

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Агрономический факультет

Кафедра селекции, генетики и лесоводства

Генетика развития

Методические указания
для практических занятий и самостоятельной работы

Новосибирск 2015

Кафедра селекции, генетики и лесоводства

Составитель: к.б.н. О.Б. Добровольская

Рецензент: *канд. биол. наук, доц.* В.Г. Маренков

Генетика развития : метод. указания / Новосиб. гос. аграр. ун-т. Агроном. факт; сост. О.Б. Добровольская – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», –2015 – 10с.

В методических указаниях представлены вопросы для практических занятий и самостоятельной работы. Предназначены для магистрантов агрономического факультета.

Утверждены и рекомендованы к изданию методическим советом агрономического факультета (протокол № 9 от 14.10.15 г.).

© Новосибирский государственный аграрный университет, 2015

Практическое занятие 1

Цель генетики развития – изучение молекулярно-генетических механизмов, управляющих онтогенезом (онтогенез – совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований, претерпеваемых организмом, от оплодотворения/ от момента отделения от материнского организма до конца жизни).

Генетика развития растений изучает:

1. Генетический контроль онтогенеза

для решения этой задачи необходимо

- выявлять гены, контролирующие различные уровни онтогенеза: деление клеток, апоптоз, эмбриогенез, гистогенез, дифференцировку клеток и др.
- изучать их структуру и функции на уровне организма, ткани, клетки;
- изучать взаимодействие генов;
- идентифицировать генные сети и выдвигать модели.

2. Генетические механизмы восприятия и передачи внешних и внутренних сигналов

Изучение сигнальных путей, обеспечивающих координацию развития растений к условиям окружающей внешней среды, а также с внутренним состоянием организма.

3. Генетические механизмы дифференциальной регуляции действия генов в онтогенезе;

Изучение регуляции экспрессии генов на разных уровнях (транскрипционном, постранскрипционном, трансляционном), а также выявление генов, участвующих в этой регуляции.

4. Генетические механизмы, контролирующие взаимодействие клеток и тканей.

Взаимодействие клеток и тканей основано на обмене индуктивными сигналами, выявление и изучение генов, контролирующие эти сигналы – задача исследований генетики развития.

Успех в изучении генетики развития в основном был достигнут благодаря использованию модельных объектов. К основным модельным растениям генетики развития относят двудольные *Arabidopsis thaliana*, львиный зев *Antirrhinum majus* и однодольные рис *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*. Для модельных видов растений характерно наличие небольшого генома, который должен быть полностью расшифрован (секвенирован), удобство выращивания в лабораторных условиях, эти растения, как правило, являются самоопылителями (не требуют опылителей).

Генетика развития растений – бурно развивающееся направление современной биологии развития и генетики. Генетика развития изучает процесс реализации генетической информации в ходе индивидуального развития организмов.

Под *развитием* понимают количественные и качественные изменения в организме, заключающихся в усложнении его организации, т.е. в усложнении строения и функции всех тканей и органов, усложнение их взаимоотношений и процессов их регуляции. Развитие организмов включает в себя следующие основные факторы:

- 1) рост;
- 2) дифференцировку (на уровне клеток, тканей и органов).

Генетика развития как отдельное направление науки сформировалась на стыке нескольких наук: генетики, эмбриологии, молекулярной генетики и биохимии.

I.Описательный этап становления генетики развития (начало 20х – начало 30х годов 20го века)

На первом этапе становления генетика развития была описательной наукой, которая носила название *феногенетика*. В это время немецкий зоолог Валентин Хеккер (Valentin Ferdinand Carl Haecker) обнаружил различия в развитии нормальных и мутантных зародышей млекопитающих, сравнивая гистологические срезы с нормальных эмбрионов и эмбрионов носителей той или иной мутации и определяя стадию

эмбриогенеза, на которой гистологические картины начинают различаться, и назвал эти стадии *фенокритическими*. Фенокритические фазы развития изучались и у растений, в этой области активно работали лаборатории Эрвина Бауэра в Германии и Синнота в США.

