самоконтролю

1. Які задачі вирішує селекція?
2. Перелічить основні етапи селекційного процесу.
3. Як створюють вихідний матеріал для селекції?
4. У чому суть закону гомологічних рядів?
5. Що таке сорт?
6. Яке місце сортів в систематиці рослин?
7. Що таке пластичність сорту?
8. Які типи сортів вам відомі?
9. Назвіть основні етапи селекційного процесу?
10. Які методи створення вихідного матеріалу вам відомі?
11. У чому суть явища гетерозису?
12. Які гіпотези про генетичні механізми гетерозису вам відомі?
13. Які види гетерозису розрізняють?
14. Які типи гібридів використовують у селекції?
15. Які методи добору використовують у селекції?
16. Що таке клоновий добір і коли його застосовують?
17. Назвіть переваги і недоліки масового добору?
18. У чому переваги індивідуального добору?
19. Про що дозволяє судити коефіцієнт успадковуваності?
20. Які види селекційних оцінок вам відомі?
21. Що в селекції розуміють під точністю досліду?
22. Які ви знаєте методи підвищення точності досліду?
23. Назвіть основні методи біотехнології, які використовуються у селекції рослин.
24. Назвіть основні етапи отримання трансгенних рослин.
25. Які інструменти генної інженерії вам відомі?
26. Які нуклеази використовують у генній інженерії?

27. Що таке сайт рестрикції?

28. Які генетичні вектори вам відомі і як їх конструюють?

29. Як рекомбінантні молекули ДНК вводять у клітини-мішені?

30. Що таке геномна бібліотека?

31. Опишіть будову Ті-плазмідного вектора.

32. Що таке бінарні вектори?

33. Назвіть напрями використання вірусу мозаїки цвітної капусти CaMV у генетичній інженерії рослин.

34. Як розрізняють трансформовані і нетрансформовані рослини?

35. Що таке *bt*-рослини?

36. З чим пов’язаний інтерес до транспластомних рослин?

37. Як генетична інженерія може впливати на довкілля?

Предметний покажчик

IS-елементи 96, 97, 100
Алелі 31
– множинні 71
Автополіплоїдія 81
– особливості мейозу 83
Алополіплоїдія 83
Амфігаплоїд 84
Амфідиплоїд 84
Анеуплоїдія 87
Апоптоз 110
Ауксотрофи 91
Бібліотека геномна 157
– кДНК 159
Вектори 155
– YAC-вектори 156
– BAC-вектори 156
– бінарні 165
– для клонування 155
– експресійні 155
– інтегративні 155
– коінтегративні 164
– на основі ДНК-вірусів рослин 166
– на основі мобільних елементів 168
– плазмідні 156, 162
Визначення статі
– балансова гіпотеза 46
– епігамне 48
– прогамне 45
– сингамне 45
– тип Ligaeus 45
– тип Protenor 45
Гаплоїдія 89
Гемули 7
Гени 8, 30
– алельні 31
– гіпостатичні 38
– домінантні 30
– модифікатори 42
– неалельні 35
– рецесивні 30
– супресори 38
Генів ампліфікація 29
– – в оогенезі 106
– виділення послідовностей 158
– диференціальна активність в онтогенезі 107
– дрейф 119
– зчеплення 50
– ідентифікація 158
– коадаптація 122
– потік 120
– транскрипція в оогенезі 106
Генетика 8
– популяційна 111-123
– онтогенезу 101-111
– – молекулярні основи старіння 110
Генетичний аналіз 30
Генетичний код 24
Геном 31
Геномний аналіз 84
Генотип 8, 31
Гермафродит 49
Гетерозигота 31
Гетерозис 137
– адаптивний 139
– гіпотеза біохімічна 138
– – генетичного балансу 138
– – домінування 137
– – компенсаційних комплексів генів 138
– – наддомінування 138

