

УДК 631.524.01.001.57

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИСКАЖЕНИЙ ЧАСТОТЫ КРОССИНГОВЕРА В МНОГОЭТАПНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

А.В. СМИРЯЕВ, И.М. НЕЧАЕВ, И.В. РОГОЖИНА

(Кафедра генетики)

Проведено генетико-математическое моделирование влияния различных типов естественного отбора рекомбинантных маркерных гамет и зигот, а также дрейфа генов на оценки частоты рекомбинации (rf) в циклической схеме накопления высокорекомбинантных форм растений, предложенной ранее [11]. Для разных вариантов установлены характер и степень расхождения оценок rf и частоты кроссинговера. Моделирование позволяет идентифицировать по динамике rf некоторые типы отбора, оптимизировать объемы скрещиваний и число циклов накопления.

Ранее с помощью генетико-математического моделирования была доказана низкая эффективность обычных схем и объемов экспериментов (анализирующих скрещиваний, инбридинга) для прямой индикации влияния гес-генов на частоту кроссинговера, т.е. для проверки наличия полиморфизма гес-генов у высших растений [11]. Предложенная в той же работе циклическая схема накопления гес⁺-генов, определяющих повышенную частоту кроссинговера на маркированных участках хро-

мосом, основывается на ряде упрощающих предположений.

В частности, предполагалось, что нет естественного отбора гамет и зигот, рекомбинантных по маркерным генам. Кроме того, объем искусственных популяций, возникающих при реализации схемы, считался настолько большим, что влиянием дрейфа генов на эффективность схемы накопления высокорекомбинантных форм можно пренебречь.

Отбор и дрейф влияют на оценки частоты рекомбинации (rf) в генетическом анализе, хотя они и не

связаны прямо с изменчивостью частоты кроссинговера на маркированных участках хромосом. В результате может существенно снизиться эффективность генетического анализа и, в частности, могут исказиться выводы о формах, выделенных по схеме накопления, если судить только по сдвигам rf в процессе ее реализации. Разработанные статистические методы оценки подобных ошибок [5, 8] пригодны лишь для простейших схем скрещиваний и отборов, ограниченных одним-двумя поколениями. Статистический характер ошибок в многоэтапных селекционных и генетических экспериментах, где искажения на следующем этапе зависят от всех предыдущих, настолько сложен, что единственным приемлемым средством оценки их влияния остается моделирование всего эксперимента на ЭВМ.

Целью работы является изучение влияния естественного отбора маркерных гамет и зигот, а также дрейфа генов на эффективность многоэтапной циклической схемы накопления высокорекомбинантных форм. Метод решения задачи — генетико-математическое моделирование различных ситуаций отбора и дрейфа, возникающих в процессе реализации схемы.

Гаметный и зиготный отбор

В литературе есть сведения, что чаще элиминируют именно рекомбинантные гаметы и зиготы, хотя возможны исключения. Среди причин элиминации одной из основных можно назвать нарушение их сбалансированности [4], т.е. гибридные участки ДНК дестабилизируют ге-

нетическую систему в целом, что приводит к летальности или снижению приспособленности рекомбинантов. Другой причиной может являться плейотропное действие генов, вызывающих изменение морфофизиологических признаков, на жизнеспособность, фертильность пыльцы и яйцеклеток. Связь такого рода называют $m-v$ -сцеплением (*morphology-viability linkage*) [13, 14]. Пониженная жизнеспособность рекомбинантных гамет и зигот может быть вызвана нарушениями в мейозе, например, если при образовании гибридных молекул ДНК не происходит точного спаривания между нуклеотидами, что приводит к несбалансированности процессов транскрипции и трансляции [3]. Жесткость отбора рекомбинантных гамет и зигот зависит от локализации сегмента хромосомы, где происходит кроссинговер. Если речь идет о блоках коадаптированных генов, детерминирующих жизненно важные функции организма, то любое неадаптивное изменение приведет к значительным нарушениям хода онтогенеза и снижению приспособленности.

Пониженная приспособленность рекомбинантных гамет может проявляться по-разному. Это и меньшая конкурентоспособность пыльцевых трубок при их прорастании, и элиминация спермиев после оплодотворения и т.д. Скорость роста пыльцевых трубок может зависеть не только от генотипа отцовской, но и материнской формы [8, 16].

Иногда элиминация гамет определяется несложной генетической системой. В опытах [17] установлено, что наблюдаемые у томатов откло-

нения от менделевских соотношений в F_2 по генам 4-й хромосомы обусловлены сцеплением с гаметным элиминатором g_e (g_e расположено рядом с W , $W-4$, ful), который локализован близко или в самом проксимальном участке гетерохроматина этой хромосомы. Данный ген имеет 3 аллельных состояния (g_e^c , g_e^n , g_e^p). Различия приспособленности гамет обусловлены разной пенетрантностью аллелей гаметного элиминатора g_e .

Элиминация рекомбинантных ДНК может происходить как на гаметном, так и на постсингамном уровне, т.е. на уровне зигот. В связи с этим различают гаметическую и зиготическую стерильность [15, 18].

Мужские и женские рекомбинантные зиготы часто имеют неодинаковую жизнеспособность. В опытах с томатами [17] показано, что мужские рекомбинантные гаметы подвергаются более жесткому отбору, чем женские. Этот факт был установлен при проведении реципрокных скрещиваний. Так как на результаты расщепления в F_2 влияет целый комплекс причин, они могут накладываться друг на друга.

Дифференцированная выживаемость зигот в большинстве случаев проявляется на ранних стадиях развития растений (элиминация гибридных зародышей и эндоспермов, гибель рекомбинантов на стадии проростков). Так, по имеющимся сведениям [19], ген hr в значительной степени снижает жизнеспособность семян томата. Нереккомбинантные генотипы в большинстве случаев более приспособлены, чем рекомбинантные [12], и поддержи-

ваются отбором. Формирование жизнеспособных зародышей и эндосперма, как правило, связано с различными нарушениями в мейозе [3].