Для более глубокой оценки и интерпретации описательного материала требовались экспериментальные исследования. И следующий этап становления генетики развития был экспериментальным.

II. Экспериментальный этап (1930-е годы - начало 1940-х годов 20го века)

На экспериментальном этапе были сформулированы основные принципы феногенетики или генетики развития.

1) Принцип дифференциальной активности генов, как основы гетерогенизации развивающегося организма.

Н.В. Тимофеев –Ресовский: “Основная проблема генетики развития, изучающей действие генов в онтогенезе, путь от гена к признаку, заключается в том, каким образом при идентичном наборе генов во всех клетках организма формируется клеточное разнообразие и морфофункциональная специализация органов и тканей”.

Согласно гипотезе Моргана:

В клетках многоклеточного организма, расположенных в разных частях развивающегося зародыша и в разные моменты их дифференцировки, функционируют разные гены, поэтому они приобретают сначала химическое, а потом морфологическое своеобразие.

То есть, пользуясь современной терминологией, дифференциальная активность генов контролируется на транскрипционном уровне.

Согласно гипотезе Гольдшмидта:

во всех клетках функционируют все гены, но их продукты испытывают разную судьбу в разных частях зародыша.

Пользуясь современной терминологией, дифференциальная активность продуктов генов регулируется на трансляционном и посттрансляционном уровне.

2). Принцип ведущей роли ядерно-цитоплазматических отношений в регионализации зародыша

Принцип был сформулирован в 30-е годы.

3). Взаимодействие генов в процессе онтогенеза.

Выявлен ряд феноменов, отражающих взаимодействие генов:

Экспрессивность - степень проявления данного гена (пегость у животных)

Пенетрантность - процент животных или растений, у которых данная мутация проявляется.

Примеры различной пенетрантности:

Мутация проявляется в 100% случаев, все дрозофилы с мутацией *white* имеют белые глаза; *vena transversa incomplete* (прерванная поперечная жилка крыла) пенетрантность от 100% до 40-50% в зависимости от линии.

Специфичность действия генов: время активации, направленность его действия и поле действия гена.

Направленность действия гена (пространственная специфичность) заключается в региональных особенностях экспрессии тканевой специфике транскрипционной активности

4). Экспрессивность, пенетрантность и специфичность зависят от генов-модификаторов.

5) Сформулировано понятие о норме реакции и роли внешних и внутренних факторов в ее реализации.

III Биохимический этап (1940-1960е годы 20го века)

Наиболее важными научными событиями в этот период были:

Открытие в 50-е годы роли ДНК как материального носителя наследственности

Открытие американским генетиком Клементом Маркертом множественных фракций ферментов (изоферментов). На примере изоферментов было обнаружено, что экспрессия биохимических, так же, как и морфологических, признаков реализуется в результате взаимодействия генов.

IV Молекулярно-генетический этап (с 60х годов по настоящее время)

Этап характеризуется проникновением в генетику развития методов молекулярной биологии и геной инженерии, формированием представлений о конкретных путях реализации генетической информации. Стали возможны выделение и анализ отдельных генов, изучение закономерности их экспрессии, выявление регуляторной зоны.

В это время были открыты генетические регуляторные системы, контролирующие экспрессию генов на разных уровнях.

В настоящее время важным подходом генетики развития растений становятся использование так называемых омик (англ. omics,) геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и др. Омики – направления биологической науки, рассматривающие всю совокупность соответствующих объектов организма: нуклеиновых кислот, белков, метаболитов и т.д.). *Важным открытием стала расшифровка геномов растений, а также открытия, связанные с влиянием изменения статуса метилирования на фенотипическое проявление признаков.*

Растения, как объект исследований генетики растений отличаются следующие особенности:

- ❖ Прикрепленный образ жизни;
- ❖ Способность к длительному росту, которая определяется наличием образовательных тканей – меристем;
- ❖ Высокая плодовитость. Самоопыление, способность к перекрестному опылению, вегетативному размножению;
- ❖ Простота организации: меньшее по сравнению с животными число типов дифференцированных клеток и тканей;
- ❖ Модульное строение;
- ❖ Тотипотентность клеток растений

Контрольные вопросы:

1. Понятие о генетике развития растений.
2. Предмет и объекты исследований в генетике развития растений.
3. Определение особенностей высших растений, как объекта исследований генетики развития растений.

4. Задачи генетики развития растений.
5. Введение понятий “онтогенез”, “морфогенез” и “филогенез”.
6. История развития исследований в области генетики развития растений.
7. Описательный этап. Экспериментальный этап. Биохимический этап. Молекулярно-генетический этап.

Практическое занятие 2.

Методы генетики развития растений

Основными стратегиями, которые используются в генетике развития являются комплекс методов *прямой (forward)* или классической и *обратной (reverse)* генетики. В рамках прямой генетики стартовой точкой является фенотип и исследования ведутся в направлении от определения фенотипа к установлению генотипа, а в обратной генетике, наоборот, отправной точкой является генотип, внося направленные изменения в который, определяют, как эти изменения сказываются на фенотипе. Методы прямой генетики более универсальны, а методы обратной генетики главным образом подходят для видов растений, чей геном уже расшифрован (секвенирован).

Прямая (классическая генетика)

Начальный этап работ в рамках прямой генетики посвящен выявлению фенотипического разнообразия по определенному интересующему исследователей признаку, включая природное генетическое разнообразие и экспериментальный мутагенез.

Экспериментальный мутагенез включает в себя:

- Радиационный мутагенез
- Химический мутагенез (мутагены: этилметансульфонат (ЭМС), нитрозометилмочевина (НММ) и др)
- Инсерционный мутагенез:

- 1) транспозонный (спонтанное перемещение транспозонов характерно для ограниченного числа растений, к которым относятся петунья, львиный зев и кукуруза)
- 2) Т-ДНК мутагенез (инсерция Т-ДНК при трансформации).

Изменения, которые происходят в структуре ДНК в результате воздействия разных типов мутагенеза, различаются. В следствие воздействия радиационного мутагенеза, как правило, происходят хромосомные мутации – крупные делеции. Делеции в кодирующих и (или) регуляторных областях гена приводят к полной потере функций гена.

В результате химического мутагенеза возникает множество точечных мутаций замены оснований. В кодирующих областях гена это могут быть синонимические (с сохранением смысла кодона из-за вырожденности генетического кода) и несинонимические (с изменением смысла кодона, приводящее к замене аминокислоты в соответствующем месте полипептидной цепи) однонуклеотидные замены, нонсенс-мутации с образованием стоп-кодона или обратная замена стоп-кодона на смысловой кодон. Однонуклеотидных замены происходят и в некодирующих областях гена. Функционально эти мутации могут различаться, что позволяет определить функциональную роль отдельных частей гена.

В результате инсерционного мутагенеза происходят существенные изменения в структуре генов из-за крупных инсерций, которые, как и в случае радиационного мутагенеза, часто приводят к полной потере функций гена.

В качестве примера природного разнообразия можно привести наличие двурядного и шестирядного колоса у ячменя, как результата действия спонтанной мутации по гену *Vrs1* и аллеля дикого типа; простого (аллель дикого типа *Bh*) и ветвистого колоса (мутантный аллель *bh*, спонтанная мутация) у тетраплоидных пшениц. Получены и индуцированные мутанты по двум этим генам, *Vrs1* и *Bh*.

На следующем этапе исследований в рамках прямой генетики изучают стабильно ли наследуется изучаемый признак, и дальнейший анализ проводят, как правило, только с теми признаками, которые наследуются стабильно, а морфозы (ненаследственное

изменение фенотипа организма в онтогенезе под влиянием факторов среды) в дальнейшем анализе не используют. Проявление изучаемых признаков анализируют в разных условиях выращивания, при воздействии разных биологических стимулов и на разных уровнях (организменном, органном, тканевом) с использованием световой, сканирующей электронной и лазерной микроскопии.