– моногенний 138
– репродуктивний 139
– соматичний 139
Гінандроморфізм 48
Гомозиготи 31
Делеція 24, 73
Детермінація 101
Диференціація 101
ДНК
– А-форма 13
– В-форма 13
– С-форма 13
– D-форма 13
– Е-форма 13
– Z-форма 13
– антисмислова нитка 12
– смислова нитка 12
ДНК-лігаза 22, 152
ДНК-полімераза 18
ДНК-полімераза I 151
ДНК-праймаза 21
ДНК органел походження 59
ДНК рекомбінантні 153
ДНК-хеліказа 21
Добір природний 121
– стабілізувальний 122
– дизруптивний 122
– рушійний 122
– масовий 141
– індивідуальний 142
Домінування повне 33
– неповне 33
Дуплікація 74
Екзон 23
Еколого-географічна систематика культурних рослин 130
Експресивність 42
Елонгація 25
Епістаз 38
Еукаріоти 11
Ефект засновника 119
– пляшкового горлечка 119
– положення 79
Закон гомологічних рядів 127
– незалежного успадковування ознак 34
– одноманітності першого покоління 31
– розщеплення ознак 32
– Харді-Вайнберга 116
Зародкова плазма 7
Зворотна транскриптаза 28
Ізоляція біологічна 123
– – генетична 113, 123
– – фізіологічна 112, 123
– географічна 123
– екологічна 123
Інбредна депресія 121
Інбридинг 120
Інверсії парацентричні 75
– періцентричні 75
Ініціація 25
Інсерція 24
Інтерсексуальність 48
Інтрон 23
Інформосома 24

Каріотип 14
Кодомінування 33
Кодон 14, 24
– ініціюючий 24
–стоп-кодони 24
Коінциденція 52
Колхіцин 86
Компаунд 71
Компетентність 102
Комплементарія 35
Криптомерія 39
Кросинговер 50
– мітотичний (соматичний) 54
– фактори, що впливають на частоту 55
– цитологічні докази 53
Лінії чисті 115
– пасток генів 168
Лінкер 15
Мінливість 6, 62
– генеративна 68
– генотипова 62, 68
– групова 62, 113
– індивідуальна 62, 113
– комбінаційна 68
– мутаційна 68
– неспадкова 62
– особливості у гаплоїдних мікроорганізмів 91
– соматична 68,
– спадкова 62
– фенотипова 62
Мобільні генетичні елементи 95
Модифікації 62
Морфози 65
Мутації 22, 68-101, 118
– генеративні 70
– генні 71
– геномні 80
– зворотні 71
– зрушення рамки зчитування 25
– класифікація 69, 70
– місенс 72
– нонсенс 72
– прямі 71
– соматичні 70
– фреймшіфт 72
Норми реакції 62, 66
Нуклеази 152
Нуклеосома 14
Онтогенетика 101
Організми автогамні 114
– агамні 114
– алогамні 114
– міксоплоїдні 81
– мозаїчні 81
– химерні 81
Панміксія 116
Пенетрантність 42
Плейотропія 43
Полімерія кумулятивна 40
– некумулятивна 40, 41
Поліплоїдія 80
– соматична 81
– зиготична 81
– штучне отримання 86
Поліплоїдний ряд 81
Полісома 25
Популяція 111
– генетична структура 111
– – фактори динаміки 118
– – апоміктів 114

