

УДК 631.524.01.001.57

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ РЕКОМБИНАЦИИ

А. В. СМИРЯЕВ, И. М. НЕЧАЕВ

(Кафедра генетики)

Проведено генетико-математическое моделирование влияния генов-модификаторов частоты рекомбинации (*гес-гены*) на динамику генотипической и фенотипической структуры искусственных популяций, возникающих при различных схемах экспериментов по изучению *гес-систем*. Выявлены недостатки обычных схем (анализирующие скрещивания, инбридинг). Предложены новые варианты эффективного накопления и отбора форм растений с повышенной частотой рекомбинации.

Одно из центральных мест в классической генетике со времен Моргана занимали исследования рекомбинации. В последние 2—3 десятилетия получена качественно новая информация об изменчивости тонкой структуры, интеграции и реализации в фенотипе генетического материала высших эукариот [2]. Однако до сих пор остаются нерешенными такие принципиальные вопросы эволюции и селекции, как роль рекомбинации в генетической изменчивости, механизмы управления изменчивостью самой рекомбинации, рекомбинационная организация хромосом и т. д.

В результате рекомбинации в гибридной популяции возникают новые сочетания генов, расширяется спектр

генотипической изменчивости. В специальной литературе имеются сведения, что общая интенсивность процессов рекомбинации в организме находится под генетическим контролем. *гес-гены* выявлены у разных видов [4, 6]. Они могут оказывать влияние на уровень рекомбинации как во всех хромосомах, так и в отдельных их сегментах [8]. Процесс мейотической рекомбинации может находиться и под моногенным, и под полигенным контролем [2]. Чаще всего в *гес-системе* высших растений имеет место полное доминирование аллелей, снижающих частоту рекомбинации [1]. В то же время значительная часть изменчивости по частоте кроссинговера является аддитивной [5, 7]. Явление генетического управления

частотой рекомбинации (rf) можно использовать в селекции растений для выделения генотипов с повышенными значениями rf внутри сцепленных блоков генов, что позволит селекционеру получать больше новых, необычных сочетаний генов, т. е. повышать доступную для отбора генотипическую изменчивость.

Экспериментальное изучение гес-систем и выделение высокорекомбинантных форм достаточно сложны. Необходим тщательный подбор маркерных генотипов, схем скрещивания и направлений отбора. При инбридинге, например, если гес-аллели, снижающие частоту кроссинговера на маркированном участке хромосомы, доминируют над повышающими, то гомозиготизация популяции перекрестников приведет к возрастанию доли гомозиготных рецессивных гес-генотипов с увеличенной частотой рекомбинации, что облегчит их отбор.

Ясно, что эксперименты, посвященные изучению столь сложных, многофакторных явлений, должны быть тщательно спланированы. Неудачная схема или недостаточный объем любого этапа продолжительного опыта по изучению влияния гес-системы и отбору высокорекомбинантных форм может зачеркнуть многолетний труд экспериментатора. Успех зависит от умения заранее оценить надежность проверки гипотез о гес-системе или процент высокорекомбинантных форм, которые будут получены в рамках той или иной модификации схемы эксперимента. Для этой цели недостаточно интуиции и качественных рассуждений. Необходимы количественные имитационные и аналитические генетико-математические модели, включающие хотя бы в упрощенной форме особенности объекта изучения, возможные диапазоны

изменчивости параметров генетических процессов, различные варианты скрещиваний, отборов и т. д.

Предварительное моделирование позволяет по крайней мере отбросить схемы с недостаточной надежностью и наметить более эффективные способы идентификации влияния гес-систем и пути выделения гес-генотипов, представляющих интерес для генетиков и селекционеров.

