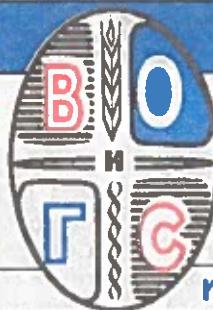


ВЕСТНИК

БАВИЛОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ГЕНЕТИКОВ



VOГиС

и СЕЛЕКЦИОНЕРОВ

Новосибирск, Россия

РОЖАТЬ НЕЛЬЗЯ КЛОНИРОВАТЬ
(этические аспекты последних достижений
экспериментальной генетики)

В 2001 году несколько событий в биологической науке привлекли к себе самое широкое внимание. В феврале были опубликованы результаты «прочтения» генома человека [1]. В перспективе будет установлена функция всех 30 тысяч содержащихся в нем генов и окажется возможным дать «генетическую формулу» каждого индивида. В начале мая были опубликованы сообщения о первых «генетически модифицированных» детях, появившихся на свет в результате пересадки в яйцеклетку цитоплазматических наследственных структур – митохондрий, взятых из клетки другой женщины [2, 3]. В июне было объявлено об успешном эксперименте по отбору зародышей, свободных от генов, вызывающих наследственные заболевания, до их пересадки в матку матери [4]. Наконец, в ноябре общественность была взволнована сообщением о первом успехе в клонировании человеческих эмбрионов.

Рассмотрим суть этих экспериментов несколько подробнее.

Для преодоления врожденного бесплодия женщин, вызванного дефектом митохондрий, коллектив под руководством Дж.Козна, работающего в Институте репродуктивной медицины и науки в штате Нью-Джерси, США, разработал и применил так называемую технику переноса ооглазмы [см. Вестник ВОГиС № 17. 2001]. С 1997 года эта операция была выполнена на яйцеклетках 30 страдавших бесплодием женщин. Двенадцать женщин родили детей, причем у 3 женщин появились двойни. Таким образом, за 4 года только в лаборатории Дж.Козна разработанным методом было получено 15 детей, столько же – в других лабораториях, освоивших эту технику. Изучение митохондриальной ДНК двух младенцев показало, что в их клетках действительно присутствуют митохондрии как родной матери, так и женщины-донора. Как и ожидалось, переноса какого-либо другого генетического материала, кроме ДНК митохондрий, не было отмечено. В широкой прессе об этих экспериментах было сообщено как о первом успешном получении «генетически модифицированных» детей.

СЕГОДНЯ В НОМЕРЕ:

1. Рожать нельзя клонировать
(этические аспекты последних достижений экспериментальной генетики)
2. Будет ли следующая «зеленая революция»?
3. Идентификация генотипа по фенотипу с помощью корреляций признаков
4. Открытие «филогеографии» Джона Си Ависа
5. Нобелевская премия 2001 года по физиологии и медицине присуждена за успехи в изучении клеточного цикла

630090
г.Новосибирск пр.Лаврентьева 10
Институт Цитиологии и Генетики РАН
Научная библиотека
тел.35-61-50

НАШ АДРЕС
в сети INTERNET
<http://wwwicg.bionet.nsc.ru/vogis/>

Группа под руководством доктора Ю.Верлинского, работающая в Институте репродуктивной генетики в Чикаго, обеспечила зачатие ребенка, свободного от гена, вызывающего рак, который ребенок мог унаследовать от своего отца. Супруг проявлял предрасположенность к развитию онкологических заболеваний, так называемый синдром Ли-Фромени, вызываемый мутацией в гене p53. У страдающих этим наследственным недостатком людей раковые заболевания с 50% вероятностью развиваются до 40-летнего возраста, а не-редко – еще в детстве. Супруг в отношении патологического гена был гетерозиготным, это значит, что 50% его сперматозоидов получали мутантную копию гена p53, а 50% – нормальную. Оплодотворение яйцеклеток будущей матери произошло в «пробирке»; в искусственных условиях оплодотворенные яйцеклетки начинали делиться и достигали стадии 8 клеток. Одна клетка такого зародыша изымалась (операция, считающаяся безвредной, так как дальнейшее развитие зародыша протекает normally) и подвергалась генотипированию – установлению генотипа с помощью современных методов анализа ДНК. Из 18 зародышей 7 оказались свободными от патологического гена, 3 из них были помещены в матку матери, которая в конце концов забеременела и родила здорового мальчика. Метод получил название предимплантационной генетической диагностики и, по словам его разработчиков, может использоваться для предотвращения 45 различных наследственных заболеваний, в том числе тех, которые проявляются или могут проявиться в пожилом возрасте. Альтернативой предимплантационной генетической диагностики является широко применяемая пренатальная диагностика, когда устанавливается генотип развивающегося в матке эмбриона и в необходимых случаях он может быть абортирован. Широко распространенное осуждение практики аборта делает первый подход более предпочтительным [4].

Более спорными оказались другие процедуры, проведенные тем же коллективом врачей и генетиков.

Родителями был «заказан» ребенок, который был бы наиболее подходящим донором костного мозга для своей старшей сестры, страдающей смертельной анемией. Этот ребенок был «произведен» путем отбора эмбрионов и появился на свет в 2000 году; взятые от него клетки действительно позволили спасти жизнь сестры.

В Институт доктора Верлинского обратились две пары из Великобритании, не получившие в своей стране разрешение на осуществление подобной манипуляции. Эти пары хотели произвести на свет детей, клетки которых помогли бы спасти жизнь ранее рожденных, страдающих неизлечимыми наследственными заболеваниями детей, в одном случае лейкемией, в другом – талассемией [5].

Лежащая в основе всех рассмотренных работ техника «оплодотворения в пробирке» была разработана в Англии еще в 1978 г. С тех пор, благодаря применению этого метода, по меньшей мере миллион детей появились на свет в тех случаях, когда женщина не может быть оплодотворена естественным путем.

Американская биотехнологическая компания АСТ («Продвинутые клеточные технологии») известна достижениями в клонировании высших животных. Сотрудникам АСТ удалось клонировать крупный рогатый скот, в том числе получить животных с пересаженными чужими генами и клонировать представителя одного из исчезающих видов быка гаура [6]. Второе направление деятельности АСТ – так называемое терапевтическое клонирование человека [7, 8]. Представители АСТ заявляют, что они не собираются помещать искусственно полученные человеческие зародыши в матку женщины, что необходимо для рождения ребенка-клона. Ими разрабатывается технология получения в культуре (т.е. в условиях *in vitro*) стволовых клеток – клеток, способных делиться, дифференцироваться в разные клеточные типы, и которые могли бы использоваться для «ремонта» пораженных органов. Среди последних в первую очередь называются поджелудочная железа, спинной и головной мозг. Но использование стволовых клеток может быть очень широким. Для их успешной приживляемости желательно, чтобы они происходили от того же организма, для «ремонта» которого эти клетки будут использованы. О первом успехе, точнее, первом шаге в направлении к решению этой задачи было объявлено в ноябре 2001 г. Ядро соматической человеческой клетки было перенесено в энуклеированную (лишенную собственного ядра) яйцеклетку, и яйцеклетка приступила к делению, образовав зародыш, или клеточный клон из 6 клеток. Это сообщение, сильно взволновавшее общественность, по сути говорит лишь о первой успешной попытке пересадки человеческого ядра, но отнюдь не о получении стволовых клеток или клонировании людей. Чтобы исключить подозрения в намерениях клонировать человека, авторы (справедливо) настаивают на необходимости различать репродуктивное клонирование, чем они занимаются на животных, и терапевтическое клонирование, направленное на получение стволовых клеток, при котором получаемые клеточные клони не будут переноситься в матку женщины.

Применительно ко многим домашним животным уже достаточно хорошо отработаны методы клонирования, а также методы переноса чужеродных генов, то есть получения трансгенных животных [9]. В основном таких животных создают с целью получения в больших количествах белков, имеющих применение в медицине. Реализуются и другие проекты. Так, человеческие гены пересаживаются свиньям в попытках получить животных, чьи органы не будут отторгаться при пересадке человеку и таким образом служить «биопротезами». Как видим, возможности генетической инженерии животных действительно фантастические [10].

Также в 2001 г. в январе было сообщено о получении первой трансгенной обезьяны [11] (до того подобные эксперименты проводились на более далеких от человека животных). Исследователям из Орегонского центра изучения приматов (США) с помощью безвредного вируса удалось перенести в ооциты макаки-резуса ген медузы, производящий флюоресцирующий белок (за образованием такого белка в организме легко следить). Двадцать эмбрионов, в кото-

рые пытались пересадить ген, были помещены в матки приемных матерей, родилось 3 детеныша, из которых у одного действительно происходило образование светящегося зеленым светом белка. В частности, светились ногти этой первой генетически измененной обезьяны. Описанный эксперимент показывает, какие попытки могут быть предприняты уже в ближайшем будущем с целью переделки генетического аппарата человека.

Вышеупомянутые достижения генетики сразу подняли волну дискуссий не только среди научной общественности, но и в широкой прессе и среди политических деятелей. Не будем здесь обсуждать этическость экспериментирования на животных, в частности, получения линий животных, заведомо обреченных на раннюю смерть от онкологического заболевания, или попыток ген-инженерными методами улучшить качество мяса сельскохозяйственных животных вместо того, чтобы всячески пропагандировать вегетарианство (в прессе можно встретить и такие предложения). Рассмотрим допустимость применения современных генетических и цитозиомбриологических методик к человеку с этической точки зрения. При этом, однако, очень трудно дать определенные ответы на встающие сейчас вопросы не только потому, что эти вопросы новые и суть проблемы еще недостаточно осознана человечеством, но и потому, что близкие и более старые проблемы – противозачаточных средств, абортов, пересадки органов, эвтаназии – не получили однозначного и для всех приемлемого решения. Хотелось бы обратить внимание на статью М.Хербста, опубликованную в газете «Поиск» [12], в которой полно и квалифицированно рассмотрены этические аспекты проблемы клонирования.

В обсуждаемом нами круге проблем два вопроса являются ключевыми. Первый – с какого момента развития начинается человеческая личность, имеющая право на существование и неприкосновенность. С момента оплодотворения? Имплантации в матку? Развития нервной системы? Рождения? Ответа на этот вопрос зависит, в частности, и возможность экспериментирования на человеческих зародышах, а также возможность их использования в медицинских или каких-то иных целях. Поставленный вопрос, очевидно, имеет и непосредственное отношение к проблеме аборта.

Второй вопрос – допустимы ли какие-либо вмешательства в человеческий геном и, если да, то какие и с какими целями. Введение человеческих или чужеродных генов в соматические клетки начинает осуществляться в рамках так называемой генотерапии, которая, по-видимому, особых этических и юридических проблем не поднимает. Речь теперь идет об изменениях генома тех клеток, которые образуют «зародышевый путь», то есть потенциально могут дать начало следующим поколениям. Как показывают примеры, приведенные в первой части данной статьи, способы такого вмешательства уже сейчас достаточно разнообразны и они будут все более и более многообразны в самом ближайшем будущем.

Биолог может сформулировать поставленные вопросы, но чисто научный ответ дать на них невозможно. При этом, по-видимому, надо отталкиваться

от нескольких ключевых положений, которые могут быть сформулированы следующим образом:

1. Каждый человек уникален и неповторим по всем своим психическим и физическим качествам (за исключением редко появляющихся однояйцевых близнецов, которые, развиваясь, разумеется, в самостоятельные личности, остаются по большинству свойств копиями друг друга).

2. Врожденные свойства человека закладываются в момент слияния родительских половых клеток. Данная пара родителей может произвести миллиарды разных сочетаний своих генов и какая комбинация в данном акте реализуется – есть дело Случая (или Бога, если Бог управляет случайностью).

3. Во всех обществах и культурах (кроме самых примитивных, где еще не сложился институт семьи) каждый ребенок всегда происходит от двух родителей, которые обычно были ему известны.

4. К XXI веку общепризнано, что человек не является товаром; торговля людьми относится к явно криминальной сфере.

5. Широко принимается, что лишение человека жизни является недопустимым. Это положение, однако, достаточно спорно применительно как к практике смертной казни по решению суда, так и к эвтаназии – помощи в безболезненном уходе из жизни неизлечимых и физически страдающих больных.

6. С научной точки зрения не следует стремиться к генетическому «улучшению» человеческого рода. Во-первых, разнообразие является условием благополучного существования любой популяции живых организмов, в том числе и человека; во-вторых, невозможно на научной основе сформулировать критерии, которым должен соответствовать «идеальный человек».

Отталкиваясь от этих положений, попробуем рассмотреть недавно проведенные или ожидаемые эксперименты с человеческими клетками и зародышами.

«Терапевтическое клонирование». В действительности, если оно не сопровождается помещением способного к развитию зародыша в матку женщины, так называемое терапевтическое клонирование, возможность которого продемонстрирована компанией АСТ, строго говоря, к действительному клонированию отношения не имеет. Речь идет о манипуляциях с соматическими клетками, приводящими к их «комоложению» и дедифференцировке. Получение таким образом стволовых клеток для использования в медицинских целях принципиально не отличается от использования пересадок кожи с одной части тела на другую при лечении ожогов или пересадки костного мозга от одного человека другому. Употребление при этом термина «клонирование» только создает ажиотаж и вводит в заблуждение.