– – автогамних організмів 114
– – алогамних організмів 116
– генофонд 113
– географічна 112
– екологічна 112
– елементарна 112
– ефективна чисельність 119
– ідеальна 116
– типи 111
Потік інформації в клітині 27
Праймер 20
Праймосома 21
Прокаріоти 11
Прототрофи 91
Процесинг 23
Ревертаза 28
Рекомбінація незаконна 95
Репарація ДНК 22
Реплікон 21
Рестріктази 152-154
РНК-залежна ДНК-полімераза 28
Роль генетичних факторів у визначенні тривалості життя 109
Сантиморган 52
Секвенування хімічне 152
– ферментативне 153
Сексдукція 94
Селекційні оцінки 144
Селекція 126
– гібриди, що застосовуються в селекції 139
– методи біотехнології в селекції рослин 149
Системи маркованих транспозицій 168
Сорт 128
– місце в систематиці рослин 128
– натуралізація 135
– пластичність 131
– типи 132
Спадковість 6
– епігеномна 103
– хромосомна теорія 7, 8
Сплайсинг 24
Статевий диморфізм 44
Стать 44
– первинні статеві ознаки 45
– вторинні статеві ознаки 45
Схрещування аналізуюче 33
– асортативне 120
– дигібридне 33
– моногібридне 31
– полігібридне 34
– реципрокне 49
– тригібридні 33
Теломераза 110
Теорія прямого успадковування ознак 6
– непрямого успадковування ознак 6
– пангенезису 7
Термінація 25
Топоізомераза 18
Тотіпотентність 103
Точність досліду 149

Трансгенні культури, проблемні в екологічному відношенні 180
Трансгресія 41
Трансдукція 9, 94
Транскриптон 22
Транскрипція 22
Транслокації 76
Трансляція 25
Транспозаза 95
Транспозиції 95, 98
– нереплікативні 95
– неспрямовані 95
– полярний ефект 95
– реплікативні 95
– РНК-опосередковані 96
– спрямовані 95
Транспозон 96, 168
Транспозоноподібні елементи 97
Трансформація 9, 92
– рослин 160-177
– докази 171-173
– методи 168-171
– – біолістичний 171
– – вакуумної інфільтрації 170
– – електропорації 170
– – культивації з агробактеріями 168
– – мікроін'єкцій 169
– – прямого перенесення генів в рослинні клітини 169
– пластомного геному 177
Успадковування зчеплене 50
– зчеплене зі статтю 49
– незалежне 34
– позахромосомне 55
– крис-крос 50
Успадковуваності коефіцієнт 141
Фенокопія 65
Фенотип 8, 31
Фрагменти Оказакі 20
Хромомери 17
Хромосом гаплоїдний набір 14
– диплоїдний набір 14
– заміщення 88
– мітотичних рівні організації
– – нуклеосомний 15
– – нуклеомерний 15
– – хромомерний 16
– – хромонемний 16
Хромосоми 14
– політенні 17
– типу лампових щіток 17
Хромосомні перебудови 72

Рекомендована література

1. Атраментова Л. О, Утєвська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
2. Воробьева Л. И., Таглина О. В. Генетические основы селекции растений и животных. – Харьков, «Колорит», 2006. – 224 с.
3. Кучук М. В. Генетическая инженерия высших растений. – К.: Наукова думка, 1997. – 152 с.
4. Ніколайчук В. І., Горбатенко І. Ю. Генетична інженерія: підручник. – Ужгород, 1999. – 188 с.
5. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. – Минск: Вышейш. шк., 1978. – 448 с.
6. Січняк О. Л., Капрельянц Л. В., Килименчук О. О. Генетика: навчальний посібник для студентів ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» галузі знань «Хімічна та біоінженерія» денної і заочної форм навчання. – Херсон: Олді-Плюс, 2018. – 148 с.
7. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підручник. – Київ: Київський університет, 2008. – 384 с.
8. Тоцький В. М. Генетика: підручник для студентів біологічних спеціальностей університетів. – Одеса: Астропринт, 2008. – 712 с.
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: W.W. Norton & Company, 2015. 1464 p.
10. Ayala F.J. and Kiger Jr. J.A. Modern genetics (Second edition). Benjamin/Cummings, Menlo Park and London. 1984. 923 p.
11. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten C.L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. 1020 p.
12. Lewin B., Krebs J., Kilpatrick S.T., Goldstein E.S. Lewin's GENES X. Jones & Bartlett Learning, 2011. 930 p.

Навчальне видання

Січняк Олександр Львович

Генетика з основами селекції рослин

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

В авторській редакції

Підп. до друку 19.04.2022. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк. 10,92. Наклад 20 пр.
Зам. № 2442.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua