

УДК 631.524.01.001.57

## ПРОВЕРКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СХЕМЫ НАКОПЛЕНИЯ ВЫСОКОРЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ

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

(Кафедра генетики)

Приведены результаты аналитического и имитационного моделирования возможностей предложенной ранее [4] циклической схемы накопления высокорекомбинантных форм растений. Проверка работоспособности схемы на мутантных формах томата с использованием известных и новых критериев сравнения частоты рекомбинации показала, что после реализации 2 полуциклов схемы частота на маркированном участке II хромосомы повысилась значимо по сравнению с исходной.

### Моделирование на ЭВМ

В специальной литературе имеются сведения, что общая интенсивность процессов рекомбинации в организме находится под генетическим контролем. Гены контроля рекомбинации (гес-системы), не имеющие прямого фенотипического проявления, выявлены у разных видов [9, 10]. Явление генетического управления частотой рекомбинации ( $rf$ ) можно использовать в селекции растений для выделения высокорекомбинантных генотипов, т.е. форм, имеющих повышенные значения  $rf$  для генов, сцепленных в блоки. Это позволит селекционеру выделять боль-

ше новых, необычных сочетаний генов, т.е. повышать доступную генотипическую изменчивость.

В процессе моделирования на ЭВМ нами было выявлено перспективное направление исследования и воздействия на гес-системы с целью накопления в популяции доли особей с повышенной частотой рекомбинации на маркированном участке А-В хромосомы. Оно связано с накоплением высокорекомбинантных форм (гес<sup>+</sup>-генотипов, обычно рецессивных —  $gr$ ) в маркерных генотипах искусственной популяции, образующихся при объединении двух кроссоверных гамет (рис. 1).

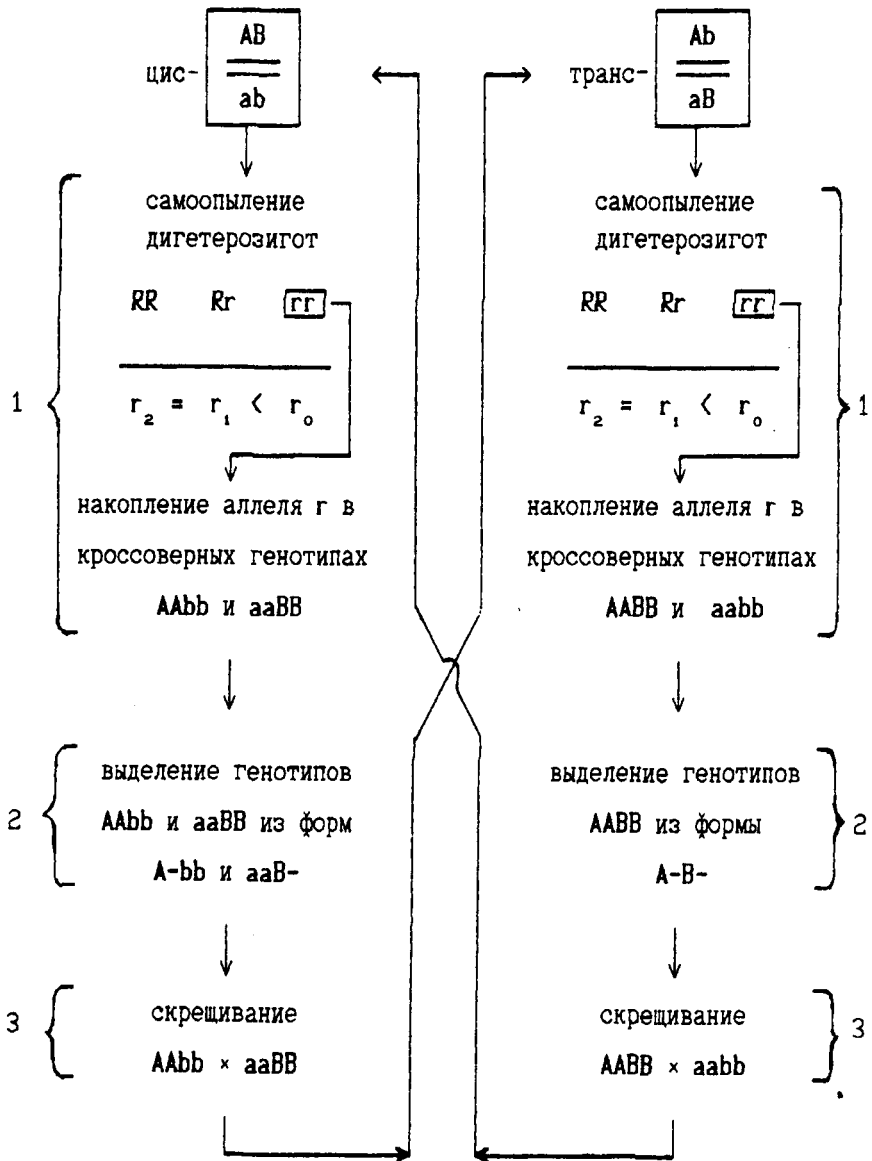


Рис. 1. Циклическая схема накопления аллеля  $r$  в кроссоверных маркерных генотипах. 1, 2, 3 - этапы составляют один полуцикл. Два полуцикла — полный цикл (цис-транс-цис или транс-цис-транс).

Механизм накопления состоит в том, что при самоопылении маркерных дигетерозигот у высокорекомбинантных генотипов  $gf$  значительно чаще, чем у других гес-генотипов популяции, образуются гаметы, кроссоверные по маркерам. Эти гаметы несут аллель  $g$ , и при их объединении в зиготы образуются гес-генотипы  $gf$ , кроссоверные по маркерным аллелям, которые несложно отобрать и скрестить по схеме. В результате происходит накопление генотипов  $gf$ . Для гарантированного приближения к максимально возможной средней частоте  $gf$  (за счет постепенного увеличения в искусственной популяции дигетерозигот  $AaBb$  доли высокорекомбинантного гес<sup>+</sup>-аллеля  $g$ ) можно реализовать несколько полуциклов схемы [4]. При нескольких гес-локусах в результате ряда самоопылений и последующих скрещиваний циклическая схема обеспечивает выщепление и накопление трансгрессивных гес-генотипов. Естественно, схема эффективна лишь при достаточном уровне полиморфности по гес-генам исходной популяции дигетерозигот.

В 1992—1998 гг. было проведено аналитическое моделирование на ЭВМ возможностей этой схемы. Показано, что она эффективна при различных типах наследования гес-генов, различных вариантах естественного отбора рекомбинантных и нерекомбинантных маркерных гамет и зигот, разной степени перекрестного опыления, а также при сцеплении одного или не-

скольких гес-локусов между собой и с маркерными локусами [5, 6]. С 1994 г. параллельно с аналитическим моделированием, основанном на детерминистических генетико-популяционных моделях [3], велось имитационное моделирование, основанное на стохастических моделях, учитывающих ограниченность экспериментальных выборок и продолжительность эксперимента — реализации схемы рис. 1 [7].

В 1996—1997 гг. с использованием имитационного моделирования были разработаны модификации статистических критериев (параметрического и рангового) для оценки достоверности различия  $gf$  в 2 популяциях [8]. Подобное сравнение необходимо для проверки наличия сдвига  $gf$  на маркированном участке после реализации схемы по сравнению с исходной  $gf$ . В отличие от обычных критериев эти модификации более объективны, так как учитывают генотипическую изменчивость  $gf$  по семьям, модификационную — по семьям, сезонам и т. д. В то же время они проще аналогичных критериев, ранее предложенных для этих целей [1], поскольку свободны от ряда обременительных предположений об исследуемом материале. В результате имитационного моделирования возможностей разработанных модификаций критериев сравнения были уточнены рекомендации по объемам экспериментальных выборок на всех этапах схемы для надежной реализации эффекта накопления.

## Экспериментальная проверка схемы накопления

Благодаря моделированию на ЭВМ удалось не только разработать и проверить теоретическую обоснованность принципа накопления высокорекомбинантных форм, но также получать с опережением рекомендации и корректировать реальный эксперимент с мутантными формами томата, проводимый в теплице МСХА для проверки работоспособности схемы рис. 1.

В 1997 г. была завершена реализация двух полуциклов этой схемы с использованием двух мутантных форм томата МО 504 и МО 304 (рис. 2). Благодаря наличию двух маркеров *Vip* и *D*, тесно сцепленных в транслокации, удалось совмещать в одной генерации 2-й и 3-й этапы каждого полуцикла, что значительно сократило продолжительность всего эксперимента. Были получены семена гетерозигот  $F_1$  исходной (I) и результирующей (II) форм — популяций по гес-генам. В 1998 г. для объективного сравнения  $gf$  в них растения I и II популяций были выращены в одних условиях, чтобы снять влияние различных  $gf$  по сезонам.

В результате самоопыления этих растений получили достаточное количество семян  $F_2$  из плодов первой и второй кистей у 15 растений исходной и у 29 растений результирующей популяции. Для объективного сравнения  $gf$  с помощью известных и новых критериев достаточно оценить численности рекомбинантных и нерекомбинантных классов по двум маркерам, напри-

мер *Aw* и *D*, в каждой семье. Для этого был проведен посев по 90 семян каждой семьи, за которую принималось потомство  $F_2$  каждого самоопыленного растения, полученное с его первых двух кистей. Оценка расщепления в семьях  $F_2$  по двум рекомбинантным (*AwD*, *awD*) и двум нерекомбинантным (*AwD*, *awd*) фенотипическим классам проводилась на стадии 2—3 настоящих листьев, всего по 1134 растениям-потомкам исходной и 2399 — результирующей популяции. Сравнение  $gf$  в двух популяциях на основе обычного метода максимального правдоподобия (ММП), не учитываяающего модификационную и генотипическую изменчивости  $gf$  по растениям  $F_1$ , и с помощью новых критериев сравнения — параметрического (*Te*) и рангового (*Rg*) показало большую объективность последних и достоверное увеличение среднего значения частоты рекомбинации в анализируемом сегменте *Aw-D* II хромосомы (рис. 2) после двух полуциклов схемы рис. 1. Ниже приведены краткие сведения о критериях и результаты сопоставления  $gf$ , полученные на их основе.

ММП позволяет дать оценку параметра *X*, из которого для сцепленного маркерных генов *Aw* и *D* самоопыляемых дигетерозигот с помощью преобразования  $1-(X)^{0.5}$  получают оценку  $gf$ . ММП также дает дисперсию ошибки параметра *X*:  $2(2+X)(1-X)X/N(1+2X)$ , где *N* — общий объем выборки для оценки  $gf$  [1]. Зная эти дисперсии в сравниваемых популяциях, можно оценить уровень значимости различий *X* в них. Поскольку  $gf$  — монотонно

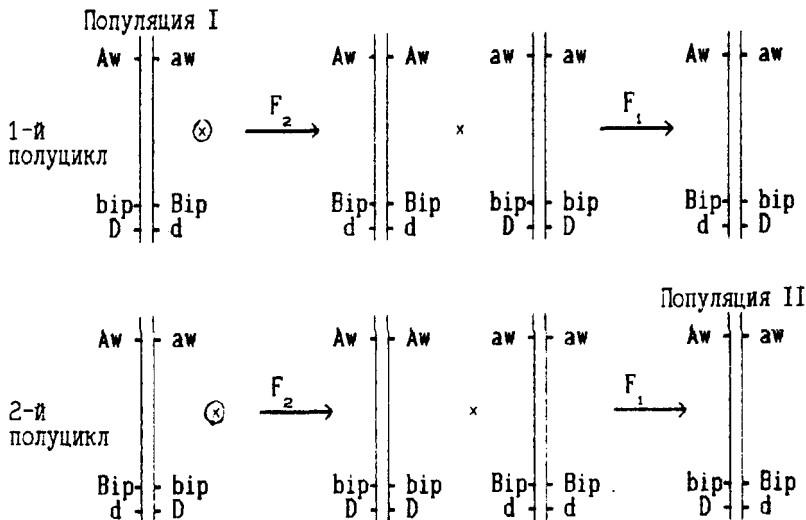


Рис. 2. Реализация двух полуциклов накопления на основе трех маркеров II хромосомы томата (*L. esulentum*): aw-59 - without anthoanin - отсутствие антоциановой окраски гипокотыля; bip-68 - bipinnata - сильная рассеченность листьев; d-70 - dwarf - карликовость.

убывающая функция от  $X$ , то выводы при проверке статистической гипотезы о снижении  $X$  соответствуют выводам об увеличении  $gf$ .

По данным эксперимента с мутантными формами томата ММП дает следующие оценки. В исходной популяции  $X_I = 0,883 \pm 0,016$ . Значит, оценка параметра  $gf$ , среднего по всей популяции, равна 0,087. В результирующей  $X_{II} = 0,771 \pm 0,013$ ,  $gf = 0,122$ , т.е. средняя частота рекомбинации на участке Aw-D в результирующей популяции возросла на 0,035, или на 40% по отношению к исходной.

Проверка нулевой гипотезы  $X_I = X_{II}$  против  $X_I > X_{II}$  с учетом ошибок  $X$  показывает, что нулевая гипотеза отвергается при

уровне значимости  $P < 0,01$ . Подтверждением увеличения  $gf$  в результирующей популяции служит также тот факт, что в высевном потомстве  $F_2$ , полученном от самоопыления 13 из 29 растений результирующей популяции, обнаружены генотипы-рекомбинанты между тесно сцепленными локусами Bip и D (рис. 2). В потомстве 15 растений исходной популяции таких рекомбинантов не было.

Следует отметить, что оценки  $gf$  в конкретном эксперименте не всегда совпадают с  $gf$  на генетической карте (рис. 2) того же вида. Расхождения могут быть весьма существенными не только по причине ограниченности выборки  $F_2$ , но также из-за несходства степеней естественного отбора различ

ных гамет и зигот при самоопылении  $F_1$  и генотипов  $F_2$  в конкретных условиях выращивания [1, 3]. В нашем эксперименте такой отбор косвенно проявился в существенных отклонениях от соотношения 3:1 для доминантных и рецессивных генотипов  $F_2$ . В потомстве исходной популяции:  $Aw/aw = 4,06$ ,  $D/d = 3,72$ ; результирующей:  $Aw/aw = 3,81$ ,  $D/d = 3,78$ .

В параметрическом критерии Те для сравнения частот  $gf$  в качестве исходных данных используется параметр  $p$ , т.е. доля рекомбинантных классов в каждой семье-потомстве двух сравниваемых популяций. Разность средних по семьям значений  $p$  в двух сравниваемых популяциях, деленная на корень из суммы дисперсий ошибок этих средних, в случае отсутствия различий средних  $gf$  в популяциях имеет распределение, близкое к  $t$ -распределению Стьюдента с  $df = n_1 + n_2 - 2$ , где  $n_1$ ,  $n_2$  — числа семей в I и II популяциях. По данным эксперимента

можно проверить нулевую гипотезу о том, что средняя доля  $p_1$  исходной популяции равна средней  $p_2$  результирующей против альтернативной  $p_1 < p_2$ . Расчет дает значение критерия  $T_e = (0,102 - 0,076)/0,0141 = 1,84$  при пороговом табличном значении критерия Стьюдента 1,68 ( $P = 0,05$ ), т.е. нулевая гипотеза о равенстве  $gf$  отвергается, хотя и при  $P < 0,05$  — меньшем уровне значимости, чем предыдущее сравнение, основанное на ММП. Причина в том, что ММП в отличие от  $T_e$  предполагает отсутствие изменчивости  $gf$  по растениям  $F_1$  внутри популяций. Таким образом, можно считать доказанными наличие достаточной полиморфности по гес-генам исходной популяции, полученной при скрещивании двух мутантов томата (рис. 2), и эффективность схемы накопления.

На рис. 3 приведены гистограммы распределения  $p$  — частот рекомбинантных классов до и после реализации двух полуциклов

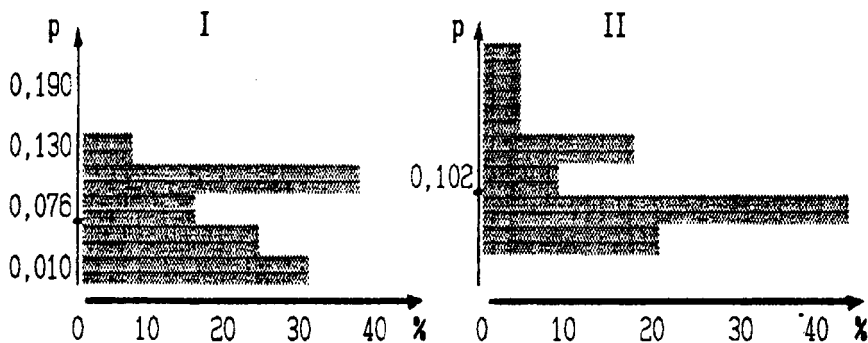


Рис. 3. Гистограммы распределения параметра  $p$  исходной (I) и результирующей (II) популяций.

схемы рис. 1. По-видимому, широкий разброс параметра  $r$  объясняется не только ограниченными объемами растений каждой семьи, но и существенной изменчивостью  $gf$  по семьям, которую следует учитывать в критериях сравнения. Разброс параметра  $r$  по семьям результирующей популяции, судя по гистограмме, несколько больше, чем для исходной. Проверка нулевой гипотезы о равенстве дисперсий  $r$  двух популяций против альтернативной, что дисперсия для второй больше, проводится на основе  $F$ -критерия отношения дисперсий и дает уровень значимости  $P < 0,07$ . Этого недостаточно для надежного отказа от нулевой гипотезы. Возможно, при последующем анализе дополнительного экспериментального материала будут получены более точные выводы.

Ранговый критерий  $R_g$  также основан на  $r$  — долях рекомбинантных классов в семьях, к которым можно применить процедуру преобразования в ранги и далее провести анализ по формулам Уилкоксона-Манна-Уитни [8]. При отсутствии различий по средним  $gf$  в двух сравниваемых популяциях значения расчетного критерия  $R_g$  также сводятся к  $t$ -критерию Стьюдента [2]. Гипотезы здесь формулируются так же, как и при использовании предыдущего критерия. По данным эксперимента с томатом, расчетный критерий  $R_g = 1,53$ . Сравнение с табличным  $t$ -критерием показывает, что уровень значимости  $P < 0,06$ , что недостаточно для того, чтобы по критерию  $R_g$  на-

дежно отвергнуть нулевую гипотезу о равенстве  $gf$ . Несмотря на то, что ранговый критерий  $R_g$  использует те же исходные параметры и учитывает те же эффекты изменчивости  $gf$ , что и параметрический критерий  $T_e$ , первый не позволил надежно уловить различия средних  $gf$  в двух популяциях. Это подтверждает вывод о более низкой по сравнению с  $T_e$  чувствительности рангового критерия, полученный ранее в результате имитационного моделирования [8].

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Король А.Б., Прейгель И.А., Прейгель С.П.* Изменчивость кроссинговера у высших организмов. Кишинев: Штиинца, 1990. —
2. *Ллойд Э., Ледерман У.* Справочник по прикладной статистике. М.: Финансы и статистика, 1989. —
3. *Смиряев А.В.* Генетика популяций культурных растений. Изд. второе. М.: ТСХА, 1995. —
4. *Смиряев А.В., Нечаев И.М.* Математическое моделирование экспериментов по изучению генетической изменчивости рекомбинации. — Изв. ТСХА, 1994, вып. 1, с. 34—43. —
5. *Смиряев А.В., Нечаев И.М., Рогожина И.В.* Математическое моделирование искажений частоты кроссинговера в многоэтапных экспериментах. — Изв. ТСХА, 1995, вып. 2, с. 75—82. —
6. *Смиряев А.В., Нечаев И.М.* Влияние сцепления маркерных и гес-локусов на эффективность схемы накопления высокорекомбинантных форм растений. — Докл. ТСХА, 1999, вып. 270, с. 3—10. —
7. *Смиряев А.В., Рогожина И.В.* приме-

нение метода Монте-Карло для оценки надежности выделения высокорекомбинантных форм растений. — Докл. ТСХА, 1996, вып. 267, с. 8—17. — 8. *Смиряев А.В., Рогожина И.В.* Анализ проблем оценки и сравнения частот кроссинговера в эксперименталь-

ных популяциях. — Докл. ТСХА, 1998, вып. 269, с. 3—12. — 9. *Baker B.S., Hall J.S.* — In: The genetics and biology of *Drosophila*. London, 1976, p. 351—434. — 10. *Hinton C.W.* — *Canad. J. Genet. Cytol.*, 1967, vol. 8, p. 711—716.

Статья поступила 21 января  
1999 г.

## SUMMARY

Results of analytical and imitational modelling the possibilities of cyclic scheme of accumulation of high-recombinant plant forms which was suggested earlier [4] are presented. Testing normal operation of the scheme on mutant forms of tomato using common and new criteria for comparing recombination frequency has shown that after realization of two halfcycles of the scheme the frequency on the marked section of chromosome II became much higher than the initial one.