Репродуктивное клонирование. При возвращении полученного *in vitro* зародыша с генетическим материалом соматической клетки в матку создается возможность действительного получения клона, т.е. существа (или существ), копирующего физические и потенциально врожденные психические свойства донора генетического аппарата. Вероятнее всего, такие дети действительно появятся уже в 2002–2003 г., по-

скольку слишком много говорится об этой возможности [13]. Опасности для генетического благополучия человечества (для человеческого генофонда) клонирование представить не может – эта процедура никогда не заменит естественное воспроизведение и не сможет заметным образом сократить разнообразие генотипов в человеческих популяциях. Научные возражения против клонирования заключаются в том, что технически процедура недостаточно отработана и может приводить к появлению физически дефектных детей. Кто в таком случае несет за это ответственность? Кто будет содержать и воспитывать неполноценного ребенка? Сомнительность с этической точки зрения процедуры клонирования состоит в том, что нарушаются естественные принципы уникальности личности и происхождения каждого человека от двух родителей. Можно опасаться, что в семье, обществе «клонированный» ребенок не будет чувствовать себя комфортно и его психическое развитие заведомо будет проходить с искажениями. С религиозной точки зрения рождение каждого человека выражает промысел Бога (при этом предполагается, что Бог управляет случайностью или, иначе говоря, «играет в кости»). В таком случае, однако, смерть человека есть тоже Божий промысел, следовательно, надо осуждать и реанимацию, особенно выведение человека из состояния клинической смерти. Последнее, однако, делается с благой целью – помочь человеку. Тогда надо рассматривать и оценивать и мотивы для клонирования – есть ли это щеславие, эгоизм, стремление к материальной выгоде или желание бесплодных родителей иметь детей, воспроизведяющих их генотип. Можно представить и такую ситуацию, когда 50-летние родители, потерявшие сына или дочь, хотят воспроизвести своего ребенка (если соматические клетки были соответствующим образом законсервированы при жизни человека, они могут быть использованы для клонирования).

Рассмотрение мотивов для клонирования переводит проблему из этической или религиозной плоскости в юридическую: допустимость клонирования в каждом конкретном случае могла бы решаться так же, как и вопрос об усыновлении ребенка (разумеется, с возможностью ошибок, криминальных ситуаций и т.д.). Поскольку и научные, и этические, и юридические аспекты проблемы еще не ясны, запрещение репродуктивного клонирования на 3–5 лет (как сделано в России) представляется сейчас наиболее правильным решением.

Производство генетически модифицированных детей. Первые такие дети были получены доктором Дж. Коэном. Как указывалось, в этих случаях в оплодотворяемую *in vitro* яйцеклетку были пересажены митохондрии другой женщины. Если все полученные с помощью этой процедуры дети развиваются нормально (сообщения о противном не было), то трудно найти весомые аргументы против данного метода преодоления бесплодия. В митохондриальной ДНК находится 37 генов, от женщины-донора цитоплазмы ребенок получил 37 генов вдобавок к 30 тыс. генов от матери и 30 тыс. генов от отца. Трудно признать, что у данного ребенка две «матери» (к тому же надо напомнить, что митохондриальные гены заменным образом не сказываются на физических или пси-

хических признаках). Нельзя опасаться и каких-либо юридических коллизий в случае проведения таких операций. Пересадка митохондрий в яйцеклетку может восприниматься так же, как, например, переливание донорской крови новорожденному, с той, конечно, разницей, что пересаженные митохондрии могут сохраняться в клетках в течение жизни и даже если полученный таким образом ребенок – девочка, могут быть переданы потомству.

Подобные эксперименты, однако, открывают путь для пересадки в человеческую яйцеклетку чужих ядерных генов. Пересадка отдельных генов человека в яйцеклетку или зародыш с медицинскими целями вряд ли может вызывать возражения, хотя возможные цели такой операции могут быть достигнуты другими способами. Опять же следует определить показания к подобным пересадкам. Вероятно, они должны ограничиваться решением медицинских задач. Удовлетворение родительского щеславия (например, приданье будущему ребенку генов каких-либо выдающихся способностей – в перспективе это может стать реальным) должно быть исключено.

По нашему мнению, следует запретить пересадку генов других организмов, поскольку возможные последствия таких манипуляций заранее рассчитать невозможно, а с эмоциональной, этической или религиозной точек зрения создание человека с животными (растительными, бактериальными) генами, скорее всего, будет вызывать общее неприятие.

Производство детей запланированного или желаемого генотипа. Как было выше рассмотрено, имеется в виду отбор среди многих полученных «в пробирке» зародышей тех, которые имеют желаемый генотип. По мере достижения все большего успеха в расшифровке генома человека, число генных вариантов, которые можно будет тестировать, будет стремительно возрастать [14].

Проведение такого искусственного отбора эмбрионов есть явное стремление к соперничеству с Божиим промыслом и, очевидно, с религиозной точкой зрения будет осуждаться.

Чисто научных аргументов, когда речь идет об исключении зародышей с явно патологическими генами, быть не может. Сколько, однако, далеко можно идти по этому пути? Вправе ли родители «заказывать» ребенка с генами долголетия? С генами музыкальных или математических способностей? С определенным цветом глаз или формой носа? Все это в ближайшие десять лет может стать реальным. Как и в других случаях, по-видимому, должны рассматриваться цели данной манипуляции и обоснованность желаний родителей. Разумеется, что законодательные ограничения будут способствовать уходу части клиник и лабораторий репродукции «в подполье», следует, однако, сказать, что серьезной общественной опасности деятельность подобных клиник из-за всегда ограниченного круга их клиентов представлять не может. Опасность, которая видна в этой практике, состоит в том, что ребенок превращается в товар и в ряде ситуаций становится не самоцелью, а средством. Так уже происходит при использовании клеток «запланированного» ребенка для лечения его ранее родившихся братьев и сестер.

Легко представить цепочку вариантов такой ситуации, ведущую к явной аморальности или к преступлениям.

Итак, достижения экспериментальной генетики и эмбриологии позволяют производить на высших организмах совершенно фантастические эксперименты. Многие из этих достижений могут быть применены и к человеку. Открывающиеся возможности должны достаточно широко обсуждаться, причем не только в среде специалистов. В каждом обществе должны сложиться, если не консенсус, то, во всяком случае, определенное мнение большинства о приемлемости или недопустимости тех или иных генетических манипуляций (как, например, выработалось определенное отношение к абортам и эвтаназии). Разумеется, что общественность должна быть достаточно хорошо информирована о сути новых достижений науки, о получаемых результатах и о возможных негативных последствиях. Принимаемые законодательные акты должны учитывать как научную информацию, так и мнение, сложившееся или складывающееся в обществе.

Литература

1. The International Human Genome Mapping Consortium. A physical map of the human genome // Nature. 2001. V. 409. P. 934–941.
2. Barritt J.A., Brenner C.A., Malter H.E., Cohen J. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation // Hum. Reprod. 2001. V. 16. P. 513–516.
3. Barritt J., Willadsen S., Brenner C., Cohen J. Cytoplasmic transfer in assisted reproduction // Hum. Reprod. Update. 2001. V. 7. P. 428–435.
4. Rechitsky S., Verlinsky O., Amet T., et al. Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders // Mol. Cell. Endocrinol. 2001. V. 183. Suppl. 1. P. 65–68.
5. Kuliev A., Rechitsky S., Verlinsky O., et al. Preembryonic diagnosis for sickle cell disease // Mol. Cell. Endocrinol. 2001. V. 183. Suppl. 1. P. 19–22.
6. Lanza R.P., Dresser B.L., Damiani P. Cloning Noah's Arc – biotechnology might offer the best way to keep some endangered species disappearing from the planet // Sci. American. 2000. V. 283. P. 84–89.
7. Lanza R.P., Cibelli J.B., West M.D. Human therapeutic cloning // Nature Med. 1999. V. 5. P. 975–977.
8. Lanza R.P., Cibelli J.B., West M.D. Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation // Nature Biotechnol. 1999. V. 17. P. 1171–1174.
9. Di Berardino M.A. Animal cloning – the route to new genomics in agriculture and medicine // Differentiation. 2001. V. 68. P. 67–83.
10. Moore H. The modern-day island of Dr. Moreau // Impact Press. 2001. № 35. P. 1–8.
11. Chan A.W., Chong K.Y., Martinovich C., et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes // Science. 2001. V. 291. P. 309–312.
12. Хербст М. Совсем как мама! (Этические аспекты дискуссий о клонировании) // Поиск. 2001. № 43 (649). С. 13–14.
13. Pickrell J. Human cloning – experts assail plan to help childless couples // Science. 2001. V. 291. P. 2061–2062.
14. Brenner C., Cohen J. The genetic revolution in artificial reproduction: a view of the future // Hum. Reprod. 2000. Suppl. 5. P. 111–116.

И.А. Захаров, член-корр. РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

БУДЕТ ЛИ СЛЕДУЮЩАЯ «ЗЕЛЕННАЯ РЕВОЛЮЦИЯ»?

Напомним кратко, в чем заключалась «зеленая революция», за которую Норман Борлоуг получил Нобелевскую премию мира в 1970 году. К середине XX века сельское хозяйство получило огромное количество минеральных удобрений, но ранее созданные сорта не могли трансформировать их эффективно в урожай зерна. Высокие агрономы приводили к избыточному росту, набору большой зеленой массы и полеганию, что существенно снижало намолоты. При этом индекс урожая был значительно ниже 50% (отношение веса зерна к общему весу наземной массы, т.е. основное сухое вещество было в соломе и листьях). Борлоуг в целях борьбы с полеганием предложил использовать признак короткостебельности, достаточно просто контролирующийся генетически и легко передающийся через гибридизацию любым перспективным линиям. Полученные им полукарликовые сорта также формировали большую наземную массу, но уже за счет высокой кустистости, не полегали и были весьма продуктивны с индексом урожая ~50%. Кроме того, они имели иную динамику восстановления азота и переноса в зерно его биологических производных.

Сорта, создававшиеся ранее, вначале накапливали соединения азота в зеленой массе, а затем после цветения переносят их в зерновки. Короткостебельные сорта отличаются тем, что восстанавливают и ретранспонируют азот одновременно до конца налива семян. Таким образом, усвоение азота из почвы у них продолжается много дольше и приводит к большей продуктивности как отдельных растений, так и посева в целом. Благодаря «зеленой революции», Мексика увеличила производство пшеницы в 3 раза за 15 лет (на аналогичный прирост Европе потребовалось 150 лет!!!) и из крупнейшего импортера превратилась в экспортёра зерна.

Таким образом, для успешной «революции» необходимо, чтобы базовый признак, на основе которого строится селекционная технология, имел простой генетический контроль и 100% пентрантность (т.е. полное проявление у всех потомков), иначе невозможно создать и поддерживать необходимую для селекционной практики устойчивую генетическую систему.

В конце прошлого века наиболее сенсационным научным событием, несомненно, было клонирование овцы в Эдинбурге. Это и понятно, так как сразу же явно и навязчиво этот результат примерялся к человеку, а его возможные последствия будоражат общество до настоящего времени. Возможно поэтому сообщения в СМИ и научных изданиях на Западе об «апомиктической революции» и ее перспективах в России прошли незаметно. Приведем заголовки лишь некоторых из них: «Апомиксис: социальная революция сельского хозяйства» (Biotechnology and Development Monitor, № 19, June, 1994); «Апомиксис: бесполая революция» (Science, V. 274, 1996); «Революция в производстве гибридной кукурузы» (Agricultural Research, December, 1998); «Никакого секса, пожалуйста, мы – растения» (Economist, September, 6, 1997); «Огромное будущее апомиксиса» (Trends in Plant Science, V. 3, № 11, 1998).

Из приведенного списка видно, что в обсуждении проблемы прикладного использования генетически регулируемого апомиксиса термин «революция» используется как научными, так и популярными изданиями. Иными словами, все признают насколько велики будут преобразования агротехнологий в случае освоения данного способа размножения растений.

Поскольку апомиксис – не иное как специфический способ размножения, позволяющий получать абсолютные генетические копии матери (природой созданная технология клонирования), начнем наше знакомство со сравнительного анализа полового и апомиктического типов размножения, чтобы понять, в чем их принципиальная разница и значение для селекционных технологий.

Наиболее часто встречающийся и знакомый всем способ размножения сельскохозяйственных растений – половой – связан с циклическим чередованием спорофитной и гаметофитной фаз (рис. 1). Спорофит – это обычная наблюдаемая нами форма растений, несущая двойной набор хромосом ($2n$). Гаметофитная фаза у цветковых растений весьма коротка и характеризуется гаплоидным набором хромосом (n). Напомним, что хромосомы являются структурными элементами ядер клеток, состоящими из ДНК, хранящими практически всю генетическую информацию. Их число и форма строго специфичны для каждого вида растений. В обычном состоянии хромосомы не видны в световом микроскопе, но при подготовке к делению клеток ДНК конденсируется с помощью специальных белков, и их можно четко наблюдать на стадии метафазы, а некоторые даже идентифицировать по морфологии.

Таким образом и удалось установить, что спорофит несет двойной набор хромосом ($2n$), а гаметофит – одинарный (n). Это достигается при переходе от спорофитной фазы к гаметофитной путем специального типа клеточного деления – мейоза, приводящего к редукции числа хромосом при формировании как женских, так и мужских половых продуктов. В результате образуются гаплоидные микроспоры (мужские) и мегаспоры (женские), которые путем ограниченного числа митотических делений формируют микрогаметофит (трехядерная пыльца – результат двух последовательных делений, при этом второе деление осуществляется одной из клеток) и мегагаметофит (8-ядерные

зародышевые мешки, заключенные в материнскую семяпочку, результат трех делений). После завершения делений идет специализация ядер – к настоящему моменту не очень исследованный процесс, но установлено, что при этом происходит химическое и конформационное маркирование их ДНК, и в дальнейшем они будут способны выполнять только предписанные функции. Так, один спермий предопределен оплодотворить только яйцеклетку, а другой – центральную клетку. Отсюда ясно, что в мегагаметофите каждое из 8 ядер тоже выполняет только свою функцию.

Итак, после опыления микрогаметофит доставляет два гаплоидных ядра спермии в мегагаметофит через проникающую в семяпочку пыльцевую трубку. Один оплодотворяет центральную клетку, которая, как правило, двухъядерная ($n + n$), с формированием триплоидного эндосперма ($3n$) – терминальной ткани с множественными гормональными и питательными функциями, критическими для развивающегося зародыша; другой – гаплоидную яйцеклетку (n) с формированием зиготического диплоидного зародыша ($2n$). Замечательное следствие этих событий в том, что набор хромосом во вновь образованном спорофите снова диплоидный, но генотип каждого потомка (совокупность генов) качественно отличается от родительских.

В чем смысл достаточно длинных путей создания и объединения половых продуктов? Казалось бы, проще размножаться почкованием, чем тратить энергию, пластические вещества на формирование генеративных органов, «рисковать» оказаться неопыленными, т.е. не оставить потомства, и поэтому выбирать из борьбы за существование. Это связано с необходимостью постоянно адаптироваться к меняющимся условиям среды, т.е. иметь запас вариабельности, что и достигается через комбинативную изменчивость, сопровождающую половое размножение.

Так, например, у ячменя имеется 7 пар хромосом, поэтому при формировании половых продуктов возможны 2⁷ вариантов их комбинаций. В свою очередь, при оплодотворении возможное число вариантов потомков будет равно числу сочетаний из 128 (2^7) по 2, что обеспечивает огромный резерв изменчивости.

Кроме того, размножение через семенную фазу, в отличие от вегетативного, служит мощным барьером против клеточных инфекций. Вспомните здесь, сколько проблем доставляет картофель, который поражают более 500 видов внутриклеточных паразитов.

Если в дикой природе комбинативная изменчивость является необходимым компонентом устойчивости и приспособляемости вида, то у культурных сортов она часто весьма нежелательна, так как разрушает ценные комбинации генов, контролирующих хозяйствственно полезные признаки, по крупицам собираемые поколениями селекционеров. Поэтому существует настоятельная необходимость в отдельных случаях уйти от половой репродукции и одна из возможностей сделать это – бесполосеменное размножение (апомиксис). Он достигается, когда половой жизненный цикл укорочен за счет элиминации гаплофазы, а эмбриогенез осуществляется в результате деления клеток, не прошедших ни мейотической редукции числа хромосом, ни оплодотворения (рис. 1).

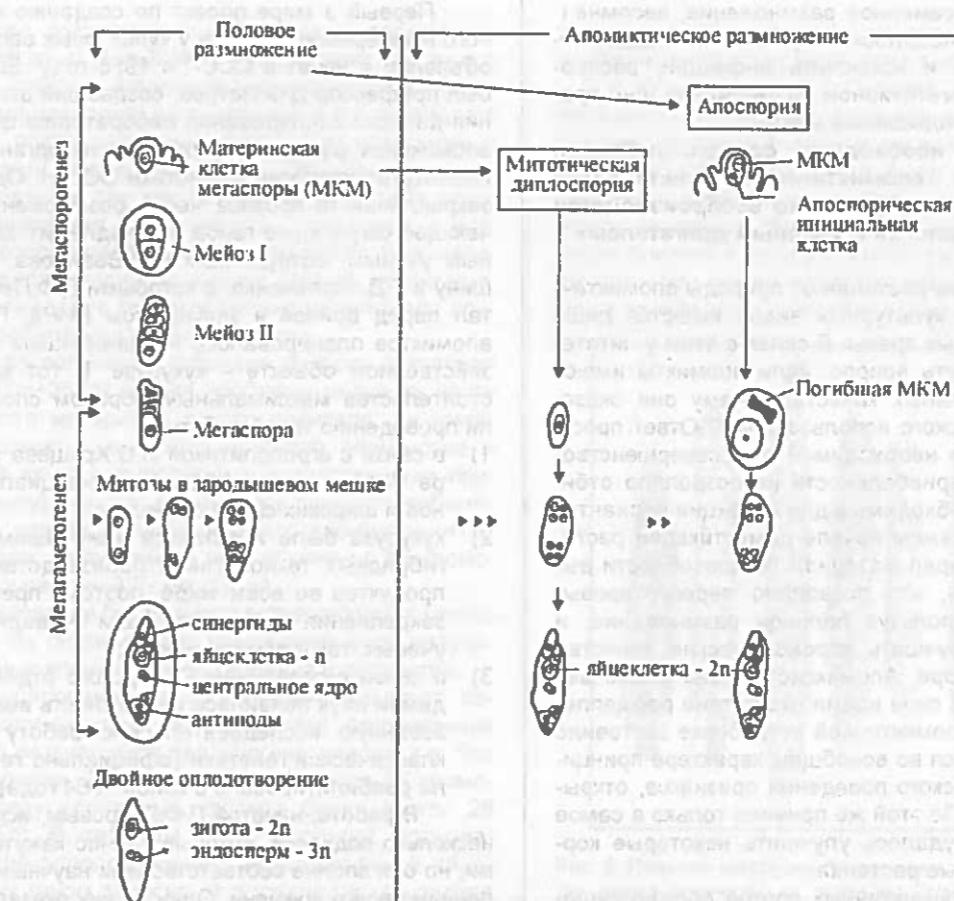


Рис. 1. Сравнительная схема формирования женских половых продуктов у половых и апомиктических растений.

При этом осуществляется исключительная передача полного материнского генотипа следующему поколению, т.е. его клонирование.

Необходимо подчеркнуть, что у абсолютного большинства апомиктов оплодотворение эндосперма необходимо, иначе зерновки не развиваются. Это объясняется эффектом импринтинга, требующим для нормального развития этого органа присутствия в нем отцовского генетического материала. При этом у растений, размножающихся половым путем, соотношение материнского и отцовского геномов должно быть строго 2 : 1 соответственно, а у апомиктов возможны разного типа отклонения от данного правила, на которых мы остановимся позже в связи с актуальностью этого эффекта для формирования урожая.

В основном в природе встречаются два типа апомиксиса – диплоспория и апоспория (рис. 1). При диплоспории зародышевый мешок развивается из материнской клетки мегаспоры без редукционного деления, и таким образом неоплодотворенная яйцеклетка, которая далее дает начало следующему поколению, воспроизводит генетическую копию материнского растения. При апоспории эмбриональный мешок формируется из соматической клетки и также является абсолютным генетическим клоном.

Отсюда можно заключить, что бесполосеменное размножение позволяет поддерживать генетиче-

ски стабильный клон через семенную фазу неограниченно долго. Если добиться генетически контролируемого превращения половых растений в апомиктические, то мы революционизируем селекционные технологии. Так, например, гетерозисные гибриды становятся все более важными у различных пищевых растений по всему миру. Однако массовое производство гибридных семян является дорогой технологией и рентабельно только тогда, когда от одного акта опыления получают не менее 500–1000 семян. По этим причинам гетерозис успешно реализован на практике только у культур с высоким коэффициентом размножения (кукуруза, томаты, огурцы и т.д.). Основные хлебные злаки и рис, несмотря на многочисленные попытки, остались за чертой гибридной селекции, а решение этой проблемы позволило бы увеличить их производство на 15–30% на уже освоенных площадях.

Поэтому закрепление комбинаций генов, контролирующих важные агрономические признаки, – весьма насущная проблема.

Здесь возможны два подхода: создание многолетних сортов и использование генетически контролируемого апомиксиса. В первом случае мы исключаем лишь ежегодную необходимость получать гибриды и проводить сев, а во втором получаем комбинации, которые можно использовать теоретически бесконеч-

но долго. Бесполосеменное размножение, несомненно, предпочтительнее, поскольку позволяет поддерживать севообороты и исключить инфекции, распространяющиеся при вегетативном размножении и не проходящие через зародышевые мешки.

Для этого необходимо создать гибриды, размножающиеся апомиктически, генетическая комбинация которых постоянно воспроизводится у потомков по аналогии с «вечным двигателем» – *repetitum hybrid*.

Многие дикие растения от природы апомиктические, однако среди культурных видов имеются лишь единичные кормовые травы. В связи с этим у читателя может возникнуть вопрос: если апомикты имеют столько замечательных качеств, почему они оказались вне практического использования? Ответ прост: именно отсутствие необходимой для совершенствования растений вариабельности не позволяло отбирать среди них необходимые для селекции варианты. Поскольку еще в самом начале доместикации растений человек подбирал материал по способности выщеплять варианты, что позволяло пересортировывать признаки, используя половое размножение, и таким образом улучшать агрономические качества при массовом отборе. Апомиксис как раз исключает эту возможность. В свое время отсутствие расщепления в опытах на апомиктической ястребинке заставило Менделя усомниться во всеобщем характере принципов гибридологического поведения признаков, открытых им на горохе. По этой же причине только в самое последнее время удалось улучшить некоторые кормовые апомиктические растения.

Создание апомиктических сортов должно существенно изменить систему организации сельского хозяйства. Они будут стимулировать многообразные стратегии для оптимизации агрокосистем и, что очень важно, «бутиковую селекцию» сельскохозяйственных культур, максимально соответствующих среде, поскольку одно хорошо адаптированное растение, выбранное локально за его продуктивность, будет направлять давать начало успешному сорту.

В противоположность сегодняшним гибридным технологиям мы будем клонировать гетерозисные растения, вернув фермерам их роли новаторов в создании новых сортов, так как они имеют несравненно большее разнообразие форм, нежели селекционеры. Кроме того, что будут широко использоваться гибриды возделываемых в настоящее время культур, открывается путь к освоению межвидовых и межродовых гибридов. Например, фертильный гибрид пшеницы с овсом вполне реален при бесполосеменном способе размножения.

У гибридов с апомиктическим способом размножения генетические комбинации, обеспечивающие устойчивость к болезням, абиотическим факторам, насекомым, обычно теряющиеся при сексуальном размножении, будут поддерживаться вне зависимости от числа поколений.

Апомиксис весьма перспективен, потому что содержит потенциал расширения видов, используемых в гибридной селекции, увеличения урожая, однородности сортов и значительного снижения стоимости производства гибридных семян.

Первый в мире проект по созданию апомиктического коммерческого сорта у культурных растений был объявлен и начат в СССР в 1958 году. Его автором был профессор Д.Ф.Петров, создавший для выполнения данного исследования лабораторию цитологии и апомиксиса растений в только что организованном Институте цитологии и генетики СО АН. Однако идея закрепления гетерозиса через размножение, исключающее сегрегацию генов, принадлежит замечательным ученым, сотрудникам Н.И.Вавилова, М.С.Навашину и Г.Д.Карпеченко, с которыми Д.Ф.Петров работал перед войной в знаменитом ВИРе. Получение апомиктов планировалось на важнейшем сельскохозяйственном объекте – кукурузе. В тот момент обстоятельства максимальным образом способствовали проведению такой работы:

- 1) в связи с агрополитикой Н.С.Хрущева эта культура была в центре внимания официальных органов и широких слоев общества;
- 2) кукуруза была и остается важнейшим объектом гибридных технологий и производства пищевых продуктов во всем мире, поэтому преимущества закрепления гетерозиса были очевидны как для учёных, так и для агрономов;
- 3) в связи с созданием Сибирского отделения Академии наук появилась возможность вести организованную исследовательскую работу методами классической генетики (официально генетика была реабилитирована в конце 1964 года).

В работе, начатой Д.Ф.Петровым, использовали несколько подходов, которые сейчас кажутся наивными, но они вполне соответствовали научным представлениям своего времени. Один из них оказался продуктивным и продолжается в нашей лаборатории, а также в США, Франции, Мексике. В этом исследовании передача кукурузе (*Zea mays L.* – *Zm*) апомиктического способа репродукции осуществляли от ее дикого сородича – трипсакума (*Tripsacum dactyloides L.* – *Td*) путем гибридизации. Предполагалось, что генетическая система, контролирующая бесполосеменное размножение, состоит из двух генов: 1) ген апомейоза управляет редукцией числа хромосом, 2) ген партеногенеза стимулирует развитие эмбриона из яйцеклетки, минуя оплодотворение. Отсюда можно заключить, что для контроля такого типа размножения необходимы максимум две хромосомы дикого сородича, если гены не скрещены, т.е. расположены в разных хромосомах, и тогда апомиктическая кукуруза будет иметь геном, дополненный двумя хромосомами трипсакума. Считалось, что присутствие столь незначительного генетического материала от дикого родителя не окажет решающего влияния на фенотип и хозяйственное значение признаки апомиктических сортов.

На основе таких допущений и была начата программа скрещиваний тетраплоидной кукурузы ($2n=4x=40$, гаплоидный набор хромосом – $10Zm$) с тетраплоидным трипсакумом ($2n=4x=72$, гаплоидный набор – $18Td$), имевшим апомиктический способ размножения. В момент начала работ не был известен тип апомиксиса и возможность экспрессии этого признака в F_1 . К удаче исследователей он оказался доминантным и проявлялся в первом поколении получаемых гибридов.

Позже сотрудницей лаборатории апомиксиса растений ИЦИГ Л.И.Лайковой с коллегами впервые в мире был показан *Antennaria*-тип апомиксиса (митотическая диплоспория) у трипсакума и его гибридов с кукурузой, подтвержденный затем американскими и французскими исследователями. Это принципиальное наблюдение, так как на его основе стало ясно, что комбинативная изменчивость, связанная с возможным кроссинговером, имеющим место при мейотической диплоспории, в нашем случае исключена, следовательно, все потомки гибридов являются клонами и абсолютными копиями матери.

После получения гибридов первого поколения ($2n=56$; $20Zm+36Td$) стала проблема редукции части генетического материала дикого родителя, не имевшей отношения к контролю признака апомиксиса и удаляющей их по морфологии и хозяйственным признакам от кукурузы. Это достигалось двумя способами:

- 1) отбор редких редуцированных апомиктов и B_{II} гибридов, получаемых при опылении 56-хромосомных растений F_1 кукурузой;
- 2) использование более часто встречающихся (около 2–5%) B_{III} гибридов для увеличения доли редуцированных апомиктов и B_{II} гибридов в потомстве.

Редуцированными апомиктами называют потомков, получающихся в результате прохождения мейоза, но развившихся партеногенетически, т.е. без оплодотворения. Так, если гибрид F_1 имел 56 хромосом, то редуцированные формы будут иметь 28 ($10Zm+18Td$). B_{II} гибриды – это растения, получившиеся после оплодотворения редуцированной яйцеклетки, и их геном зависит от плодности опылителя – $2n=38$ ($20Zm+18Td$) в случае использования в качестве отцов диплоидов и $2n=48$ ($30Zm+18Td$) при опылении тетраплоидом.

Наконец, B_{III} гибриды – это потомки от оплодотворения нередуцированной яйцеклетки, и их геномы могут быть 66- или 76-хромосомными в зависимости от использованного пыльцевого родителя. При дальнейшем бекросировании такие B_{III} гибриды во много раз чаще дают редуцированные апомикты и B_{II} гибриды, поскольку соотношение геномов полового и апомиктического родителей возрастает в пользу первого, что и приводит к усиливанию экспрессии признака этого типа размножения у потомков. Далее редуцированные апомикты размножаются бесполосеменным путем, а редуцированные гибриды (B_{II}) либо апомиктически, либо сексуально в зависимости от набора хромосом трипсакума в их генотипе.

При использовании такого цитогенетического подхода Д.Ф.Петрову с коллегами удалось создать широкий ряд апомиктических гибридных линий с добавлением к разному числу кукурузных геномов гаплоидного набора из 18 хромосом трипсакума. Наиболее стабильными из них были 38-хромосомные ($20Zm+18Td$). Но они в силу большого количества генетического материала от дикого родителя были далеки от кукурузы, что исключало перспективу их коммерческого использования. В итоге удалось получить несколько дополненных линий кукурузы с 1–2 хромосомами трипсакума, некоторые из которых при тестировании антициановыми маркерами были квалифицированы как апомикты. Однако специальная проверка

с рецессивным маркером *shugary* (морщинистый эндосперм) не подтвердила этого вывода.

Итак, группа Д.Ф.Петрова успешно получила апомиктические гибриды, показала доминантный характер наследования апомиксиса и возможности редукции хромосом трипсакума. Ими была создана обширная коллекция апомиктов с различным соотношением геномов кукурузы и трипсакума, и наиболее морфологически близкие к кукурузе имели гаплоидный набор из 18 хромосом дикого родителя, что значительно удаляло их от культурного родителя (рис. 2).

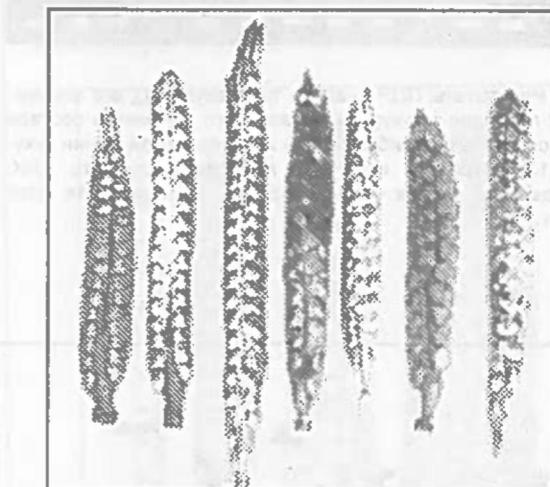


Рис. 2. Початки кукурузно-трипсакумных гибридов: три слева получены от растения $2n=38$ ($20Zm + 18Td$), два в середине получены от растения $2n=48$ ($30Zm + 18Td$) и два справа получены от растения $2n=58$ ($40Zm + 18Td$).

В 1993 году мы получили предложение Министерства земледелия США провести совместные исследования по апомиктической кукурузе с использованием нашего экспериментального материала. Кроме того, наш проект был поддержан РФФИ (гранты № 97-04-49301 и 00-04-49542). Работа по совместному проекту была начата весной 1994 года, и сразу же удалось выявить несколько гибридных линий, имевших 39 хромосом ($30Zm + 9Td$). Результаты гибридологической проверки показали, что они являются апомиктами, это же подтверждалось данными ПЦР (полимеразная цепная реакция) с более чем 60 декануклеотидными праймерами (рис. 3) и единобразием изоморф в бекросовых поколениях. Далее нам удалось установить, что 9 хромосом трипсакума являются минимально необходимыми для поддержания апомиктического способа размножения у гибридов, и потеря любой из них приводит к получению только сексуального типа потомства. Существенным в этих результатах оказалось то, что независимо полученные линии с 9 хромосомами трипсакума как от одного первоначально полученного гибрида F_1 , так и у редуцированных потомков с 9 хромосомами от других независимых скрещиваний содержали одни и те же хромосомы трипсакума! (рис. 4, 5).

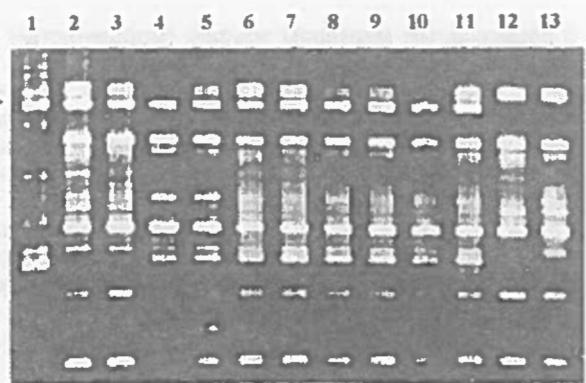


Рис. 3. Результаты ПЦР анализа трипсакума (1), его апомиктических гибридов с кукурузой различного геномного состава (2-11), сексуального гибрида (12) и материнской линии кукурузы (13). Стрелкой помечена последовательность ДНК, наблюдаемая у всех апомиктов, т.е. маркирующая этот признак.

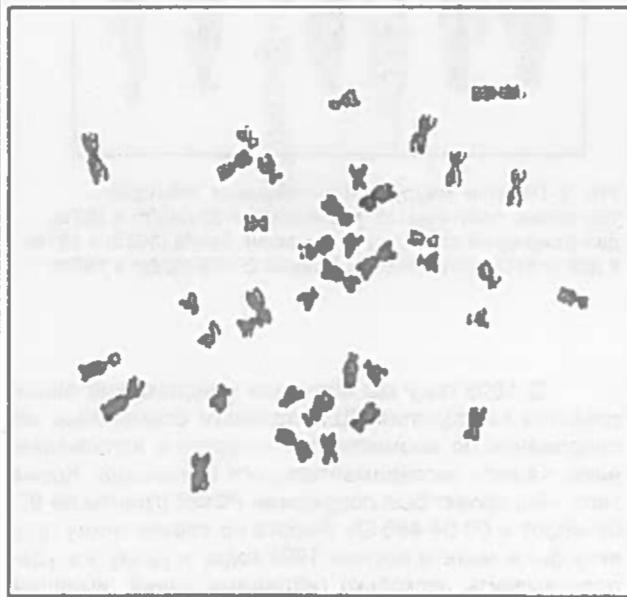


Рис. 4. Кариотип гибрида с 39 хромосомами (30Zm + 9Td).

Отсюда следовало 1) признак апомиксиса является полигенным и для его контроля необходимы 9 хромосом трипсакума; 2) в дальнейшем работу по апомиктической кукурузе надо строить с учетом этого обстоятельства. Реальность второго вывода наших исследований, казалось, закрывала цель – получение апомиктической кукурузы, так как присутствие 9 хромосом дикого родителя должно было существенно влиять на хозяйственное значение признаки этой культуры, прежде всего вес семян гибридов в граммах (~0,06) был гораздо ближе к таковому у трипсакума (~0,03), чем у кукурузы (~0,22). Кроме того, избыточная кустистость также была нежелательна с точки

зрения коммерческой перспективы гибридов. И хотя мы не ставили себе непосредственной целью создание коммерческих сортов, тем не менее должны были вскрыть генетические закономерности апомиктического способа репродукции и наследственные возможности совершенствования гибридов по агрономическим признакам в присутствии 9 хромосом дикого родителя.

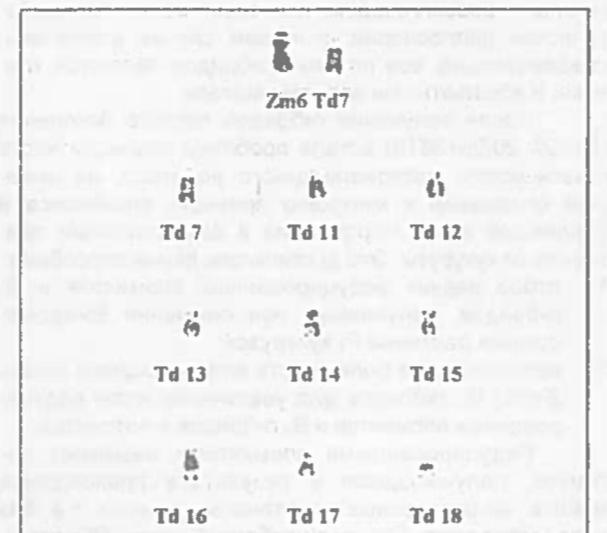


Рис. 5. Девять хромосом трипсакума, наблюдаемые у всех апомиктических гибридов независимо от происхождения.

К сожалению, существуют некоторые особенности при изучении наследования у апомиктов, связанные с отсутствием расщепления у потомков. Это обстоятельство весьма осложняет обсуждение задач исследования и результатов с коллегами и, что особенно печально, с экспертами при получении грантов. Процесс получения генетических результатов при работе с апомиктами более длительный, чем с другими культурами. Так, для того чтобы разрешить старый спор относительно сцепления апомейоза и партеногенеза, пришлось провести обширную программу скрещиваний кукурузы с трипсакумом. Дело в том, что многие исследователи до сих пор считают, что эти составляющие апомиксиса являются одним локусом. Мужской мейоз у трипсакума протекает normally, поэтому возможен кроссинговер и расщепление, чем мы и воспользовались. Скрестив несколько десятков растений кукурузы с трипсакумом, мы получили 46-хромосомные гибриды (10Zm+36Td), которые были опылены пыльцой культурного родителя. Результаты этого анализа следующие:

- 1) 15 семей с числом потомков от 8 до 15 растений были апомиктами;
- 2) 7 семей с числом потомков от 9 до 17 растений имели по одному B_{II} гибриду, и лишь одна из них – три B_{II} гибрида;
- 3) одна семья (15 растений) состояла только из B_{II} гибридов.

Этот результат однозначно говорит о независимом генетическом контроле признаков нередукции и партеногенеза у трипсакума. Кроме того, отсюда и из других наших данных, которые здесь не приводятся, можно сделать вывод о монолокусном контроле апомейоза и полигенном – партеногенеза.

Таким образом, наши результаты существенно изменили представления о генетическом контроле диплоспорического апомиксиса у трипсакума и его гибридов с кукурузой. Как цитогенетические, так и генетические данные говорят о его сложном контроле многими генами. Следовательно, программа работы по совершенствованию линий с добавлением 9 хромосом трипсакума, сформулированная нами, является верной, и усилия по гено-инженерному пути создания апомиктов, начатые в некоторых лабораториях, не имеют ясных перспектив, так как не известны необходимые гены, их число, и нет стратегии их передачи и организации экспрессии в нужное время в нужном месте.

Понимая, что апомиктические гибриды должны будут конкурировать за рынок с кукурузой, мы провели сравнительный анализ признаков, по которым они превосходят ее. К таковым необходимо отнести:

- 1) урожай зеленой массы;
- 2) высокую фуражную ценность зеленой массы и содержание протеина в ней;
- 3) содержание перевариваемых компонентов в зеленой массе;
- 4) содержание полиненасыщенных жирных кислот в семенах;
- 5) толерантность к засушливым и переувлажненным почвам.

Эти несомненные преимущества позволили уже сейчас успешно бороться за коммерческое использование гибридов в качестве фуражной культуры, но их полная мужская стерильность пока остается преградой на этом пути. С целью получения потомков от гибридов приходится высевать в качестве опылителя кукурузу, как правило, в 4–5 сроков, с недельным интервалом между ними, что несложно делать в полевом опыте, но совершенно нетехнологично в производстве. Поэтому выяснение механизмов мужской стерильности будет приоритетной проблемой в ближайшее время. Подобная проблема была и с женской фертильностью. Первоначально выделенные 39- и 49-хромосомные линии имели фертильность не более 3–5% на початок (рис. 6). Нам удалось выяснить, что в значительной степени это связано с особенностями роста пыльцевых трубок (рис. 7) при опылении (гаметофитная несовместимость и нарушение направления роста). Подбором опылителей и других факторов удалось добиться 50% фертильности (рис. 6), что с учетом многопочатковости гибридов делает их вполне конкурентоспособными с кукурузой по продуктивности. Вместе с тем в ближайшее время мы надеемся выяснить и устранить другие причины, снижающие женскую фертильность. Как показал предварительный анализ, один из главных факторов, обуславливающих ее, – импринтинг.

Как мы уже отмечали ранее, импринтинг – это специфическое маркирование геномов при формировании генеративных клеток, детерминирующее активность действия некоторых генов в развитии. При этом женские и мужские гаметы импринтируются по-разному и, соответственно, их гены вносят разный вклад в проявление признаков, в частности число делений оплодотворенной центральной клетки (и как следствие размер эндосперма) зависит от взаимодействия генов, импринтированных при созревании женских и мужских гамет. Женские импринтированные гены подавляют деления, мужские, напротив, стимулируют, т.е. увеличивают размер зерновки.

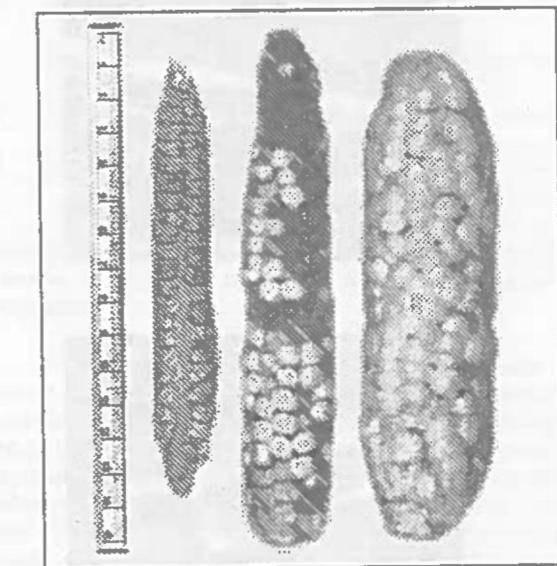


Рис. 6. Слева направо: обычный 39-хромосомный гибрид (30Zm + 9Td); продвинутая форма с ~50% женской фертильностью (30Zm + 9Td); родительская форма кукурузы.

Для нормального развития эндосперма у растений, размножающихся половым путем, необходимо соотношение женских и мужского геномов 2 : 1 соответственно, в ином случае он не развивается, что приводит к abortivности зародыша. Здесь важно отметить, что это правило, являющееся абсолютным для кукурузы, не работает строго у апомиктов.

У кукурузы импринтируемые гены, действие которых в сильной степени сказывается на развитии эндосперма и его размере (следовательно, и на урожае!), локализованы в основном в хромосомах 5, 4 и 10. Особенно значительным эффектом на величину эндосперма обладает хромосома 5. Поэтому созданная нами линия гибрида, имеющая в качестве дополнительной эту хромосому (21Zm + 18Td), дает вес семян (~ 0,11, рис. 8) в два раза больший, чем 38-хромосомные (20Zm + 18Td).

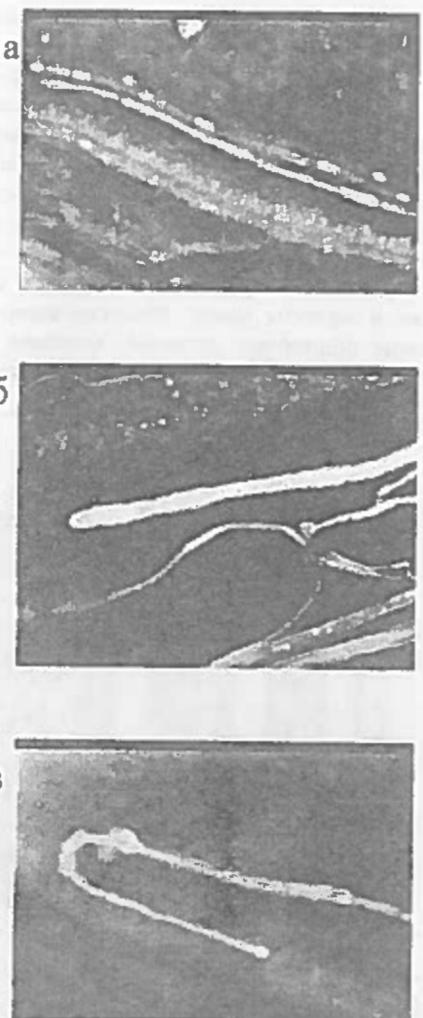


Рис. 7. Рост пыльцевых трубок: а – нормальный рост; б – остановка роста; в – потеря таксиса и обратный рост.

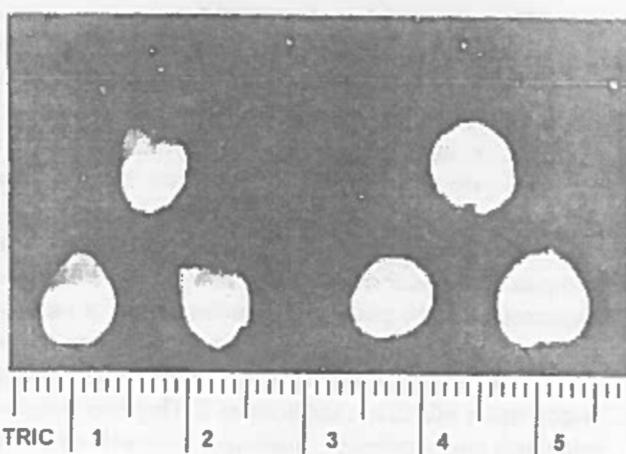


Рис. 8. Эффект хромосомы 5 на размер семян: слева 39-хромосомное растение (20Zm + Zm5 + 18Td), опыленное тетраплоидом, справа семена материнской тетраплоидной кукурузы.

Итак, в результате работы по проекту РФФИ показана сложность генетического контроля апомиктического развития, вскрыты механизмы женской стерильности бесполосенных гибридов и показаны пути ее преодоления. Изучены генетические механизмы импринтинга и пути повышения продуктивности апомиктических гибридов с использованием этого эффекта. Получен патент США – «Апомиктическая кукуруза» за № 5,710,367, зарегистрированный в 11 других странах. Но самое главное, создана огромная коллекция апомиктических линий, которая может быть использована как исходный материал в чисто академических исследованиях различных аспектов апомиктического развития от генетики до эмбриологии и в практической работе по созданию коммерческих сортов.

К великому сожалению авторов, сибирский климат является существенным препятствием в нашей работе, так как время вегетации наших линий около 4 месяцев, безморозный период в Новосибирске – 100–110 дней. Но более всего угнетает финансовый «климат», и данная работа не могла быть выполнена без поддержки Министерства земледелия США и гранта Международного центра размножения растений (Нидерланды № 047.007.019).

Авторы приносят искреннюю благодарность РФФИ (грант № 00-04-49542), а также всем, оказавшим материальную поддержку данного исследования, и многочисленным коллегам в США, Европе, Австралии за постоянное внимание и дискуссии, которые помогали нам в работе.

В.А. Соколов, д.б.н., зав. лабораторией цитологии и апомиксиса растений ИЦИГ СО РАН, Новосибирск

И.С. Хатылова, н.с., ИЦИГ СО РАН, Новосибирск

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПА ПО ФЕНОТИПУ С ПОМОЩЬЮ КОРРЕЛЯЦИЙ ПРИЗНАКОВ

Фундаментальный вопрос о соотношении вклада наследственности и среды в формирование количественных признаков по-прежнему остается актуальным в общей генетике, селекции, медицинской генетике человека, психологии, социологии и т.д. Не прекращается поиск новых подходов к решению проблемы эффективной селекции количественных признаков.

Методология любого исследования определяется научной парадигмой, или совокупностью исходных постулатов [1]. В данном случае она задана выделением двух основных понятий – «генотип» и «фенотип». Современная широкая трактовка генотипа как единой системы взаимодействующих наследственных элементов, определяющих пути развития организма [2], в сущности, возвратилась к исходному смыслу, вложенному в него В.Л. Иогансеном: «... Генотип – это совокупность всех наследственных задатков. Фенотип является суммой различных

свойств, определяемых взаимодействием между наследственными задатками и влиянием среды» [3].

До сих пор исследования по генетике были связаны преимущественно с анализом признаков *regr*, что базируется на популярном постулате однозначного соответствия «ген-признак» и соответственно на представлении о генотипе как совокупности потенциальных признаков. Биометрический подход к генетическому анализу количественных признаков, как правило, не обеспечивает всех требований теории и селекционной практики по своим результатам, так как использует модели и методы, построенные зачастую на весьма неточных и неадекватных предпосылках [4, 5]. Ограничено применение коэффициента наследуемости в селекции связано с тем, что вычисление наследуемости в широком смысле (H^2) применимо только при массовом отборе, а в узком смысле (h^2) – требует такой полноты знаний о генетике формирования признака, что их наличие делало бы излишним вычисление этого коэффициента [6]. Разложение фенотипической вариансы на составляющие не утверждалось в практике селекции, а используется в работах модельного характера.

Феноменологический подход, напротив, использует точные методы математической статистики для анализа количественных признаков, но не учитывает в явном виде конкретных механизмов наследования [6]. Эти подходы, не исключая друг друга, имеют свои достоинства и недостатки. Теоретическая проработка существующих подходов и методик исследований количественных признаков уже сделана в исследовании Э.Х. Гинзбурга [7] и выходит за рамки данного сообщения.

На наш взгляд, понятие «наследственные элементы» достаточно широко по смыслу и включает не только совокупность потенциальных признаков организма, но также и совокупность всевозможных взаимосвязей, которые определяются наследственной конституцией. В этом случае исходный постулат исследования формулируется следующим образом: «генотип как совокупность потенциальных признаков и взаимосвязей, обусловленных наследственностью». Тогда и понятие «гапартил как ненаследуемое в организме», введенное Г.В. Сименсоном [8], будет определяться как «совокупность эффектов (включая и взаимосвязи), обусловленных внешней средой». Эти постулаты определяют иную общую методологию анализа вклада наследственности и среды в фенотип, включающую целенаправленное выявление взаимосвязей, разграниченных по факторам биологической изменчивости: наследственному, средовому и т.д. [9, 10].

В гибридных популяциях паратипическая (экологическая) изменчивость количественных признаков значительно превышает генотипическую [11]. По этой причине селекционный отбор гибридов по фенотипу, равно как и последующая оценка созданных кандидатов в сорта, крайне затруднена. Для уменьшения паратипической составляющей в общей фенотипической дисперсии предлагается применять методы стандартизации условий содержания [12, 13] либо использовать фоновые индексы и поправки [14, 15]. Задача усложняется тем, что предметом отбора обычно являются

ся отдельные хозяйствственные характеристики, тогда как урожай в целом создается согласованным взаимодействием (корреляций) этих параметров.

В данной работе использован феноменологический подход, дающий однозначную, точную и корректную интерпретацию результатов в терминах математической статистики для описания наследования количественных признаков и оценки селекционных мероприятий [6, 7]. Математический аппарат, использованный нами, был описан ранее [9, 10].

Базовой моделью исследования является классическая модель Р.Фишера, характеризующая случайное варьирование признака по закону нормального распределения [16]. Приняты следующие допущения.

1. Факторы биологической изменчивости независимы друг от друга.
2. Выборочные средние являются несмещенными оценками генеральных средних.
3. Уровни факторов не учитываются, т.е. факторы носят стохастический характер.
4. Количественное значение признака линейно зависит от колебаний фактора изменчивости.

В случае трех независимых факторов (генетического, экологического и временного) фенотипическое выражение признака выглядит следующим образом:

$$X_{ijk} = \mu_x + G_{xi} + E_{xj} + D_{xk} + \varepsilon_{xijk}$$

Здесь X_{ijk} – наблюданное фенотипическое значение признака (X); μ_x – математическое ожидание для среднего по всем наблюдениям этого признака (M_x); G_{xi} – математическое ожидание эффекта i -го генотипа, E_{xj} – математическое ожидание эффекта j -х экологических условий; D_{xk} – математическое ожидание эффекта k -го момента времени наблюдения признака; ε_{xijk} – ошибка наблюдения признака X в условиях ijk .

Учет влияния отдельных факторов осуществляется следующим образом. В случае, если значение признака определяется одномоментно или

$$D_x = 0,$$

формула разложения признака приобретает вид:

$$X_{ij} = \mu_x + G_{xi} + E_{xj} + \varepsilon_{xij}$$

Далее при полной стандартизации условий внешней среды ($E_x=0$) проявляется только генотипическая изменчивость организмов и

$$x_i = \mu_x + G_{xi} + \varepsilon_{xi}$$

Таким образом, в данном случае вся фенотипическая изменчивость признака X определяется только эффектом i -го генотипа по данному признаку плюс случайным отклонением ε_x .

Аналогичные рассуждения по поводу другого количественного признака (Y) у того же объекта наблюдения приводят к формуле:

$$y_j = \mu_y + G_{yj} + \varepsilon_{yj}$$

Вычисление фенотипической линейной корреляции между набором значений x_i и y_j дает искомое значение генотипической корреляции между признаками X и Y [17].

При стандартизации генотипов варьирование внешних условий приводит к

$$y_j = \mu_y + E_{yj} + \varepsilon_{yj}$$

$$x_i = \mu_x + E_{xi} + \varepsilon_{xi}$$

и коэффициент корреляции между фенотипами X и Y есть экологическая корреляция.

Динамическая (сезонная, онтогенетическая, времененная) корреляция определяется как фенотипическая при

$$x_k = \mu_x + D_{xk} + \varepsilon_{xk}$$

$$y_k = \mu_y + D_{yk} + \varepsilon_{yk}$$

Иными словами, фенотипические корреляции признаков вызваны сопряженной изменчивостью, определяемой как алгебраическая сумма смещений (факторных эффектов) относительно константы μ . Очевидно, что для выявления, например, генотипической корреляции необходимо нивелировать все факторы, кроме вариабельности генотипов. Создание средовой (экологической) однородности достигается путем максимально возможной стандартизации экспериментальных условий (фитотронные камеры для растений, рацион питания для животных и т.д.). Идентичность генотипов достигается путем клонирования или создания чистоплинного генетического материала. Влияние фактора времени наблюдения можно уменьшить, если проводить все наблюдения одновременно. Остальные неучтенные факторы ослабляются рандомизацией эксперимента.

Принятие линейной аддитивной модели со случайными факторами позволяет, не прибегая к непосредственной стандартизации факторов изменчивости, условно нейтрализовать эффекты отдельных факторов путем введения соответствующих факторных поправок в конкретные наблюдаемые значения признака и на этой основе выявлять искомые взаимосвязи. Такой подход при расчете генотипической корреляции приведен на рисунке 1. Большим эллипсом обозначено корреляционное поле для общей фенотипической корреляции без внесения факторных по-

правок, малые эллипсы – корреляционные поля в отдельных выборках и в объединенной выборке после учета факторных поправок.

В рандомизированной группе наблюдений n генотипов в t экологических ситуациях конкретная последовательность операций вычисления генотипической корреляции между признаками X и Y следующая:

а) вычисление среднего значения признака по каждой экологической ситуации

$$\bar{x}_i = \sum (x_i)/n$$

$$\bar{y}_i = \sum (y_i)/n$$

б) определение общего среднего (μ) по каждому признаку

$$\mu_x = \sum (x_i)/t$$

$$\mu_y = \sum (y_i)/t$$

в) определение величины линейного экологического смещения выборок

$$E_{xy} = \mu_x - \bar{x}_i$$

$$E_{yy} = \mu_y - \bar{y}_i$$

г) внесение линейной факторной (в данном случае экологической) поправки в выборки данных дает t совокупностей x_i и y_i

$$x_i = x_i - E_{xy}$$

$$y_i = y_i - E_{yy}$$

д) объединение всех значений x_i и y_i в общую выборку по признакам X и Y , в которой изменчивость обусловлена компонентой G_x .

Коэффициент линейной корреляции между X и Y после внесения поправок на генотипический фактор дает искомый коэффициент генотипической корреляции.

Выявление экологической корреляции между X и Y происходит подобным образом, но с внесением соответствующих генотипических поправок G_x и G_y .

Конкретное применение данного подхода проиллюстрируем на примере корреляционного анализа количественных признаков мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по результатам, полученным в ходе осуществления селекционно-генетической программы «ДИАС» [18]. Использованы числовые данные по следующим признакам продуктивности:

aestivum L.) по результатам, полученным в ходе осуществления селекционно-генетической программы «ДИАС» [18]. Использованы числовые данные по следующим признакам продуктивности:

1. Число дней от появления всходов до колошения (ЧДВК).
2. Общее число стеблей на растении (ЧС).
3. Длина главного стебля (ДГС).
4. Длина нижнего (первого надземного) междуузия.
5. Длина колоса (ДК).
6. Число зерен в колоске (ЧЗКК).
7. Вес зерна с растения (ВЗР).
8. Вес 1000 зерен (ВТЗ).

Участниками программы исследовано 15 сортов в 8 различных экологических зонах в течение 2 лет (1974–1975). Повторность наблюдений в каждом пункте – восьмикратная. Подробное описание эксперимента дано в коллективной монографии В.А.Драгавцева и др. [18]. Уровень заполнения матрицы данных близок к 100%, что обеспечило общий объем выборки в более 30000 чисел. Приближение распределения данных к нормальной форме достигали путем логарифмирования параметров. В случае объединения данных по годам использована межгодовая поправка. Вычисления проводились по приведенной выше схеме. Для устранения эффекта случайного компонента ε определение μ проводили по внутрисортовым либо экологическим средним.

На рисунках 2–4 представлены результаты корреляционного анализа признаков, отражающих основные морфолого-функциональные элементы продуктивности: продолжительность онтогенеза, кустистость растений, интенсивность вегетативного прироста на разных этапах развития, интенсивность развития генеративных органов и параметры налива зерна.

Общее число фенотипических корреляций существенного уровня ($r > 0,60$ при $p < 0,001$) сильно варьировало по годам от 6 в 1974 до 2 в 1975. Следует отметить, что все они положительны, а подавляющее большинство из выявленных связей очень мало и они не достигают установленного критического уровня (0,60). Не обнаружено ни одной связи высокого (более 0,80) уровня. Объединение данных двух лет не привело к росту числа связей. Напротив, большинство корреляций при этом исчезает. Это свидетельствует о том, что имеет место феномен ослабляющего влияния неучтенных факторов [19]. Добавим, что причины фенотипической сопряженной изменчивости признаков при этом остаются вне поля зрения, так что дать адекватную содержательную интерпретацию нестабильности корреляций невозможно, за исключением общих спекуляций на тему эффектов тех или иных погодных особенностей в разные годы наблюдений.

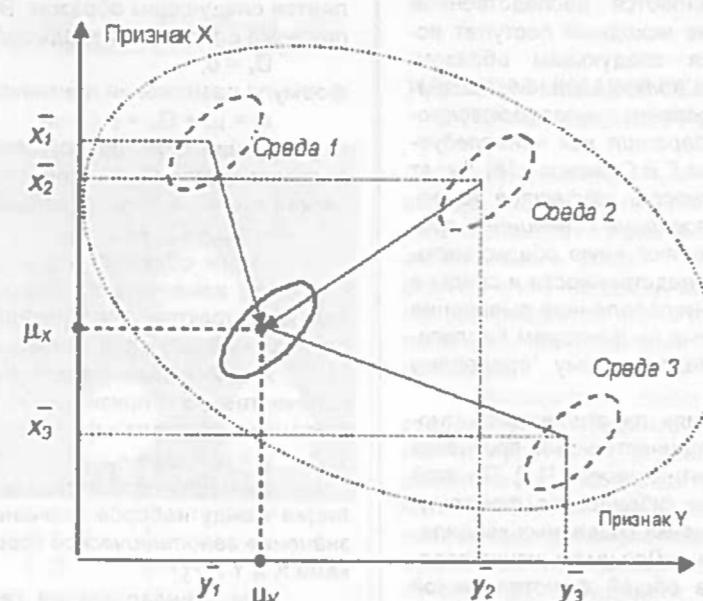


Рис. 1. Схема внесения факторных поправок при объединении разнородных данных для оценки генотипической корреляции между признаками X и Y (обозначения в тексте).

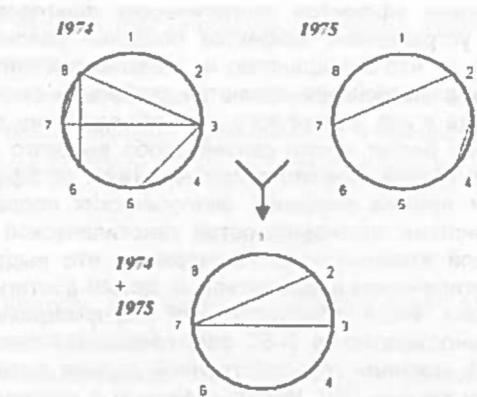


Рис. 2. Фенотипическая корреляция количественных признаков пшеницы («ДИАС»).
1 – продолжительность периода «всходы-колошение»;
2 – общее число стеблей; 3 – длина главного стебля;
4 – длина нижнего междуузия; 5 – длина колоса; 6 – число зерен в колоске; 7 – общий вес зерна с растения; 8 – вес 1000 зерен. — $0,60 < r \leq 0,80$.

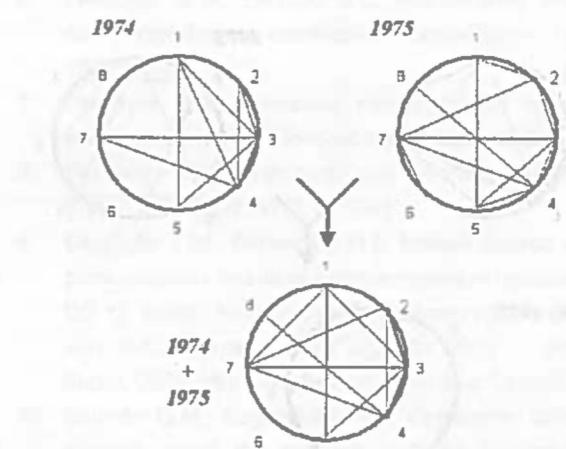


Рис. 3. Генотипическая корреляция количественных признаков пшеницы («ДИАС»).
1 – продолжительность периода «всходы-колошение»;
2 – общее число стеблей; 3 – длина главного стебля;
4 – длина нижнего междуузия; 5 – длина колоса; 6 – число зерен в колоске; 7 – общий вес зерна с растения; 8 – вес 1000 зерен. — $0,80 < r \leq 1,00$. — $0,60 < r \leq 0,80$.

Внесение экологических факторных поправок с целью выявления генотипической корреляции выявило следующее (рис. 3). Общее количество связей, превзошедших пороговый уровень «существенности» в 0,60, составило в 1974 и 1975 гг. по 9 в каждый год, причем все они положительны. Это свидетельствует о проявлении генотипических связей, которые были скрыты в фенотипе и стали заметны благодаря очистке от экологических «наслоений». При объединении данных по годам число генотипических связей выросло до 11. Очевидно, это связано с еще большим

устранением эффектов экологических факторов, а именно устранением эффектов погодных различий. Характерно, что большинство из выявленных генотипических взаимосвязей остаются стабильно высокими из года в год. Более того, при объединении данных вдвое растет число связей особо высокого (более 0,80) уровня. Все это свидетельствует об эффективности приема внесения экологических поправок для «очистки» закономерностей генотипической спряженной изменчивости. Подчеркнем, что выделение генотипических коррелятивных связей достигнуто в условиях, когда параптический информационный «шум» многократно (в 3–50 раз) превышает генотипический «сигнал», по собственной оценке авторов исходных данных [18]. Использованный в программе «ДИАС» набор не родственных между собой сортов изучался в экологически достаточно удаленных друг от друга зонах (около 1000 км по географической широте и более 3000 км по долготе). Пестрота условий географических точек и лет испытания плюс генетические различия сортов на уровне фенотипа «смазали» корреляционные связи признаков. Введение факторных поправок позволило установить генетические корреляции, что существенно как для построения модели сорта, так и для анализа результатов их испытания.

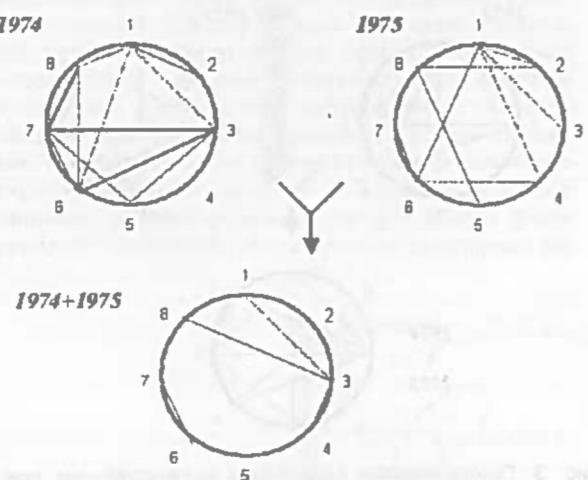


Рис. 4. Экологическая корреляция количественных признаков пшеницы («ДИАС»).

1 – продолжительность периода «всходы-колошение»; 2 – общее число стеблей; 3 – длина главного стебля; 4 – длина нижнего междуузлия; 5 – длина колоска; 6 – число зерен в колоске; 7 – общий вес зерна с растения; 8 – вес 1000 зерен. — 0,80 < r ≤ 1,00. 0,60 < r ≤ 0,80.

Внесение генотипических поправок выявляет совершенно иную картину (рис. 4). Несмотря на то, что благодаря факторным поправкам выявляются многочисленные экологические взаимосвязи (в 1974 г. – 11, а в 1975 г. – 7), вместе с положительными наблюдаются и отрицательные корреляции. Экологически стабильны лишь две пары признаков: число дней до

колошения – длина стебля и число зерен колоса – вес зерна одного растения. Прямое объединение данных двух лет привело, с одной стороны, к общему падению числа связей существенного уровня (до 4), а с другой – к полному исчезновению связей особо высокого уровня. Большинство связей не стабильны, вплоть до того, что меняют знак на противоположный в разные годы (например: срок колошения с числом побегов кущения или с числом зерен в колосе).

Все это означает, что благодаря стандартизации по генотипам выявляются экологические корреляции, обусловленные почвенными и погодными различиями. При прямом объединении данных разных лет начинает заметно проявляться действие еще одного, третьего фактора изменчивости. По-видимому, этим фактором являются процесс онтогенеза пшеницы (в частности, условия прохождения критических фаз развития) и его взаимодействие с параметрами экологических ситуаций в разные годы. На это указывает то, что в обоих случаях смены знака существует временной параметр – число дней от всходов до колошения (ЧДВК). Выделение в чистом виде экологически обусловленных корреляций признаков важно для изучения пластичности генотипов, их адаптации к условиям среды.

Известно, что влияние факторов изменчивости гораздо сильнее отражается на корреляциях признаков, чем на их абсолютных значениях [19]. Это связано с широко известным феноменом канализации или буферности процессов формирования признаков и, в частности, с сохранением параметров гомеостаза организма [20]. Следовательно, можно с полным основанием говорить о генотипических и экологических корреляциях, обеспечивающих (обслуживающих) в конечном итоге адаптацию и нормальную жизнедеятельность организмов в различных условиях среды. Поэтому исследования корреляций представляют интерес при создании адаптивных генотипов и получении требуемых характеристик продуктивности.

Очевидно, что в данном случае биологическая специфика выбранного объекта селекции не играет роли. Метод факторных поправок одинаково успешно может работать на любых объектах. Однако необходимо отметить один существенный момент, относящийся к реальному характеру селектируемых признаков. В случае наиболее сложных параметров, таких, как общая продуктивность, очевидно, необходимо учитывать эффект взаимодействия факторов. Если же признаки относительно просты (например, отдельные элементы продуктивности, содержание отдельных химических веществ и т.п.), то их формирование обеспечивается единственным механизмом (нет «забуференности» внешними отрицательными и положительными обратными связями) и они относительно слабо вовлекаются в процесс канализации. Корреляционный анализ таких признаков по отдельным факторам изменчивости наиболее эффективен.

Другой существенный момент заключается в следующем. Принято считать, что для адекватной интерпретации результатов линейного корреляционного анализа необходимо, чтобы форма распределе-

ния экспериментальных данных была близка к нормальному. Однако, за исключением случаев грубых артефактов, принципиальная важность этого требования, как правило, преувеличивается. Практика многих исследований показывает, что величина r мало чувствительна к асимметрии распределения. Логарифмическая трансформация числовых данных, многократно уменьшая коэффициент асимметрии, влияет на величину r лишь на уровне сотых долей [21]. Более того, округление исходной информации при вычислении ранговой корреляции и корреляционного отношения позволяет в большинстве случаев преодолеть ограничения, налагаемые асимметрией.

Возвращаясь к началу статьи, напомним, что реальный прогноз фенотипического значения количественного признака чрезвычайно затруднен. И дело здесь не в слабой методологической и методической базе, а в сложности самих объектов селекции и в недооценке роли многих неучтенных факторов, которые, наряду с генотипом, определяют изучаемые признаки. Понадобился напряженный целенаправленный труд многих научных коллективов на протяжении ряда лет, чтобы в итоге прийти к обоснованному заключению, что параптический «шум» в формировании рассмотренных выше признаков продуктивности у пшеницы многократно превышает генотипическую компоненту [18]. И это без учета вклада процессов онтогенеза, еще одного важнейшего и сложнейшего фактора. Пока что дело ограничивается лишь включением этого фактора в общую блок-схему формирования признака [22]. Создание соответствующего биометрического аппарата для более точного прогноза значения количественного признака – дело будущего.

Предлагаемая методология делает возможным еще один вариант прогноза. Речь идет не об абсолютном, а об относительном экологическом либо генотипическом прогнозе селектируемого признака по комплексу коррелятивных связей. Метод линейных факторных поправок – лишь первое, наиболее грубое приближение, но уже в таком виде он демонстрирует свою результативность. Принятые допущения в большинстве случаев не противоречат реальным ситуациям, поэтому предварительная линейная трансформация исходных числовых данных позволяет провести дальнейшую детализацию исследования, например, факторный анализ, выявление корреляционных плеяд и т.д. Не претендую на исчерпывающую полноту результатов, этот прием может быть полез-

ным также и при сравнении различных генотипов в селекции.

Таким образом, излагаемый здесь метод может найти широкое применение и в процессе создания новых сортов, и при их экологическом испытании.

Литература

1. Краткая философская энциклопедия. М.: Прогресс, 1994. С. 332.
2. Инге-Вечтомов С.Г. Генотип // Биологический энциклопедический словарь. М.: Сов. энцикл., 1989. С. 126.
3. Иогансен В.Л. Элементы точного учения об изменчивости и наследственности. М.: Сельхозгиз, 1933. 410 с.
4. Hiorth G.E. Quantitative Genetik. Berlin a.o.: Springer-Verlag, 1963. Р. 2–3.
5. Хатт Ф. Генетика животных. М.: Колос, 1969. С. 281.
6. Гинзбург Э.Х., Никоро З.С. Разложение дисперсии и проблемы селекции. Новосибирск: Наука, 1982. 168 с.
7. Гинзбург Э.Х. Описание наследования количественных признаков. Новосибирск: Наука, 1984. 250 с.
8. Siemens H.W. Konstitutions- und Vererbungspathologie. Berlin, 1921. (Цит. по [3, С. 198]).
9. Скуридин Г.М., Багинская Н.В. Новый подход в корреляционном анализе количественных признаков // Сб. тр. конф., посвященной 90-летию со дня рождения А.А.Ляпунова. 8–11 октября 2001 г. Новосибирск, 2001. <http://www-sbras.nsc.ru/wc/Lyap2001/>.
10. Skuridin G.M., Baginskaya N.V. Correlation database analysis using the method of factor corrections // Proc. Intern. Conf. «Genetic collections of isogenic and alloplasmic lines». Novosibirsk: Inst. Cytol. and Genet. 2001. Р. 280–284.
11. Гужов Ю.Л., Гнейм А.Р. Закономерности варьирования количественных признаков у гороха, обусловленные модификациями и генетическими различиями // Генетика. 1982. Т. 18, № 2. С. 82–99.
12. Литун П.П. Приемы уменьшения фенотипической изменчивости и ее компонентов на разных этапах отбора в селекции // Генетика количественных признаков сельскохозяйственных растений. М., 1978. С. 93–100.
13. Литун П.П., Манзюк В.Т., Барсукова П.Н. Методы идентификации генотипов по продуктивности растений на ранних этапах селекции // Проблемы

- отбора и оценки селекционного материала. Киев: Наук. Думка, 1980. С. 16–28.
14. Драгавцев В.А., Шкель Н.Н., Ничипоренко Н.Н. Задачи идентификации генотипов растений по фенотипам // Вопросы селекции и генетики зерновых культур: Сб. науч. тр. М., 1983. С. 291–298.
 15. Мартынов С.П., Крупнов В.А. Экспериментальная проверка эффективности селекционного индекса на яровой пшенице // Цитология и генетика. 1982. Т. 16, № 4. С. 36–39.
 16. Fisher R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance // Trans. Roy. Soc. Edinburgh. 1918. P. 399–433. (Цит. по [6, С. 16].)
 17. Драгавцев В.А. Методы оценки генотипической, генетической и экологической корреляции количественных признаков в растительных популяциях // Генетический анализ количественных и качественных признаков с помощью математико-статистических методов. М., 1973. С. 45–47.
 18. Драгавцев В.А., Цильке Р.А., Рейтер Б.Г. и др. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири. Новосибирск: Наука, 1984. 230 с.
 19. Ефимов В.К., Галактионов Ю.К., Галактионова Н.С. О связи величин коэффициентов корреляции и вариации с абсолютными значениями признаков // Журн. общей биологии. 1977. Т. 38, № 1. С. 24–26.
 20. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений. Кишинев: Штиинца, 1980. С. 77–79.
 21. Куршакова Ю.С. Корреляционный и регрессионный анализ в практическом применении // Теория отбора в популяциях растений: Сб. науч. тр. Новосибирск: Наука, 1976. С. 49–57.
 22. Драгавцев В.А., Литун П.П., Шкель Н.М., Нечипоренко Н.Н. Модель эколого-генетического контроля количественных признаков растений // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274, № 3. С. 720–723.

Г.М. Скуридин, н.с.
С.Ф. Коваль, к.б.н., с.н.с.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

ОТКРЫТИЕ «ФИЛОГЕОГРАФИИ» ДЖОНА СИ АВИСА

Слово «филогеография» совсем недавно вошло в обиход молекулярной биологии. С ним связано возникновение нового направления на пересечении интересов современной геномики, классической по-

пуляционной биологии и таких традиционных дисциплин, как биогеография, демография, систематика. Удобный рабочий термин «внутривидовая филогеография / *intraspecific phylogeography*» был предложен для замены многословных описаний при наблюдении природного феномена географического распределения генных филогенетических паттернов стремительно распространялся в мире (без России) вслед за прогрессом в молекулярно-генетических методах анализа митохондриальной ДНК. Уже через десятилетие захватывающих исследований на птицах, млекопитающих и, в особенности, на человеке возникла необходимость крупных обобщений. В 1998 г. был опубликован специальный выпуск международного журнала «Molecular Ecology», а в 2000 г. под грифом Гарвардского университета издана монография «Phylogeography». Ее автор – Джон Си Авис, профессор генетики университета штата Джорджия в Атланте, США, которому принадлежит сам термин «филогеография» (Avise, 2000). Эта книга – первая монографическая презентация филогеографии, новой научной дисциплины о географическом распространении внутривидовых генных потоков.

Автор определяет филогеографию как область исследований, связанную с принципами и процессами, ответственными за географическое распространение генных родословных. Любые генетические признаки (морфологические, поведенческие, молекулярные и иные) могут использоваться для филогеографических (в широком смысле слова) построений. Однако в чистом виде филогеография изучает закономерности пространственного распределения аллелей, филогенетические взаимоотношения которых известны или могут быть установлены. Поэтому к этой категории не могут быть отнесены аллели, исследуемые, например, традиционной популяционной генетикой и ее дериватом, белково-электрофоретическим анализом, поскольку исторические связи таких аллелей не подлежат установлению. Рабочим инструментом филогеографии является анализ генных родословных митохондриальной ДНК. В силу особенностей строения и эволюции митохондриальный геном обладает преимуществами перед ядерным геномом в аспекте генеалогическом, открывая доступ к «фамильным архивам видов» (формулировка Ависа, Avise, 1989), хотя бы только по материнской линии. Диплоидия и рекомбинация препятствуют использованию многих других генетических маркеров для целей филогеографии.

Книга ни в коей мере не предназначена быть только методическим или учебным руководством. Автор лишь в силу необходимости касается принципов филогенетического анализа митохондриального генома и указывает на сложность и специфику математического аппарата обработки данных, чему посвящена огромная часть специальной литературы. Однако на непосвященного читателя даже схематизированные графические представления производят ошеломляющее впечатление богатством иерархически ветвящихся генеалогий. Эта особенность, вопреки распространенному мнению об анатомозном характере взаимоотношений поколений внутри вида, составляет существо филогеографии и позволяет внести филогенетическую компоненту в дискуссию о внутривидовой эволюции. Использование маркеров mtДНК коренным образом меняет ранг операционной таксономической единицы, в отличие от традиционной систематики, где таковой является вид, и от популяционной биологии, оперирующей с популяциями, в филогеографии сравнимое значение приобретает уже особь. Поэтому в рассуждениях о филогении человека стала идти речь об отдельной «африканской Еве», а не о предковой популяции – родоначальнике современных людей. Практически это методологическое новшество означает избавление от необходимости считать ошибку выборки и произвольного априорного установления границ популяций – двух обязательных условий популяционно-генетического анализа.

Впервые за сто лет развития генетики филогеография произвела важнейший сдвиг в генеалогическом мышлении на подвидовом уровне на основании огромного и универсального эмпирического материала и соответствующего концептуального обеспечения (в рамках теории «коалесценции», т.е. «схождения»). Следование вглубь генеалогий по материнской линии (равно как и по отцовской – по молекулярным маркерам Y-хромосомы, но это вне рамок книги) становится необходимой частью учения о виде. Филографический подход подчеркивает исторические, неравновесные аспекты микрозволюции, выявляет тонкие связи между популяционной демографией и генеалогией и строит мосты между формально разделенными областями популяционной генетики и филогенетической биологии. Молекулярная филогеография меняет представление о виде как о стихийном, по существу, сообществе особей, обладающем общим генофондом (по Добжанскому), или группах скрещивающихся популяций (по Майру). Вид

в новой трактовке мог быть представлен в свете организованных (в пространстве и во времени) генеалогических связей, но новое определение еще не родилось. Авис, правда, не случайно приводит в качестве эпиграфа цитату из классического труда Дж.Г. Симпсона (Simpson G.G. The Principles of classification and a classification of mammals // Bull. Amer. Mus. Natur. Hist. 1945. V. 85. P. 1–350) о том, что поток наследственности делает филогению и что по смыслу он и есть филогения. Но во времена Симпсона генетическое картирование этого потока было еще недостижимым, даже ДНК еще не была открыта. Теперь же дело, скорее всего, в осуществлении кооперации тех сил, которые могли бы обеспечить грамотный подход молекулярного специалиста к видам и внутривидовому разнообразию.

Неортодоксальность филогеографии выражена даже в объектах, на которых выполнены основополагающие исследования. Это прежде всего млекопитающие и птицы – отнюдь не первостепенные объекты традиционной популяционной генетики. Только отчасти это обстоятельство объясняется исследовательскими интересами Ависа – он известен своими ранними работами по белково-электрофоретическому анализу природных популяций птиц и млекопитающих Северной Америки и теоретическими обобщениями в этом направлении (например, Avise, 1974). Особенностями mtДНК определяются более интересные филогеографические результаты у видов млекопитающих и птиц и в целом у животных, например, в сравнении с растениями.

Книга развертывает перспективу последовательного филогеографического подхода в направлении исследования и сохранения биоразнообразия. Автор считает, что необходимы новые большие объемы эмпирических данных, которые способствовали бы развитию сравнительной филогеографии в региональных масштабах. Внимание должно быть уделено совместно распространенным видам с различной историей в одном регионе. Помимо эволюционных уроков, такие исследования полезны для программ сохранения видов и региональных фаун. Наконец, по мнению Ависа, необходима интеграция данных по молекулярным генеалогиям с традиционными разделами биогеографической информации, такими, как способы распределения видов и палеонтологическая летопись. Взаимообогащение было бы полезно для филогеографии и других дисциплин, имеющих отношение к биоразнообразию.

Книгу в России найти нелегко. Поиск в библиотеках Москвы по МБА не дал результатов. По экземпляру, принадлежащему группе цитогенетики ИБР РАН (любезность Е.А.Ляпуновой), подготовлена данная рецензия. Для тех, кто не имеет возможности видеть оригинал монографии, привожу перевод оглавления. Текст книги разбит на 3 части, в каждой по две главы под следующими заголовками: I. История и концептуальное обоснование: 1. История и комплекция филогеографии; 2. Связь демографии с филогенией. II. Эмпирическая внутривидовая филогеография: 3. Уроки из исследований человека; 4. Внутривидовые паттерны у других животных. III. Генеалогические согласования: внутри и вовне видеообразования. 5. Генеалогические согласования; 6. Процессы видеообразования и протяженная генеалогия.

Библиографический раздел в книге очень большой – более тысячи наименований. Стоит заметить, что список работ и самого автора книги весьма внушителен – 47 наименований. Названия работ Дж.Ависа дают картину ясного следования без каких-либо блужданий в направлении, открытом им еще в 1987 г. Книга не оставляет сомнений в том, что исследование видов в природе наконец получает новые молекулярные стимулы и что в направлении молекулярной филогеографии Джон Си Авис – бесспорный лидер.

Библиографический список и отклики на книгу за рубежом показывают, что претендовать на приоритеты в филогеографии могло бы больше лиц, но первый автор термина стал также первым, выпустившим монографию. В этом списке нет только русских публикаций и в единичном случае встречается имя русского соавтора в международном коллективе авторов. По странному стечению обстоятельств филогеографию у нас никто своевременно не разглядел, если иметь в виду работы с зоологическими видами. Можно было бы привычно пожаловаться на бедность Но...

В ленинские 1920-е и сталинские 1930-е годы климат в науке был далек от тепличного. Но именно тогда Н.И.Вавилов открывает закон гомологических рядов в наследственной изменчивости (Вавилов, 1920; Vavilov, 1922) и обосновывает им систему линнеевского ботанического вида (Вавилов, 1930, 1931). Собственно с этих работ начинается великое вхождение генетики в науку о виде. Традиционно для западной науки, и Авис здесь не исключение, вести отчет начали генетики вида с книги Добжанского 1937 года (Dobzhansky T. *Genetics and the Origin of Species*.

New York: Columbia University Press. 1937). Еще позже, в 1940 г., будут опубликованы работы Э.Майра и Дж.Хаксли. Вавиловское определение вида уже включит в себя географическую составляющую: «При динамическом понимании видов как систем приходится учитывать историю видов, их расселение в пространстве, нередко требующее от исследователя знания геологии, учета изменений материков, наступления ледников, роли горообразовательных процессов в изоляции видов. Изучая вид, не приходится забывать его историчности... Линнеевский вид, таким образом, в нашем понимании – обособленная сложная, подвижная морфофизиологическая система, связанная в своем генезисе с определенной средой и ареалом» (Вавилов, 1931).

Поэтому когда мы будем переоткрывать филогеографию, мы свой отчет начнем с Н.И.Вавилова.

Литература

1. Avise J.C. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts/London, England. 2000. 447 p.
2. Avise J.C. Systematic value of electrophoretic data // *Syst. Zool.* 1974. V. 23. P. 465–481.
3. Avise J.C. Nature's family archives // *Natur. Hist.* 1989. V. 3. P. 24–27.
4. Avise J.C. et al. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1987. V. 18. P. 489–527.
5. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости // Докл. на III Всерос. селекц. съезде в Саратове 4 июня 1920 г. Саратов: Губполиграфотдел, 1920. 16 с.
6. Vavilov N. The law of homological series in hereditary variability // *J. Genet.* 1922.
7. Вавилов Н.И. Доклад V Международному ботаническому конгрессу, Кембридж, август 1930 г. (на англ. яз.).
8. Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1931. Т. 26. Вып. 3. С. 109–134.
9. Dobzhansky T. *Genetics and the Origin of Species*. N.Y.: Columbia University Press, 1937.

Н.Ш.Булатова, к.б.н., с.н.с., Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н.Северцова РАН, Москва

НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ 2001 ГОДА ПО ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ ПРИСУЖДЕНА ЗА УСПЕХИ В ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Лауреатами премии «Ключевые регуляторы клеточного цикла» стали Л.Хартвелл (Leland Hartwell), США, Т.Хант (Timothy Hunt), Англия и П.Нурс (Paul Nurse), Англия. Клеточный цикл представляет собой чередование фаз: G1 (каждая из гомологичных хромосом представлена одной копией); S (синтез сестринских хромосом); G2 (синтез сестринских хромосом закончен) и M (митоз – формирование веретена и расходжение хромосомных наборов). Л.Хартвеллом у дрожжей *S. cerevisiae* был открыт класс генов, продукты которых участвуют в контроле перехода G1-S, называемом также «Старт» (1). Последующее молекулярное изучение одного из таких генов – *cdc28* – показало, что его продукт – это протеинкиназа, активность которой регулируется циклинами. Позднее этим же автором было найдено обобщение свойств точки «Старт», которое касалось уже не только перехода G1-S, но также и перехода G2-M – концепция «checkpoints» (точек контроля) (2). Существо явления заключается в обнаружении класса условных мутаций, проявляющихся на фоне действия мутагена и приводящих к летальному митозу в этих условиях. Такие мутации отличаются от мутаций по процессу reparации тем, что их нормальные аллели вызывают задержку клеточного цикла на «точках контроля» при наличии мутагена, в то время как условные мутации по reparации такой задержки не вызывают. Таким образом, «точки контроля» клеточного цикла представляют собой механизм, который предохраняет делящиеся клетки от летального митоза, останавливая деление и давая время системе reparации для восстановления повреждений ДНК.

П.Нурсом, работавшим на другом виде дрожжей (*S. pombe*), были найдены мутации *wee1*, *cdc25* и *cdc2*, изменяющие критический размер клеток, при достижении которого происходит переход G2-M (3). Соответствующие гены кодируют протеинкиназу, фосфатазу и протеинкиназного партнера циклина B. Ген *cdc2* по первичной структуре гомологичен (63%) гену *cde28* *S. cerevisiae* и может быть функционально замещен последним. При детальном изучении оказалось, что *cdc2* также вовлечен и в контроль G1-S-перехода. У млекопитающих, согласно новой номен-

натуре, гомолог гена *cdc2* обозначается как *cdk1*, а продукт – p34.

Другая линия исследований регуляции клеточного цикла представлена Т.Хантом. Из экспериментов по микроинъекционному переносу цитоплазмы между ооцитами лягушки, находящимися на различных стадиях клеточного цикла, а также из экспериментов по слиянию клеток млекопитающих, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, стало ясно, что существует цитоплазматический фактор, вызывающий переход клеток к митозу, названный MPF (maturation promoting factor) – название отражает его способность вызывать мейоз в ооцитах лягушки в отсутствие гормона прогестерона. Как оказалось, MPF состоит из двух субъединиц – каталитической субъединицы, гомологичной Cdc2, и периодически синтезируемой и распадающейся субъединицы, названной циклином B.

Заслуга Т.Ханта состоит в том, что он показал периодический распад циклина B в клеточном цикле (4), первым клонировал ген циклина B у морского ежа *Arbacia* (5) и нашел гомологичные гены у других организмов.

В целом успех этого направления был основан на удобстве генетического объекта (у дрожжей имеются гаплоидные штаммы, в которых индуцированные мутации проявляются без дополнительных скрещиваний, что позволяет осуществлять отбор среди индивидуумов порядка 10^6 (для других эукариот этот параметр существенно ниже – 10^4). Отсутствие хорошей цитологии у этих объектов не помешало исследованиям, так как оказалось возможным характеризовать стадию клеточного цикла, на которой оказывается эффект мутации, простым размером клеток (размер почки у *S. cerevisiae* и размер дочерней клетки у *S. pombe*). Это позволило создать коллекции *cde* (cell division cycle) мутантов, насчитывающие сотни мутаций, и затем выбрать среди них наиболее интересные (6, 7).

Более подробная информация об устройстве клеточного осциллятора (циклин B/cdc2-комплекс и белки, взаимодействующие с этим комплексом), функциях MPF, контроле G1-S-перехода размещена на сайте молодых ученых ИЦИГ СО РАН <http://www.bionet.nsc.ru/ICIG/CHM/>.

Литература

1. Hartwell L., Culotti J., Pringle J.R., Reid B.J. Genetic control of the cell division cycle in yeast // Science. 1974. V. 183. P. 46–51.
2. Hartwell L., Weinert T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events // Science. 1989. V. 246. P. 629–634.
3. Russell P., Nurse P. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog // Cell. 1987. V. 49. P. 559–567.
4. Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J. et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division // Cell. 1983. V. 33, № 2. P. 389–396.
5. Pines J., Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2987–2995.
6. Hartwell L., Mortimer R., Cullotti J., Cullotti M. Genetic control of the cell division cycle in yeast: Genetic analysis of cdc mutant // Genetics. 1973. V. 74, № 2. P. 267–286.
7. Nurse P., Thuriaux P., Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Mol. Gen. Genet. 1976. V. 146, № 2. P. 167–178.

Л.В.Омельянчук, д.б.н., ИЦИГ СО РАН,
Новосибирск

Материалы в «Информационный вестник ВОГиС» направлять по адресу:
630090, Новосибирск-90, просп. ак. Лаврентьева, 10.

Институт цитологии и генетики, Р
Тел: (383-2)
Факс: (383
e-mails: vogis@cgi.nsk.ru

При перепечатке материалов

Гл. редактор
В.Х.Шумный, академик
(Новосибирск)
Тел.: (3832) 333526
Факс: (3832) 331278
E-mail: shunny@bionet.nsc.ru

Зам. главного редактора
И.К.Захаров
(Новосибирск)
Тел.: (3832) 332906
Факс: (3832) 331278
E-mail: zakharov@bionet.nsc.ru

Редколлегия:
С.Г.Инге-Вечтомов,
член-корр. РАН (С.-Петербург)
Тел.: (812) 2133016
Факс: (812) 2133025
E-mail: inge@btic.bio.psu.ru

Ю.П.Алтухов,
академик РАН
(Москва)
Тел.: (095) 1356213
E-mail: yualt@vigg.ru

Н.А.Колчанов,
(Новосибирск)
Тел.: (3832) 333468
Факс: (3832) 331278
E-mail: kol@bionet.nsc.ru

С.В.Шестаков,
член-корр. РАН
(Москва)
Тел.: (095) 9393512

В.Н.Стегний,
(Томск)
Тел.: (3822) 234261
Факс: (3822) 415616

Л.А.Джапаридзе,
(С.-Петербург)
Тел.: (812) 2182411
Факс: (812) 2133025
E-mail: flora@ecol.spb.ru

В.С.Коваль,
секретарь редакции
(Новосибирск)
Тел.: (3832) 333462
Факс: (3832) 331278
E-mail: kovalvs@bionet.nsc.ru

Е.А.Боровских,
выпускающий редактор
(Новосибирск)
Тел.: (3832) 333911
Факс: (3832) 331278
E-mail: borovsky@bionet.nsc.ru