Анализ кариотипов (совокупность признаков по числу, размеру, форме и др. полного набора хромосом, присущая клеткам изучаемого вида растений) у спонтанных и индуцированных мутантов необходим для выявления хромосомных мутаций, по другому их называют абберациями, перестройками. Показано, что у пшеницы большая часть морфологических изменений обусловлена именно хромосомными перестройками.

Генетический анализ – важнейший из методов генетики развития растений и необходимый этап исследования мутантов. С использованием генетического анализа определяют число генов, включенных в генетический контроль изучаемого признака (моногенное, полигенное наследование), тип наследования (доминантный, рецессивный тип наследования). Комплиментационные тесты позволяют определить являются ли изучаемые гены аллелями различных генетических локусов или одного локуса (множественный аллелизм). Генетический анализ позволяет сделать выводы относительно роли генов на уровне организма.

В ходе выполнения генетического анализа проводят скрещивание мутанта и линии (формы) того же вида растений со стандартным фенотипом (или линией дикого типа). По особенностям наследования мутантного фенотипа у гибридов первого и второго поколения (соотношению числа потомков с различными фенотипами) делают вывод о числе генов и типе наследования. Скрещивая различные мутанты между собой в ходе выполнения комплементационного теста определяют являются ли гены, детерминирующие мутантный фенотип, аллельными.

Для определения локализации изучаемых мутантных генов на генетической карте используют генетическое картирование. Генетическое картирование – это определение группы сцепления и положения картируемого гена относительно других генов на молекулярно-генетических маркерах данной хромосомы. Для картирования используют различные типы маркеров, в настоящее время наиболее используемым типом маркеров

являются ДНК-маркеры, среди которых наиболее востребованы SSR, SNP. На основе ДНК-маркеров (SNP, DArT) созданы платформы высокопроизводительного генотипирования, позволяющие решать сложные задачи, включая точное картирование генов, выполнять ассоциативное картирование.

Следующий этап исследований посвящен выделению изучаемого гена, то есть определению его первичной структуры ДНК. Для этого могут быть использованы следующие основные подходы:

- ❖ Позиционное клонирование (выделение гена только на основании его положения в геноме, без знания функции);
- ❖ Метод геномного вычитания (для генов, маркированных протяженными делециями);
- ❖ Метод “вытягивание за инсерцию.

Среди перечисленных методов наиболее универсальным является метод позиционного клонирования.

Вопросы для самостоятельного изучения:

1. 1.Позиционное клонирование, как универсальный метод выделения генов растений.
- 2.Рекомбинационный анализ.
- 3.Молекулярные маркеры.
- 4.Молекулярно-генетическое картирование.
- 5.Синтения. Физическое картирование. Определение гена-кандидата на роль гена с последующей валидацией.
6. Методы анализа экспрессии генов.
- 7.Нозерн-блоттинг.
- 8.Гибридизация *in situ*. Методы высокопроизводительного секвенирования транскриптома. Микрочипы. RNA-seq.
9. Методы обратной генетики.
- 10.Гомологичная рекомбинация/замещение гена.
- 11.РНК-интерференция.
12. Транскрипционный сайленсинг. Метилирование гистонов. Малые РНК.
- 13.Т-ДНК инсерционный мутагенез.
- 14.Экспериментальное выключение гена. Нокдаун гена.

- 15.Создание TILLING-популяций. Методы детекции мутаций
- 16.Методы микроскопии в генетике развития растений.
- 17.Методы световой микроскопии, используемые для решения задач генетики развития растений.
- 18.Методы электронной микроскопии в исследованиях морфогенеза растений.

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Новосибирск. Акад. Изд-во «Гео». 2009.

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

2. Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений /Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова - СПб: изд-во Н-Л, 2010, 432 с
3. Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999. 253 с. 3.
4. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика/ Новосибирск, «Сибирское университетское издательство», 2007 с. 479