Постановка задачи

Проверяется гипотеза, что процент рекомбинации (rf) между маркерными локусами у определенной формы растений зависит от гес-системы, состоящей из одного или нескольких полиморфных гес-локусов (популяций по гес-локусам). Вначале рассмотрим ситуацию принудительного самоопыления равновесной популяции перекрестноопыляемой культуры. гес-генотипы не имеют собственного фенотипического проявления, но влияют на частоту рекомбинации между маркерными локусами. В этом случае гомозиготизация гес-локусов в поколениях самоопыления маркерной формы должна изменять соотношение гес-генотипов с разными значениями процента рекомбинации. Для проверки гипотезы необходимо подобрать схемы экспериментов, включающих принудительное самоопыление, по результатам которых удастся как минимум выявить влияние гес-системы, а также, возможно, уточнить схему наследования гес-генов. В дальнейшем желательно наметить варианты экспериментов, позволяющие выделять генотипы с повышенной частотой рекомбинации между маркерными локусами. За основу берется анализ изменчивости частот маркерных фенотипов. Следует принять во внимание, что принудитель-

ное самоопыление перекрестноопыляемой культуры часто связано с резким сокращением числа потомков. У самоопылителей же (например, при низкой исходной степени сцепления маркеров) для надежного выделения более высококомбинантных форм приходится анализировать слишком большое число потомков каждой особи. Во всех подобных случаях обычный анализ-сравнение rf у отдельных растений затруднен.

Метод решения задачи — имитационное моделирование на ЭВМ с элементами аналитического. В основе имитационного моделирования — детерминистические генетико-популяционные модели, пригодные для описания структуры искусственной популяции, возникающей при самоопылении, отборе, анализирующих скрещиваниях маркерных форм.

Из-за невозможности решать задачу в общем виде вначале введем ряд упрощающих предположений. В последствии некоторые из них будут изменены, а результаты моделирования распространены на более общие ситуации.

1. Рассматривается система двух сцепленных маркерных локусов (аллель A доминантен по отношению к a , B — к b), имеющих независимое выражение в фенотипе растения и одного несцепленного с ним гес-локуса (R доминантен к r), не влияющего на фенотип растения. Возможные нарушения в мейозе не влияют на статистические параметры расщепления по маркерным и гес-генам.

2. Предполагаются частичная самофертильность всех генотипов, отсутствие влияния естественного отбора на структуру искусственной популяции по маркерным и гес-генам, причем эти гены не сцеплены с генами самонесовместимости.

3. Частоты rf (r_2 , r_1 , r_0) маркерных локусов для 3 гес-генотипов (RR , Rr , rr) неизменны в поколениях, а также равны в микро- и макроспрогенезе. Доминантный аллель R снижает rf , т. е. принимаем $r_2 = r_1 < r_0$.

Прямая индикация влияния гес-системы

Вначале желательно проверить в эксперименте наличие полиморфизма по гес-системе у растений исследуемой маркерной формы. Один из простых методов — анализирующее скрещивание достаточного объема по схеме $(AABV \times aabv) \times aabv$ или $(AAvv \times aabV) \times aabv$. Простейшие формулы теории вероятностей позволяют оценить минимальный объем подобных экспериментов, достаточный для выявления растений с разными значениями rf . Следует учесть, что каждая скрещиваемая маркерная форма, возможно, является популяцией по гес-локусу. В рамках предположений 1—3, если, например, формы имеют одинаковую генетическую структуру $p(R)$, $q(r)$ и находятся в равновесии по закону Харди-Вайнберга, доля растений с повышенной частотой рекомбинации (генотипы rr) составит $q^2(\pi)$. Если доля аллеля r мала, например $q(r)=0,15$, то для выявления с вероятностью 95% хотя бы одного растения rr (их доля $q^2=0,0225$) понадобится провести приблизительно 130 анализирующих скрещиваний по одной из указанных схем и оценить частоты маркерных фенотипов индивидуально для каждого скрещивания. Причем в случае неконтрастных различий rf (например, 0,2 и 0,1) у генотипов rr и у RR , Rr общий объем эксперимента слишком велик — необходимо анализировать большое количество потомков каждого скрещивания. Оценка по-

казывает, что в зависимости от средней степени сцепления маркерных локусов в исходной популяции речь может идти о нескольких десятках потомков.

Последнее ограничение тем более ставит под сомнение возможность другой схемы опыта — принудительное самоопыление растений $AaBb$ для оценки различий $r_2=r_1$ и r_0 . У такой перекрестно-опыляемой культуры, как рожь, не удастся совместить эту оценку с началом воздействия инбридингом в ряду поколений на гес-систему. Если за исходную берется цис- или трансгетерозигота, то анализ частот маркерных фенотипов потомства каждого самоопыленного растения $AaBb$ по отдельности (для выявления генотипов rr) не даст сколько-нибудь надежных результатов из-за низкой озерненности колоса при самоопылении ржи.