Таким образом, важными факторами влияния на gf могут быть отбор гамет на постмейотических стадиях до созревания пыльцы и от созревания до оплодотворения яйцеклеток, а также отбор зигот от оплодотворения до проявления мутантных признаков на растениях популяции потомков. Желательно идентифицировать это влияние в процессе реализации циклической схемы накопления высокорекомбинантных форм [11]. Дифференцированная приспособленность рекомбинантных и нерекомбинантных маркерных гамет и зигот здесь особенно важна. Во-первых, в каждом полуцикле реализации схемы выделяют, скрещивают и переопыляют только генотипы, рекомбинантные по отношению к исходным дигетерозиготам. Именно в них происходит наиболее быстрое накопление gsc^+ -генотипов, повышающих частоту кроссинговера. Во-вторых, эффективность схемы на промежуточных ее этапах желательно оценивать без дополнительных экспериментов — только на основе изменения оценки частоты gf , значения которой в каждом полуцикле определяются по соотношению долей рекомбинантных и нерекомбинантных фенотипических маркерных классов, полученных после очередного переопыления. Ясно, что это соотношение зависит не только от частоты кроссинговера на маркированном участке, но и от браковки рекомбинантных гамет и зигот.

Моделирование влияния естественного отбора гамет

В ходе изучения влияния на gf отбора, направленного против рекомбинантных маркерных гамет, предполагалось, что частота кроссинговера на маркированном участке $A - B$ постоянна (0,2) и что бракуется часть мужских рекомбинантных гамет (женские гаметы имеют равную приспособленность). Последнее предположение обусловлено тем, что при сходной браковке женских и мужских рекомбинантных гамет результаты аналогичны браковке рекомбинантных зигот (см. ниже) при «мультипликативной» приспособленности составляющих их гамет. Это несложно показать аналитически.

Исследователь, как правило, не знает, каков именно характер естественного отбора рекомбинантных гамет в конкретном эксперименте. Поэтому в модели были формализованы различные варианты, выявленные при изучении литературных данных и включающие предположения об одном, не сцепленном с A и B локусе W , влияющем на отбор по схеме полного доминирования:

а) у пыльцеобразующих растений с генотипами WW и Ww бракуется S -я доля рекомбинантных по маркерам A и B мужских гамет, у растений ww браковки не происходит;

б) отбор зависит от аллельного состояния локуса W у спермиев: бракуется и не участвует в оплодотворении яйцеклеток S -я доля пыльцевых зерен, несущих аллель W и рекомбинантные сочетания маркерных аллелей. Рекомбинантная пыльца с аллелем w не бракуется;

в) отбор зависит от генотипа опы-

ляемого растения: S -я доля пыльцевых зерен, несущих рекомбинантные сочетания, не участвует в оплодотворении яйцеклеток и формировании семян следующего поколения, если опыляемое растение имеет генотип WW или Ww ; в формировании семян у опыляемых генотипов ww с равной вероятностью участвуют как рекомбинантная по маркерам, так и нерекомбинантная пыльца.

Предполагается, что семенная продуктивность любого генотипа одинакова (или для посева у родителей берется равное число семян) и, в частности, не зависит от характера браковки мужских гамет.

Введение в модель влияния локуса W обусловлено двумя причинами. Во-первых, известно, что отбор гамет может зависеть от «генетической среды». Во-вторых, ясно, что в процессе реализации циклической схемы накопления [11] различные генотипы по локусу W подвергаются отбору, аналогичному генотипам по гес-локусу при полном доминировании гес-аллеля, снижающего частоту кроссинговера. А именно: предпочтение отдается дигетерозиготам с генотипом ww , так как в их потомстве (так же, как в потомстве генотипов gf с повышенной частотой кроссинговера) максимальна доля двойных рекомбинантных генотипов, образовавшихся при объединении двух кроссоверных гамет и отбираемых в каждом полуцикле схемы накопления. Возникает вопрос: можно ли на основе только изменений gf , проявляющихся по полудиклам схемы накопления, разделить хотя бы 2 «крайние» ситуации: в первой работает только гес-система, влияющая на частоту крос-

синговера, во второй на gf влияет только гаметный отбор с учетом локуса W .

Каждый из вариантов (*a*, *b*, *v*) моделировался отдельно для растений-самоопылителей и перекрестников (в последнем случае вместо самоопыления дигетерозигот в схеме накопления — перекрестное опыление). Кроме того, для каждого варианта проанализированы последствия дополнительных предположений относительно отбора «обратных» рекомбинантных гамет. Например, напомним, что при исходной цис-дигетерозиготе оставляют после первого полуцикла схемы накопления только транс-дигетерозиготы. Возникающие далее при их выращивании (во втором полуцикле) в процессе микрогаметогенеза гаметы AB и ab — рекомбинантные по отношению к этим транс-дигетерозиготам, но нерекомбинантные по отношению к исходным цис-дигетерозиготам. Среди прочих возможны 2 крайних предположения:

ВП — полное восстановление приспособленности этих «обратных» рекомбинантных гамет AB и ab . Это означает, что браковке во втором полуцикле схемы могут быть подвергнуты (с учетом W), как и в первом, только гаметы Ab и aB , хотя они нерекомбинантны по отношению к материнским транс-дигетерозиготам, исходным для второго полуцикла. Это предположение соответствует, например, пониженной приспособленности мужских гамет с сочетанием аллелей Ab , aB из-за неудачного сочетания самих этих аллелей или других, тесно сцепленных с ними.

ПП — пониженная приспособленность рекомбинантных гамет по

отношению к исходной форме очередного полуцикла реализации схемы накопления (с учетом W -локуса). В этом случае в первом полуцикле (например, исходные цис-дигетерозиготы) браковка может повлиять только на сочетания Ab , aB , а во втором (трансисходные) — только на AB , ab . Это соответствует, например, ситуации, когда в результате естественного отбора в первом полуцикле схемы накопления сохранились лишь те рекомбинантные гаметы (Ab , aB), которые несут удачное сочетание не сцепленных с A и B генов-модификаторов. Их разрушение при рекомбинации в следующем полуцикле снова приведет к браковке рекомбинантных гамет AB и ab и т.д.

Основным параметром в ходе генетико-математического моделирования влияния как гаметного, так и зиготного отбора была принята gf_1 — «наблюдаемая» частота рекомбинации, оцениваемая по I . Последняя величина равна отношению произведений долей двух рекомбинантных и двух нерекомбинантных фенотипических маркерных классов, полученных при переопылении дигетерозиготы в каждом полуцикле схемы. Переход от I к gf_1 производится по таблице Иммера [8]. В отсутствие дифференцированной приспособленности гамет или зигот показатель I соответствует постоянной частоте кроссинговера (0,2). Из-за влияния отбора гамет или зигот величина I на разных полуциклах реализации схемы накопления может соответствовать как большей, так и меньшей по сравнению с 0,2 частоте gf_1 . Это проявилось при моделировании в предположении

ВП — восстановления приспособленности гамет.

Кроме gf_1 анализировали изменение частоты аллеля w , который, по введенным предположениям, связан с отсутствием браковки мужских рекомбинантных гамет.

Для реализации вариантов a , b , ϵ в ситуациях отдельно перекрестноопыляемых и самоопыляемых растений были разработаны специальные ЭВМ-программы на языке TURBO PASCAL 5.0. Отметим, что для самоопылителей варианты a и ϵ совпадают по результатам воздействия отбора против рекомбинантных гамет, так как генотипы пыльцеобразующего и опыляемого растений при самоопылении совпадают.

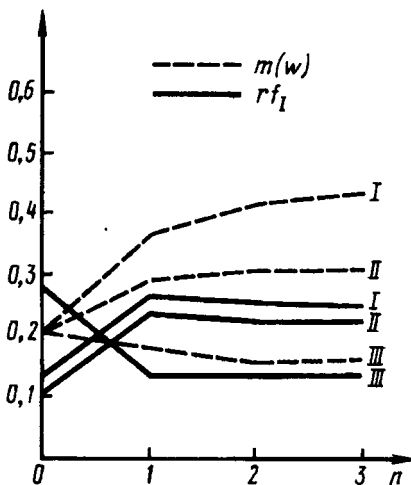


Рис. 1. Зависимость gf_1 и частоты аллеля w [$m(w)$] от исходных параметров и числа последовательных переопылений ($n = 1, 2, 3$) дигетерозигот на первом этапе одного полуцикла в предположении восстановления приспособленности мужских рекомбинантных гамет при обратной рекомбинации.

I — вариант b гаметного отбора, первый полуцикл схемы накопления, перекрестное опыление, $S = 0,8$; II — вариант b , первый полуцикл, самоопыление, $S = 0,5$; III — вариант a , второй полуцикл, самоопыление, $S = 0,5$.

В предположении ВП результаты моделирования первого полуцикла схемы накопления при различных исходных соотношениях частот трех генотипов $h_2(WW)$, $h_1(Ww)$, $h_0(ww)$, S -коэффициента отбора рекомбинантных гамет, а также при исходных цис- или транс-дигетерозиготах дают следующие качественно сходные результаты.

Показатель gf_{10} для исходных дигетерозигот, оцененный по I в потомстве их переопыления, ниже 0,2, а для дигетерозигот, полученных по окончании первого полуцикла схемы накопления, gf_1 выше 0,2. В вариантах a и ϵ проявляются большие снижение и увеличение gf_1 (нижнее иногда до 0,1, верхнее — до 0,4), чем в варианте b (0,15—0,26). Накопление аллеля w в варианте b , напротив, идет быстрее, особенно при больших коэффициентах отбора S . Если проводить не одно, а несколько последовательных переопылений и только после этого получить дигетерозиготы для следующего полуцикла, то их gf_1 сильнее не увеличивается, но несколько увеличивается доля w . Примеры для варианта b при перекрестном опылении и самоопылении приведены на графиках (рис. 1). Колебания основных изучаемых параметров существенно зависят от S , но мало — от способа опыления. В общем характер изменения параметров схемы сходен во всех рассмотренных вариантах и для разных соотношений h_2, h_1, h_0 .

Моделировали также вместе первый и второй полуциклы реализации схемы накопления, т.е. при исходных для первого полуцикла транс-дигетерозиготах, после первого полуцикла исходные для вто-

рого полуцикла цис-дигетерозиготы, после второго полуцикла — транс-дигетерозиготы или, наоборот, цис-транс-цис. При восстановлении приспособленности (ВП) мужских гамет в связи с «обратной» рекомбинацией моделирование показало, что gf_1 для полученных после второго полуцикла дигетерозигот (соответствуют исходным первого этапа) снова снижается, хотя и не до первоначального gf_1 . Это связано с изменением частот h_2 , h_1 , h_0 . Частота аллеля w снижается. Пример для второго полуцикла в варианте a приведен на рис. 1. Общая качественная картина слабозатухающих колебаний gf_1 за несколько полуциклов в предположении ВП представлена на рис. 2. Подобные колебания в процессе реализации схемы накопления маловероятны, если действует только гес-система.

Если же приспособленности мужских гамет регулярно снижены (предположение ПП) при каждой новой рекомбинации, то «наблюдаемые» изменения параметров gf_1 и доли аллеля w подобны динамике

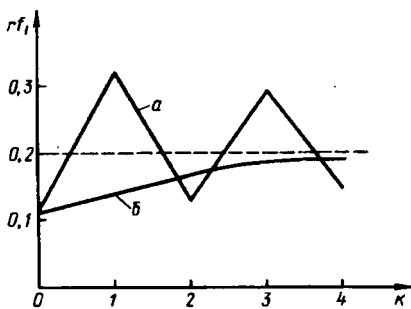


Рис. 2. Типичные зависимости gf_1 от числа полуциклов схемы накопления при гаметном отборе.

a — восстановление приспособленности при обратной рекомбинации; b — пониженная приспособленность после любой рекомбинации.

при отборе рецессивного гес⁺-аллеля, повышающего частоту кроссинговера [11], т.е. «наблюдаемая» после первого полуцикла частота рекомбинации становится выше исходной оценки gf_1 , но ниже 0,2, а доля аллеля w несколько возрастает. Такая тенденция, естественно, сохраняется и в последующих полуциклах схемы накопления до тех пор, пока частота w не приблизится к единице ($h_0(ww) = 1$), gf_1 — к 0,2 (рис. 2). В подобных случаях трудно по динамике gf_1 отличить отбор гес⁺-и w -аллеля.

Кроме ситуаций с полным восстановлением приспособленности (ВП), когда по колебаниям gf_1 , по видимому, можно распознать отбор против рекомбинантных мужских гамет, и ситуаций без восстановления (ПП), которые трудно отличить от влияния гес-системы на частоту кроссинговера, возможны также варианты с частичным восстановлением (меняется S по полуциклам). Им соответствуют «промежуточные» картины изменений параметров, которые в реальном эксперименте могут возникнуть также из-за ограниченного объема опытов во всех полуциклах (см. ниже).

Моделирование влияния естественного отбора зигот

Так же, как при гаметном отборе, здесь предполагалось, что частота кроссинговера на участке А — В постоянна (0,2). Бракуется S_1 -доля «одиночных» рекомбинантных зигот, образующихся при объединении одной рекомбинантной по маркерам гаметы и одной нерекомбинантной гаметы, а также S_2 -доля «двойных» рекомбинантных зигот, образующихся при объединении

двух рекомбинантных гамет. Если зигота — объединение двух нерекомбинантных гамет, то $S_0 = 0$. Например, при исходных цис-дигетерозиготных растениях в их потомстве отбору с коэффициентом S_1 подвер-

гаются зиготы $\frac{Ab}{ab} \frac{aB}{ab} \frac{AB}{aB} \frac{AB}{Ab}$, с ко-

эффициентом S_2 — $\frac{Ab}{Ab} \frac{aB}{aB}$ и $\frac{Ab}{aB}$.

Основными параметрами были «наблюдаемые» частоты gf_1 — как и для гаметного отбора.

В результате аналитического моделирования установлено, что только по долям рекомбинантных и нерекомбинантных фенотипических классов, полученных при переопылении исходных дигетерозиготных растений и естественном отборе зигот, не всегда возможно определить, действительно ли происходит отбор против рекомбинантных зигот. А именно: для многих сочетаний S_1, S_2 и частоты кроссинговера (например, 0,2) можно подобрать такое значение $gf_1 \neq 0,2$ без отбора ($S_1 = S_2 = 0$), что частоты рекомбинантных и нерекомбинантных классов в потомстве (после переопыления дигетерозигот) для этих двух ситуаций в точности совпадут. Даже если точного соответствия подобрать нельзя, эти частоты настолько близки, что в реальных по объему экспериментах, например с томатом, достоверная идентификация невозможна, особенно при истинных значениях кроссинговера меньше 0,3.

Например, при $S_1 = S_2 = 0,5$ и частоте кроссинговера 0,2 в результате самоопыления маркерных цис-дигетерозиготных растений должны

получиться следующие частоты классов потомства: $\varphi(A-B-) = 0,695$, $\varphi(A-bb) = 0,055$, $\varphi(aaB-) = 0,055$, $\varphi(aabb) = 0,195$. Показатель $I = 0,022$, что соответствует $gf_1 = 0,115$. Если же частота кроссинговера равна 0,115, отбора гамет и зигот нет, то частоты четырех классов очень близки предыдущим: $\varphi(A-B-) = 0,696$, $\varphi(A-bb) = 0,054$, $\varphi(aaB-) = 0,054$, $\varphi(aabb) = 0,196$. Если провести анализирующее скрещивание цис-дигетерозигот, то при $S_1 = S_2 = 0,5$ и частоте кроссинговера 0,2 получаем: $\varphi(A-B-) = 0,445$, $\varphi(A-bb) = 0,055$, $\varphi(aaB-) = 0,055$, $\varphi(aabb) = 0,445$. Без отбора эти доли по I соответствуют $gf_1 = 0,111$.

Подобные рассуждения справедливы для анализа потомства дигетерозигот в одном из полуциклов. Возможно, удастся различить действие гес-системы на частоту кроссинговера и влияние зиготного отбора, сравнивая величины gf_1 нескольких последовательных полуциклов реализации схемы накопления. Для проверки подобных подходов было проведено моделирование на ЭВМ отбора против рекомбинантных зигот. Предполагалось, что наличие или отсутствие зиготного отбора (по аналогии с гаметным) зависит от аллельного состояния одного локуса W . Поскольку характер естественного отбора рекомбинантных зигот в эксперименте, как правило, неизвестен, моделировались 3 различных варианта, соответствующих схеме полного доминирования по этому локусу:

a — отбор зависит от генотипа материнского растения: бракуется (не участвует в оценке I по потомству) S_1 — доля «одинарных» и S_2 — доля «двойных» рекомбинан-

тных зигот, образовавшихся после оплодотворения яйцеклеток на материнских растениях с генотипом WW и Ww . Если генотип материнского растения ww , то отбора зигот нет.

б — отбор зависит от генотипа триплоидного эндосперма семени, завязавшегося на материнском растении, по схеме полного доминирования: бракуются семена с рекомбинантными маркерными генотипами (доли браковки S_1 и S_2), если генотип эндосперма WWW , WWw или Www . Если генотип эндосперма www , то отбора нет.

в — отбор зависит от генотипа самой зиготы-потомка: рекомбинантные по маркерм зиготы, несущие генотип WW или Ww , менее жизнеспособны и частично бракуются до оценки I (доля браковки S_1 , S_2); зиготы ww , как рекомбинантные, так и нерекомбинантные, имеют равную жизнеспособность.

Так же, как при гаметном отборе, моделировались самоопыление, перекрестное опыление, полное восстановление приспособленности (ВП) зигот при «обратной» рекомбинации и понижение приспособленности (ПП) рекомбинантов на любом полуцикле реализации схемы накопления. Рассматривались различные сочетания h_2 (WW), h_1 (Ww), h_0 (ww) и S_1 , S_2 для исходных цис- или транс-дигетерозигот. Кроме gf_1 , как при гаметном отборе, анализировались изменения доли аллеля w .

В процессе формализации вариантов выяснилось, что у покрытосеменных растений динамика частот изучаемых популяций, возникающих при реализации циклической схемы накопления, одинакова для

вариантов *б* и *в*. Причина в том, что диплоидная центральная клетка, из которой при объединении со спермием образуется триплоидный эндосперм, имеет тот же генотип, что и яйцеклетка, так как ядра, участвующие в их формировании, образуются митотическим делением из одной макроспоры (например, центральное ядро — WW , яйцеклетка — W). Два спермия одного пыльцевого зерна, участвующего в двойном оплодотворении одного зародышевого мешка, также образовали митозом — имеют одинаковый генотип. Поэтому при полном доминировании у семян с эндоспермом WWW , WWw или wwW в варианте *б* зародыши, имеющие генотипы WW , Ww , wW (вариант *в*). Подобные диплоидные генотипы зародыша и триплоидные эндосперма, по предположениям *б* и *в*, оказывают одинаковое влияние — отбор (S_1 , S_2) рекомбинантных маркерных зигот зародыша. Аналогично зародыш с генотипом ww всегда находится в семени с эндоспермом www , и в этом случае отбора против рекомбинантов нет как в варианте *б*, так и в варианте *в*.

Пример результатов моделирования для первого полуцикла схемы при самоопылении и перекрестном опылении в предположении ВП приведен на рис. 3. Характер изменения gf_1 и частоты аллеля w (w) сходен с аналогичным гаметным отбором и с действием гес-системы при полном доминировании гес-аллеля. При других соотношениях исходных параметров результаты также сходны: частота gf_1 перед первым полуциклом ниже 0,2, после первого — выше, особенно если отбор рекомбинантных гомозигот проводить

после первого переопыления. Исключение представляет соотношение $h_2 = 0, h_1 = 1, h_0 = 0$. Здесь максимальное повышение gf_1 наблюдается после второго переопыления. Рост частот gf_1 и $m(w)$ (последняя — сильнее после двух-трех переопылений) пропорционален жесткости отбора и градиенту исходных частот h_2, h_1, h_0 .

Качественные выводы моделирования второго полуцикла схемы накопления с восстановлением приспособленности рекомбинантных зигот аналогичны результатам при

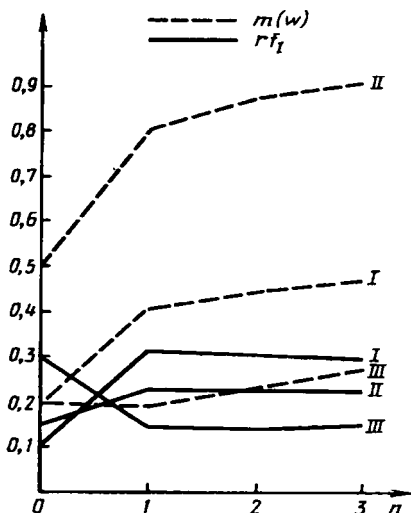


Рис. 3. Зависимость gf_1 и частоты m аллеля w от исходных параметров и числа последовательных поколений переопыления ($n = 1, 2, 3$) в ситуациях зиготного отбора для вариантов b и $в$ с восстановлением приспособленности.

I — первый полуцикл схемы накопления, исходные цис-дигетерозиготы, в них $h_2(WW) = 0,65, h_1(Ww) = 0,30, h_0(ww) = 0,05$, жесткость браковки: $S_2 = 0,9, S_1 = 0,5$, перекрестное опыление: *II* — первый полуцикл, цис-исходные, $h_2 = 0,33, h_1 = 0,33, h_0 = 0,33, h_2 = 0,33, S_2 = 0,8, S_1 = 0,4$, самоопыление; *III* — второй полуцикл, транс-исходные, $h_2 = 0,65, h_1 = 0,30, h_0 = 0,05, S_2 = 0,3, S_1 = 0,7$, самоопыление.

гаметном отборе: gf_1 после второго полуцикла становится ниже 0,2, но несколько выше исходного значения gf_1 перед первым полуциклом (рис. 3). Если восстановления приспособленности не происходит, т.е. рекомбинантные зиготы ослаблены в каждом полуцикле, картина изменения gf_1 аналогична первому и второму полуциклам схемы отбора на повышенную частоту кроссинговера: gf_1 довольно быстро приближается «снизу» к 0,2, что связано с приближением к единице частоты аллеля w , определяющего отсутствие отбора. Качественно картина динамики gf_1 за несколько этапов циклической схемы накопления аналогична картине при гаметном отборе (рис. 2), но затухание колебаний gf_1 при ВП обычно идет быстрее. В действительности возможно одновременное действие зиготного и гаметного отборов и гес-системы, частичное (а не полное) восстановление или даже небольшое снижение по полуциклам приспособленности гамет или зигот при «обратной» рекомбинации, снижение жесткости (S) их отбора и т.д. Динамика наблюдаемой в эксперименте частоты рекомбинации gf_1 будет зависеть от соотношения влияний таких факторов.

Для варианта без отбора гамет и зигот, кроме крайних ситуаций строгого самоопыления и перекрестного опыления дигетерозигот на первом этапе каждого полуцикла, оценивалась эффективность схемы накопления с использованием различной степени инбридинга при их скрещивании. Моделирование показало, что эффективность схемы возрастает при большей степени инбридинга. Следовательно, даже для пере-

крестноопыляемых культур следует организовывать скрещивание дигетерозигот по схеме с определенной степенью инбридинга.

Моделирование влияния стохастической изменчивости

В основе названных выше частей работы по моделированию на ЭВМ лежали модификации детерминистических генетико-популяционных моделей [10], пригодных для описания структуры больших по объему искусственных популяций, возникающих при самоопылении, отборе, анализирующих скрещиваниях и т.д. маркерных форм. Однако в реальных экспериментах с сельскохозяйственными растениями (особенно в теплицах) объемы искусственных популяций не могут быть настолько большими, чтобы пренебречь стохастической изменчивостью частот генов и генотипов (дрейф генов). Этого фактора достаточно для возникновения расхождений между частотой кроссинговера и gf_1 , оцениваемой по численности рекомбинантных и нерекомбинантных маркерных фенотипических классов, полученных при самоопылении дигетерозигот или в анализирующих скрещиваниях. Расхождения gf_1 и частот кроссинговера могут существенно исказить результаты генетического анализа в процессе реализации многоэтапной циклической схемы накопления высокорекомбинантных форм. Необходимо доказывать достоверность повышения gf в таком эксперименте с учетом случайных ошибок, возникающих из-за дрейфа генов. Известные несложные статистические оценки подобных ошибок [5] при-

годны лишь для простых схем скрещиваний и отборов, ограниченных одним-двумя поколениями. Хотя существует разработанная математическая теория так называемых ветвящихся случайных процессов [9], на ее основе весьма сложно получить в явном виде формулы для ошибок gf_1 в многоэтапных генетических опытах, где расхождения gf_1 и частоты кроссинговера на следующем этапе зависят от объемов экспериментов и расхождений на всех предыдущих.

Приемлемым средством изучения влияния стохастической изменчивости на результаты является многократно повторенное имитационное моделирование всего эксперимента на ЭВМ методом Монте-Карло [1] с последующей оценкой доли «успешных» результатов. Для схемы накопления высокорекомбинантных форм это доля или вероятность достоверной индикации повышения gf в популяции, полученной после определенного полцикла, по сравнению с gf для исходных дигетерозигот, если у них был полиморфизм по гес-генам. Моделирование, как и в предыдущих разделах, велось в рамках упрощающих предположений [11]. В частности, гес-система состоит из одного локуса с двумя аллелями: доминантным R и рецессивным r, соответственно снижающим и повышающим частоту рекомбинации между локусами A и B.

«Неуспех» как однократного компьютерного, так и реального эксперимента, состоящего из нескольких полциклов, возможен, в частности, по следующим причинам:

— слабое повышение или даже снижение gf , вызванное неудачным стохастическим отклонением gf в

предыдущих полуциклах или просто ошибкой gf_1 в малой выборке (сравнение исходной и результирующей после нескольких полуциклов частот gf_1 , например, по обычному t -критерию [6], не покажет достоверного повышения gf_1);

— случайная фиксация гес⁻-аллеля (R) в одном из полуциклов, что возможно при малой исходной частоте гес⁺-аллеля (r) и небольшом объеме выборки (отклонение оценки gf любого следующего полуцикла по отношению к исходной частоте gf_1 скорее всего окажется незначимым);

— одна из «тупиковых» ситуаций, при которой дальнейшее проведение многоэтапного эксперимента невозможно. Например, в очередном полуцикле на этапе самоопыления дигетерозигот из-за малой выборки потомства нет растений одного из фенотипических маркерных классов, необходимых для оценки gf или для создания форм, используемых на следующем этапе эксперимента.

Описанный подход моделирования методом Монте-Карло влияния стохастической изменчивости на эффективность накопления высококомбинантных форм был реализован в ЭВМ-программе на языке TURBO PASCAL 5.0.

Для разнообразных соотношений объемов выборок и gf моделировался эксперимент, подобный начатому в 1993 г. в теплице лаборатории индуцированного рекомбиногенеза НИЧ ТСХА с целью реализации схемы накопления. Для эксперимента удалось подобрать исходные мутантные формы томата, где доминантный аллель В тесно сцеплен с рецессивным d, а аллель b с D, благо-

даря чему генотип Bb отличается по фенотипу от генотипа BB. В результате удается сократить на одну генерацию продолжительность каждого полуцикла — совместить этап выделения нужных гомозигот и этап их скрещивания. Вместо контрольного самоопыления форм A-bb или A-BB проводят скрещивания ♀A-bb × ♂aaBB или ♀A-BB × ♂aabb. По фенотипам потомства каждого скрещивания на ранних стадиях развития (все мутации проявляются на стадии 2—3 настоящих листьев) бракует семьи с материнскими формами Aabb или AaBB. Оставшиеся потомки являются дигетерозиготами AaBb, необходимыми для следующего полуцикла.

Исходными параметрами при моделировании на ЭВМ являлись частоты и допустимые численности растений томата (на любом этапе не более 10—15 ящиков по 2—3 взрослых растения или по 50 проростков в ящике):

— частоты трех гес-генотипов $f_2(RR)$, $f_1(Rr)$, $f_0(rr)$ в популяциях по гес-генам исходных цис- или трансдигетерозигот и соответствующие частоты кроссинговера на участке A — B (r_2 , r_1 , r_0);

— максимальное число самоопыляемых растений-дигетерозигот на первом этапе каждого полуцикла — обычно до 45;

— максимальное число растений-потомков всех дигетерозигот — обычно до 750. Мутации проявляются на стадии 2—3 настоящих листьев, и для следующего этапа по ним бракуется большая часть потомков;

— максимальное число этих растений-потомков (обычно 45), доращиваемых до взрослого состояния и

используемых на вышеназванных объединенных этапах для реализации скрещиваний ♀A-bb x ♂aaBB или ♀A-BB x ♂aabb;

— максимальное число потомков (обычно 10—20) каждого такого скрещивания. По ним бракуют семьи с ♀Aabb или ♀AaBB, а оставшиеся потомки являются исходными дигетерозиготами для следующего полуцикла;

— максимально допустимое число (обычно 2—3) полуциклов накопления высокорекомбинантных форм, т.е. продолжительность всего эксперимента;

— общее число «проходов» (обычно 100, 200 или 300) — повторений компьютерной реализации всего эксперимента.

При моделировании сопоставлялась эффективность самоопыления и анализирующего скрещивания, а именно: после каждого полуцикла каждого «прохода» по t -критерию [6] сравнивалась полученная величина gf_1 с gf_{10} , оцененной на первом этапе исходного полуцикла этого «прохода», в двух вариантах:

a — для оценки gf использовано маркерное потомство самоопыления всей популяции дигетерозигот (далее обозначено как t_s -критерий), которое получаем на первом этапе каждого следующего полуцикла;

b — использовано потомство дополнительного анализирующего скрещивания дигетерозигот с рецессивными гомозиготами aabb (t_A -критерий).

Фиксировался «успех» для i -го полуцикла определенного «прохода», если после этого полуцикла t -

критерий указывал значительное превышение gf_i над gf_{10} в исходной популяции дигетерозигот. Такой подход позволяет проводить дополнительную оптимизацию эксперимента. Возможно, например, что многократно повторенное моделирование выявит частое достоверное повышение gf уже после первого полуцикла, значит, второй полуцикл необязателен.

Дополнительно был разработан и реализован в ЭВМ-программе для каждого полуцикла и «прохода» новый принцип индикации и отделения высорекомбинантных форм от низкорекомбинантных — выявление по потомству среди очередной популяции дигетерозигот двух групп со значимо различающимися gf . Для этого дигетерозиготы после их дополнительного анализирующего скрещивания (вариант *b*) следует ранжировать по убыванию числа их рекомбинантных потомков. Сдвигая границу, делящую проанжированные дигетерозиготы на две группы (1 и 2), сравнивают gf_1 и gf_2 в них. Если найдена граница, при которой gf_1 значимо больше gf_2 , то фиксируется «успех» такой индикации для соответствующего полуцикла и его «прохода». Для проверки значимости разности gf_1 — gf_2 с помощью той же ЭВМ-программы были оценены пороги-квантили 95% уровня значимости для выборочного распределения разностей оценок gf_1 — gf_2 в предположении, что истинные частоты кроссинговера равны для всех дигетерозигот. Пороги зависят от общего числа самоопыляемых дигетерозигот и их потомства. Этот новый дискрими-

нантный критерий далее обозначен ds .

Моделирование показало, что негативное влияние стохастической изменчивости на вероятность успеха реального эксперимента существенно. Это влияние можно снизить за счет оптимизации объемов эксперимента по этапам на основе результатов моделирования.

Как и следовало ожидать, при исходных транс- и цис-дигетерозиготах по маркерным локусам А и В, один из которых тесно сцеплен с третьим маркером D (см. выше), существенных различий частот «успехов» не наблюдается. Поэтому эксперимент с равной вероятностью «успеха» может начинаться как с цис-, так и с транс-дигетерозиготы по маркерным локусам.

Доля успешных «проходов» существенно зависит от соотношения r_2, r_1, r_0 , которое связано со схемой наследования гес-гена, и от исходного соотношения частот f_2, f_1, f_0 трех гес-генотипов в исходной популяции дигетерозигот. Однако экспериментатору, как правило, неиз-

вестно даже число гес-генов. Единственная приблизительно известная характеристика, оцениваемая расстоянием между локусами А и В по генетической карте, это средняя частота рекомбинации в исходной популяции (\bar{r}). В случае одного гес-гена с двумя аллелями $\bar{r} = r_2 \times f_2 + r_1 \times f_1 + r_0 \times f_0$. Поэтому моделирование проводилось при \bar{r} от 0,1 до 0,15 и от 0,2 до 0,30 для различных соотношений $r_2, r_1, r_0, f_2, f_1, f_0$.

Целью являлось выяснение общих тенденций изменения частоты «успеха» в зависимости от объемов эксперимента по этапам. Полученные оценки частот «успеха» при заданном объеме следует рассматривать как верхний предел вероятности выделения высокорекомбинантных форм в реальном эксперименте.

В случае полного доминирования R над r ($r_0 > r_1 = r_2$) получены следующие результаты. При средней частоте рекомбинации в исходной популяции $\bar{r} > 0,2$, если количество исходных дигетерозигот (в цис- или транс-положении) на первом этапе менее 20, а количество потомков каждой дигетерозиготы менее 25, то негативное влияние стохастической ошибки существенно повышается, а увеличение и тех и других с 20—25 до 40 практически его не снижает (рис. 4). Вероятность «успеха» выходит на плато, определяемое приемлемыми числами растений на остальных этапах полуцикла (45 и 10). Поэтому при $\bar{r} > 0,2$ для этапа самоопыления каждого полуцикла следует остановиться на варианте: не менее 20 исходных дигетерозигот при 25 потомках каждой из них. Процент успеха после завершения заключительного (второго) полуцикла в этом случае, например, по

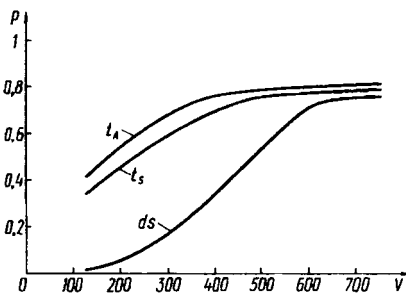


Рис. 4. Зависимость вероятности «успеха» (P) после третьего полуцикла при $\bar{r} = 0,27$ на основе трех критериев t_A, t_S, ds от произведения числа самоопыляемых дигетерозигот на число потомков F_2 каждой из них (V).

критерию t_s , составляет 60—75% и более в зависимости от схемы наследования и частотного состава исходной популяции по гес-генотипам.

Если же оценить вероятность «успеха» хотя бы после одного (первого или второго) полуцикла эксперимента, то она вполне приемлема (80—90%). Пример оценок этих вероятностей на основе трех критериев при конкретном соотношении g_2 , g_1 , r_0 , f_2 , f_1 , f_0 и заданном объеме эксперимента по этапам представлен на рис. 5.

В этом примере, как и в большинстве остальных, критерий t_A , основанный на анализе потомства дополнительного анализирующего скрещивания, несколько более эффективен, чем t_s , основанный на анализе потомства самоопыления. Однако объем эксперимента при этом значительно возрастает.

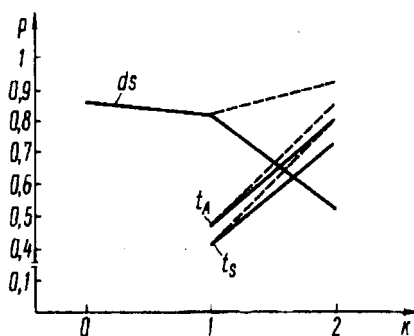


Рис. 5. Изменение вероятности «успеха» (P) на основе трех критериев — t_s , t_A , ds , если проверка производится только после первого или второго полуцикла (сплошные линии) или после первого и второго (пунктир). Число самоопыляемых дигетерозигот — 20, число потомков каждой из них — 25, число дорастиваемых и скрещиваемых растений — 45, число потомков каждого скрещивания — 10, $\bar{gf} = 0,27$.

Обращает внимание высокий процент «успеха» на основе критерия ds даже в исходном полуцикле. Но он также предполагает проведение тех же дополнительных анализирующих скрещиваний. Кроме того, в ЭВМ-программе не учитывалась модификационная изменчивость gf для разных растений-дигетерозигот. Критерий ds особенно чувствителен к ней. Влияние модификационной изменчивости предполагается изучить в дальнейшем.

Варьирование в машинном эксперименте количества растений на разных этапах и полуциклах схемы накопления показало также, что снижение количества дорастиваемых для скрещивания растений ($\varphi A-BB$ и $\sigma^2 aabb$ или $\varphi A-bb$ и $\sigma^2 aaBB$) до 15 и менее резко увеличивает количество «тупиковых» ситуаций и снижает процент «успеха» всего эксперимента. Интересно, что для оценки gf_1 после завершения последнего полуцикла достаточно 10 самоопыляемых растений-дигетерозигот (при сохранении суммарного числа их потомков F_2). Этого достаточно для высокой надежности индикации повышения gf . Вероятность «успеха» даже повышается. Для первого и второго полуциклов накопления снижение количества исходных дигетерозигот недопустимо из-за увеличения вероятности фиксации низкорекомбинантных генотипов RR , особенно при небольших исходных концентрациях аллеля g .

При \bar{gf} от 0,1 до 0,15 для достижения 80—90% вероятности «успеха» моделирование указало следующие объемы эксперимента по этапам: не менее 45 дигетерозигот на этапе самоопыления, по 15—20 потомков (F_2) каждой из них, на совмещенных

этапах выделения и скрещивания гомозигот не менее 45 доращиваемых растений, отобранных из F_2 , с 15 контрольными потомками каждого из них, т.е. при $\overline{gf} < 0,1$ до $0,15$ объемы следует увеличить в $1,5—2$ раза по сравнению с $\overline{gf} \geq 0,2$. Для оценки gf_1 после завершения последнего полуцикла накопления, как и для $\overline{gf} \geq 0,2$, число дигетерозигот для самоопыления выгодно снизить до 10.

Несложно показать, что эффективность схемы выделения высокорекомбинантных форм в смысле скорости повышения \overline{gf} при очень больших объемах эксперимента тем выше, чем ниже исходная \overline{gf} . Однако в реальных по объему экспериментах вероятность значимого сдвига \overline{gf} в этой схеме при исходной $\overline{gf} < 0,1$ недопустимо низка по сравнению с $\overline{gf} \geq 0,2$. Последнее ограничение исходной частоты рекомбинации следует признать оптимальным, не забывая, однако, что при $\overline{gf} > 0,35$ схема накопления недостаточно эффективна даже при очень больших объемах эксперимента [11].

Рекомендации для других схем наследования гес-гена (аддитивной, «+» и «-» сверхдоминирования) с учетом стохастической изменчивости сходны с полным доминированием. Моделирование также показало, что рекомендации могут быть экстраполированы на ситуации неполного самоопыления дигетерозигот, гаметного и зиготного отбора.

Выводы

1. Если на частоту рекомбинации (gf) существенно влияет отбор против рекомбинантных маркерных га-

мет (зигот), причем при «обратной» рекомбинации приспособленность гамет (зигот) восстанавливается, то по полуциклам схемы накопления высокорекомбинантных форм наблюдаются «скачки» частоты gf_1 , определяемой по соотношению произведений частот рекомбинантных и нерекомбинантных фенотипических классов. Существуют ситуации, при которых невозможно установить, какова причина увеличения частоты gf_1 в полуциклах реализации схемы: отбор форм с повышенной частотой кроссинговера или с более слабым понижением приспособленности рекомбинантных гамет (зигот).

2. Моделирование с учетом стохастической изменчивости gf_1 позволяет оценить оптимальное соотношение объемов экспериментов по этапам реализации схемы накопления в зависимости от исходной степени сцепления маркерных локусов, определяемой по генетической карте. Так, при реализации двух полуциклов схемы для локусов с исходной степенью сцепления от $0,2$ до $0,3$ для надежного выделения высокорекомбинантных форм достаточно по $25—30$ взрослых растений на всех этапах, а при исходном сцеплении $0,10—0,15$ объемы эксперимента следует увеличить в $1,5—2$ раза.

3. При использовании схемы накопления для перекрестноопыляемых растений следует применять схемы переопыления дигетерозигот с частичным инбридингом (например, внутрисемейные скрещивания), что существенно ускоряет отбор высокорекомбинантных форм.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Афифи А., Эйзен С.* Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. М.: Мир, 1982. — 2. *Жученко А.А.* Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз). Кишинев: Штиинца, 1980. — 3. *Жученко А.А.* Адаптивный потенциал культурных растений. Кишинев: Штиинца, 1988. — 4. *Жученко А.А., Король А.Б.* Рекомбинация в эволюции и селекции. М.: Наука, 1985. — 5. *Король А.Б., Прейгель И.А., Прейгель С.И.* Изменчивость кроссинговера у высших организмов. Кишинев: Штиинца, 1980. — 6. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. — 7. *Мирюта Ю.П.* Периодическая смена инбридинга и кроссбридинга при естественном размножении растений. — Докл. АН СССР, 1969, т. 187, с. 1171—1174. — 8. *Орлова Н.Н.* Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ, 1991. — 9. *Севастьянов Б.А.* Ветвящиеся процессы. М.: Наука, 1971. — 10. *Смиряев А.В.* Модифи-

кация и применение некоторых генетико-статистических методов в селекционно-генетических исследованиях растений. — Автореф. канд. дис. Л., ВИР, 1978. — 11. *Смиряев А.В., Нечаев И.М.* Математическое моделирование экспериментов по изучению генетической изменчивости рекомбинации. — Изв. ТСХА, 1994, вып. 1, с. 34—43. — 12. *Харпер Дж.* Механизмы биологической конкуренции. М.: Наука, 1964. — 13. *Grant V.* — Amer. Natur., 1966, vol. 100, p. 591—601. — 14. *Grant V.* — Amer. Natur., 1967, vol. 101, p. 125—139. — 15. *Federlei P.D.* — In: Handbuch der Vererbungswissenschaft, Berlin, 1929. — 16. *Johnson C.M., Mulcahy D.L.* — TAG, 1978, vol. 51, № 5, p. 211—215. — 17. *Rick C.M.* Genetics, 1969, vol. 62, p. 753—768. — 18. *Renner O.* — In: Handbuch der Vererbungswissenschaft, 2A. Borntraeger. Berlin, 1929. — 19. *Thompson A.E., Hepler R.W.* — Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 1962, vol. 81, p. 434—442.

*Статья поступила 15 декабря
1994 г.*

SUMMARY

Genetic-mathematical modelling of the effect of different types of natural selection in recombinant marker gametes and zygotes, as well as of genetic drift on estimations of recombination frequency (rf) in cyclic scheme of accumulation of high-recombinant plant forms suggested earlier («TAA Proceedings», 1994, issue 1) was carried out. The nature and the extent of discrepancy in evaluations of rf and crossing-over frequency for different variants have been ascertained. The modelling allows to identify some types of selection by rf dynamics, to optimize crossing volumes and the number of accumulation cycles.