Поэтому для решения задачи естественно ориентироваться не на индивидуальный анализ потомства отдельных растений, а на генетико-статистическое исследование структуры всей искусственной популяции, возникающей при массовых повторных самоопылениях, возможно, с отбором и последующими анализирующими скрещиваниями. При этом для соблюдения предположения 2 следует как минимум высевать в каждом поколении одинаковое число семян с каждого растения.

Предположим, что у исходных маркерных форм $AABB$ и $aabv$ генотипы по гес-локусу представляют популяции, находящиеся в состоянии равновесия [$p^2(RR)$, $2pq(Rr)$, $q^2(rr)$]. В результате нескольких поколений принудительного самоопыления этих форм происходит гомозиготизация популяции. При этом в рамках предположений 1—3, например для $q(r)=0,15$, доля генотипов rr с повышенной частотой рекомбинации возрастает от $q^2(rr)=0,0225$ до

$q^2(rr) + \frac{1}{2} \times 2pq(Rr) = q = 0,15$. Это, казалось бы, достаточно высокая частота для проведения индивидуальных анализирующих скрещиваний ($AABB \times aabv$) $\times aabv$, которые позволят выявить генотипы rr . Однако независимо от числа самоопылений уже скрещивание $AABB \times aabv$ приведет к восстановлению популяции по гес-локусу, в наших предположениях, со структурой $p^2(RR)$, $2pq(Rr)$, $q^2(rr)$. Исключением является ситуация, когда форма $aabv$ по гес-локусу изначально представлена одним генотипом rr (q) $\cong 1$. О способе выделения такой формы будет сказано далее. Только в этом случае после нескольких самоопылений формы $AABB$ скрещивание ее с $aabvrr$ даст форму $AaBv$ с генотипической структурой по гес-локусу $p(Rr)$, $q(rr)$. Последующее анализирующее скрещивание растений $AaBv$ с $aabv$ позволит выявить среди них растения rr даже при небольшой частоте q .

Следует проанализировать также возможности другого способа проверки гипотез о влиянии и схеме наследования гес-генов. Он предполагает сопоставление реальной динамики фенотипического маркерного состава экспериментальной популяции, полученной в ряду поколений самоопыления цис- или трансгетерозиготы $AaBv$, с изменениями теоретически ожидаемых маркерных частот, соответствующими следующим гипотетическим ситуациям:

- 1) нет влияния гес-системы на rf ;
- 2) на rf влияют гес-гены с определенной схемой наследования.

Если реальные маркерные частоты в поколениях близки к ситуации 1, то гес-система не влияет на rf , если к ситуации 2, то влияет, причем схема наследования гес-генов предсказана пра-

вильно. Однако оценка эффективности экспериментов, реализующих этот способ проверки гипотезы о гес-системе, сложнее и требует применения имитационного моделирования на ЭВМ.

Результаты имитационного моделирования

Использованы модификации детерминистических уравнений [3], описывающих изменчивость генотипической (по гес- и маркерным генам) и фенотипической (по маркерным генам) структур искусственной популяции, возникающей при той или иной схеме эксперимента. Уравнения реализованы в программе «Poly» (язык программирования Turbo Pascal 5.0) на ЭВМ IBM PC/AT.

Входными параметрами программы, задаваемыми в режиме диалога, являются:

- 10 исходных частот (φ) маркерных генотипов по двум локусам ($A-a$, $B-b$). Обычно исходным генотипом является одна дигетерозигота $AaBb$ в цис-трансположении;

- частоты (f_2, f_1, f_0) гес-генотипов RR, Rr и rr в исходных маркерных генотипах;

- соответствующие им частоты (r_2, r_1, r_0) рекомбинации 2 маркерных генов;

- параметры искусственного отбора маркерных фенотипов после каждого скрещивания.

Выходными параметрами после каждого скрещивания и отбора являются:

- частоты маркерных генотипов и фенотипов;

- частоты гес-генотипов и гес-аллеля r у различных маркерных генотипов.

С помощью имитационного модели-

рования сравнивали динамику ожидаемых маркерных частот в ситуациях 1 и 2. Только если различия существенны в поколениях самоопыления, есть смысл использовать этот способ проверки гипотез в реальных экспериментах. Отметим, что по долям 4 маркерных фенотипов $A-B-$, $A-eb$, $aaB-$, $aabv$ в популяции, полученной после первого самоопыления гетерозиготы $AaBb$, можно оценить лишь «усредненную» частоту рекомбинации у этой формы, т. е. невозможно подтвердить или опровергнуть влияние гес-системы. Например, примем, что схема влияния гес-системы (ситуация 2) соответствует предположениям 1-3. Самоопыляем цисгетерозиготу $AaBb$ при определенном исходном соотношении частот гес-генотипов $f_2(RR), f_1(Rr), f_0(rr)$ и r_f для них ($r_2=r_1<r_0$). Несложно проверить аналитически, что доли 4 полученных маркерных фенотипов будут соответствовать долям в ситуации 1 (нет влияния гес-системы), если в качестве r_f , т. е. единой «усредненной» частоты рекомбинации, взять

$$\bar{r} = 1 - \sqrt{(f_2 + f_1) \times (1 - r_2)^2 + f_0 \times (1 - r_0)^2}$$

Аналогично для первого самоопыления трансположения:

$$\bar{r} = \sqrt{(f_2 + f_1) \times r_2^2 + f_0 \times r_0^2}$$

Исследователь не знает, влияет или нет гес-система. Поэтому именно частоту r естественно брать в качестве исходной для сравнения ситуации 1 и ситуации 2 после 2-го, 3-го и т. д. самоопыления в рамках предположений 1-3. Далее, с помощью имитационного моделирования при различных соотношениях $f_2, f_1, f_0, r_2=r_1<r_0$ оценивали расхождения частот маркерных фенотипов для ситуаций 1 и 2 начиная со 2-го самоопыления. При этом удалось также подобрать лучшие индикаторы — час-

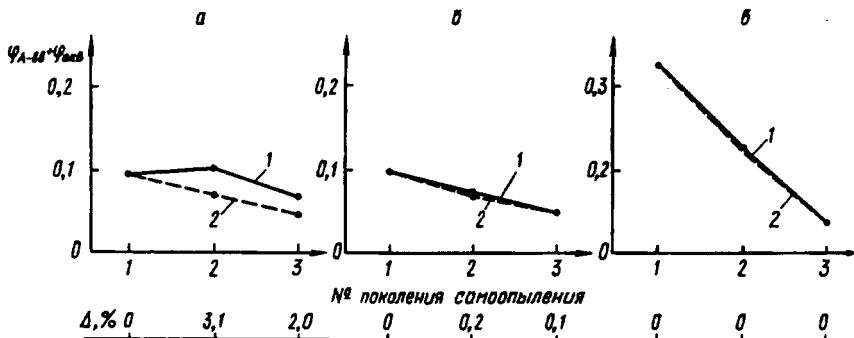


Рис. 1. Разрешающая способность метода прямой идентификации действия гес-системы в поколениях самоопыления цисдигетерозиготы при самых разных соотношениях параметров гес-системы (а, б, в).

1 — динамика частот маркерных фенотипов, если гес-система действует; 2 — то же, но влияние гес-системы отсутствует.

тоты маркерных фенотипов, максимально различающихся в случаях, если гес-система влияет и не влияет на частоту рекомбинации rf .

Для цисположения наилучшим индикатором различий ситуаций 1 и 2 оказалась сумма частот 2 фенотипов $A - vv$ и aaV , особенно если после каждого самоопыления из популяции удалять растения $aaVV$. Но даже в этой схеме имитационного эксперимента различия частот индикатора редко превышали 3% (Δ для графиков (рис. 1)). Этот предел достигался для «вырожденного» варианта $f_2=f_0=0, f_1(Rr)=1$, означающего, что для получения исходной цисдигетерозиготы брались 2 формы: $AABB \times aavv$ с контрастными частотами гес-аллелей (например, $q(r)=0$ и $q(r)=1$). Но даже при 3% различий требуется вырастить до 180 растений после 2-го самоопыления в реальном эксперименте, чтобы обеспечить надежную (95%) индикацию различий ситуаций 1 и 2. Для более естественных соотношений частот гес-генов Δ значительно меньше, причем Δ сокращается после 2-го поколения самоопыления. Таким обра-

зом, для исходного цисположения речь идет о многих сотнях растений в реальном эксперименте. Для исходных трансдигетерозигот наилучшим индикатором оказалась доля фенотипа $aavv$ после каждого самоопыления. Причем различия частот этих фенотипов для ситуаций 1 и 2 еще ниже, чем для цисположения.

Конечно, существуют более сложные гес-системы и схемы наследования гес-генов. Но поскольку этот способ проверки гипотез не показал достаточной разрешающей способности для простой гес-системы (предположения 1—3), его нельзя рекомендовать для применения. Без имитационного моделирования этот вывод вызвал бы сомнения.

Косвенный отбор гес-генов

В процессе описанного имитационного моделирования было выявлено более перспективное направление исследования влияния гес-систем. Оно связано с накоплением гес-генотипов, определяющих повышенную частоту

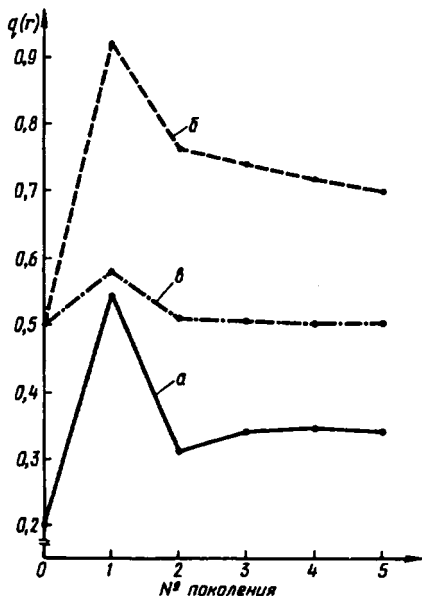


Рис. 2. Динамика изменения частоты (q) аллеля r в поколениях самоопыления маркерных дигетерозигот при следующих исходных условиях:

$$a - \varphi_{AaBb}^{cis} = 0; \varphi_{AaBb}^{trans} = 1; f_2 = 0,65;$$

$$f_1 = 0,30; f_0 = 0,05;$$

$$r_2 = r_1 = 0,05; r_0 = 0,20;$$

$$b - \varphi_{AaBb}^{cis} = 1; \varphi_{AaBb}^{trans} = 0;$$

$$f_2 = 0,33; f_1 = 0,34; f_0 = 0,33;$$

$$r_2 = r_1 = 0,05; r_0 = 0,20;$$

$$в - \varphi_{AaBb}^{cis} = 0; \varphi_{AaBb}^{trans} = 1; f_2 = 0,33;$$

$$f_1 = 0,34; f_0 = 0,33;$$

$$r_2 = r_1 = 0,40; r_0 = 0,50;$$

рекомбинации, в маркерных генотипах, образующихся при объединении 2 кроссоверных гамет. Так, в рамках предположений 1—3 концентрация рецессивного гес-аллеля r (повышающего rf) резко возрастает у растений $AABB$ и $aaavv$ уже после 1-го самоопыления исходной трансдигетерозиготы $AaBv$; аналогично — у растений $AaVv$ $aaBB$ при

самоопылении цисдигетерозиготы (рис. 2, а, б). Несложно понять причину. При самоопылении дигетерозиготы доля этих двойных кроссоверных генотипов равна $rf/2$: Следовательно, при полиморфизме по rf большая часть этих генотипов является потомством дигетерозиготных растений с повышенной частотой $rf=r_0$, т. е. потомством генотипов rr . Дополнительный искусственный отбор определенных маркерных фенотипов значительно повышает эффективность накопления r в обозначенных генотипах в ряду поколений самоопыления. После 2-го, а не после 1-го самоопыления концентрация r повышается только для «вырожденных» вариантов типа $f_2=f_0=0, f_1(Rr)=1$. Накопление r обнаружено при самых различных соотношениях частот гес-генотипов и соответствующих rf . Лишь в ситуациях неконтрастных и близких к 0,5 значений rf , например, $r_2=r_1=0,4, r_0=0,5$, накопления r практически не происходит (рис. 2).

Что касается использования такого подхода в реальных экспериментах, то, во-первых, следует выделять генотипы $AAavv, aaBB, AABV$ (обогащенные r) из фенотипов $A-avv, aaB-, A-B-$. В генотипах $Aavv, aaBv, AaBV, AABv$ аллель r тоже накапливается, но в меньшей степени. Во-вторых, для гарантированного приближения к частоте $q(r)=1$ можно предложить несколько циклов скрещиваний и отборов по схеме, представленной на рис. 3.

Смысл этой схемы, например для исходной цисдигетерозиготы, в следующем:

1. После самоопыления выделяем генотипы $AAavv$ и $aaBB$. Для этого можно использовать контрольное самоопыление фенотипов $A-avv$ и $aaB-$. Но это требует слишком большого объема эксперимента. Поэтому можно предложить дополнительные приемы. В частности, подобрать маркерные аллели

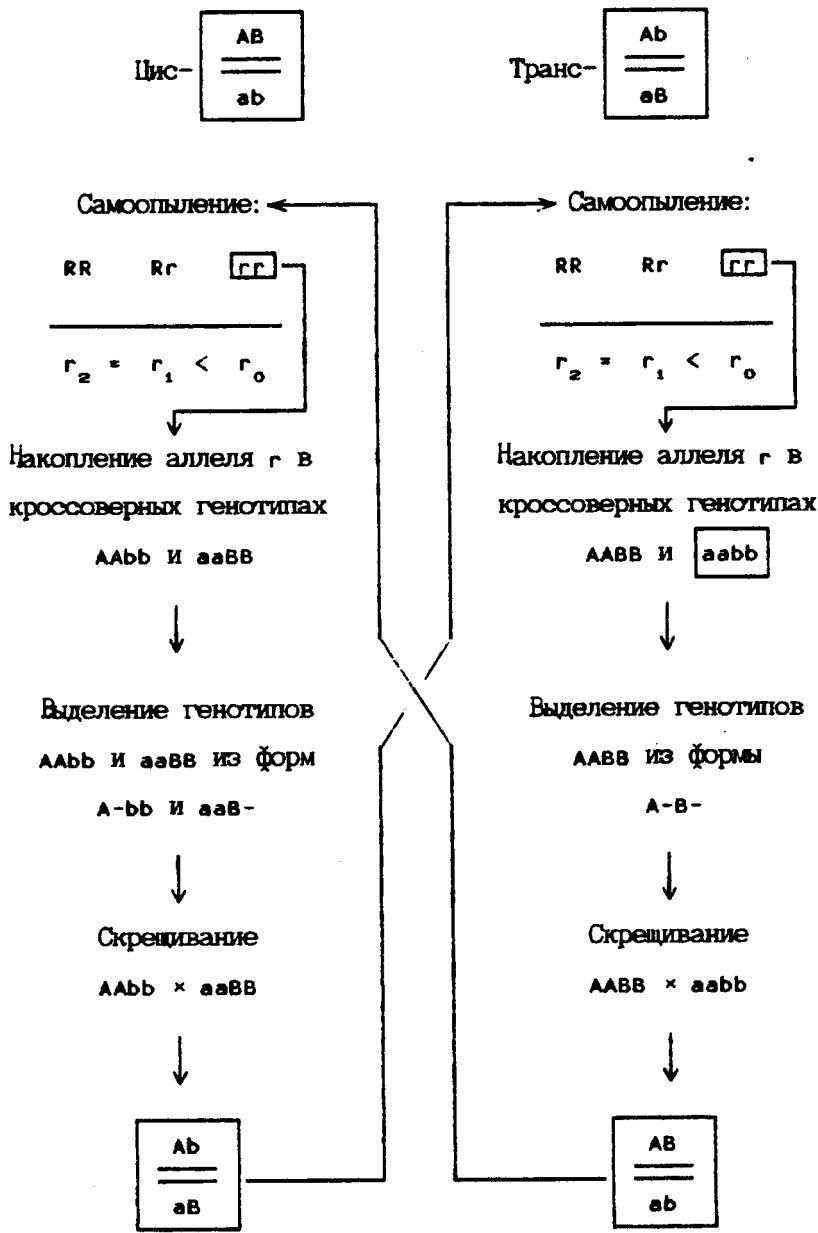


Рис. 3. Циклическая схема накопления аллеля *r* в кроссоверных маркерных генотипах.

A — a и B — b с кодминированием или создать четырехлокусный маркерный генотип, где доминантный аллель A тесно сцеплен с другим, рецессивным (c), а рецессивный a — с доминантным (C). Аналогично B должен быть сцеплен с d , а b — с D . В этих случаях генотипы $AA\bar{b}\bar{b}$ и $aaBB$ выявляются прямо по фенотипам. После выделения $AA\bar{b}\bar{b}$ и $aaBB$ скрещиванием их получаем трансдигетерозиготу $AaBb$.

2. Проводим ее самоопыление, после чего выделяем генотипы $AABB$ и $aa\bar{b}\bar{b}$. Для дальнейшего увеличения доли r -аллеля их следует скрестить, снова получив цисдигетерозиготу, и перейти к пункту 1 циклической схемы (рис. 3).

Схема пригодна и для других ситуаций, если повышенная частота rh обусловлена какими-либо гомозиготными гес-генотипами. В частности, аналогичные выводы были получены при моделировании других схем наследования одного гес-гена, а также при двухлокусной гес-системе, если повышенная степень rf связана с двойной рецессивной гомозиготой. Установлено, что эта схема отбора (рис. 3) пригодна не только для перекрестников, но и для самопылителей. При наличии дополнительной информации о степени сцепления между маркерными локусами и о генотипической структуре исследуемых форм имитационное моделирование может давать более конкретные рекомендации по отбору высокорекомбинантных генотипов.

Получаемые таким образом формы с повышенной частотой рекомбинации можно использовать либо непосредственно в качестве донора повышенной rf , либо, в частности, использовать форму $aa\bar{b}\bar{b}$ (на рис. 3 в рамке) для анализирующих скрещиваний инбредных форм типа $AABB$ с целью прямой индикации влияния инбридинга на гес-систему. Последний вариант необходим также на заключительном этапе реали-

зации схемы в эксперименте по накоплению и выделению высокорекомбинантных форм растений.

Выводы

Несмотря на упрощенные варианты предположений о генотипической и фенотипической структуре в имитационной модели, можно сформулировать некоторые обобщенные рекомендации экспериментатору, изучающему закономерности влияния гес-системы у перекрестноопыляемой или самоопыляемой культуры.

1. Прямая индикация влияния гес-системы (с помощью анализирующего скрещивания или самоопыления отдельных растений) может быть ненадежной или потребует слишком большие объемы экспериментов даже при простейших системах наследования rf .

2. Предложенная схема косвенного отбора гомозиготных гес-генотипов, повышающих rf , эффективна в ситуациях достаточно тесного сцепления маркерных локусов.

3. Имитационное моделирование позволяет существенно повысить степень конкретности рекомендаций по продолжительности, объемам и схемам реальных экспериментов с гес-системами, если есть дополнительная информация об экспериментальном материале (средняя степень сцепления маркерных локусов и гомозиготности исходных форм, различия по rf у высоко- и низкорекомбинантных форм и т. д.).

4. Предварительное генетико-математическое моделирование позволяет по крайней мере отбросить схемы с недостаточной надежностью и наметить более эффективные способы идентификации влияния гес-систем и пути выделения гес-генотипов, представляющих интерес для генетиков и селекционеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз). Кишинев: Штиинца, 1980. — 2. Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука, 1985. — 3. Федин М. А., Силис Д. Я., Смирнов А. В. Статистические методы генетического анализа. М.: Колос, 1980. — 4. Baker V. S., Hall J. S. — In: The genetics and biology of *Drosophila*. L., 1976, p. 351—434. — 5. Deilefsen J. A., Roberts E. — *J. Exp. Zool.*, 1921, vol. 32, p. 333—354. — 6. Hinton C.W. — *Canad. J. Genet. Cytol.*, 1967, vol. 8, p. 711-716. — 7. Kidwell M.G. — *Genetics.*, 1972, vol. 70, p. 419—443. — 8. Nel P. M. — *Genetics.*, 1975, vol. 79, p. 435—450.

Статья поступила 1 июля 1993 г.

SUMMARY

Genetic-mathematical modelling of the effect of genes-modifiers of recombination frequency (res-genes) on dynamics of genotypic and phenotypic structure of artificial populations appearing with different schemes of the experiments on studying res-systems has been carried out. Disadvantages of usual schemes (analyzing crossings, inbreeding) have been disclosed. New variants of efficient accumulation and selection of plant forms with increased recombination frequency are suggested.