

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ КРУПНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ В ГЕНОМЕ РАСТЕНИЙ

В.А. Бердников

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с теорией Дарвина, эволюция, направляемая движущей формой естественного отбора, изменяет морфологию организмов малыми шагами. С точки зрения современной эволюционной генетики, в основе таких изменений лежат аллельные замещения в отдельных локусах. Мутации могут быть нейтральными, когда приспособленность их носителей не отличается от остальных особей, вредными, когда носители проигрывают в приспособленности, и благоприятными, если носители мутации имеют повышенные шансы на оставление потомства. При отборе в пользу благоприятного аллеля популяция должна оставить без потомства (убить в генетическом смысле) значительную часть своих особей. Степень благоприятности аллеля в конечном счете определяется его нуклеотидной последовательностью. Если принять, что все гены генома нужны для адаптации организма, то потеря любого гена или почти каждое изменение его строения должны сказываться негативно на приспособленности популяции. Опыт экспериментальной генетики, в принципе, не противоречит этому: большая часть мутаций или нейтральна или явно вредна. Есть еще один подход к проблеме – так называемый эволюционный подход. Он основан на существовании мутационного давления на каждый ген и на каждый нуклеотид. Для растений это примерно 6.5×10^{-9} на нуклеотид в год (Vandepoele et al, 2003). Мощность этого давления такова, что за 80 млн лет каждый нуклеотид может быть заменен с вероятностью 50%. Отсюда понятно, что если нечто выдержало этот пресс, то оно было спасено отбором. В связи с этим, нахождение какого-либо работающего гена, общего для видов, разделенных длительной эволюцией свидетельствует о его положительном вкладе в приспособленность.

Все многоклеточные – и животные и растения - имеют довольно характерный набор генов, управляющих процессом развития, в ходе которого из оплодотворенной зиготы появляется сложный многоклеточный организм. В последнее время появилась предположение, что эволюция связана с изменением именно этих генов. Действительно, есть мутации, которые сразу меняют таксономическую принадлежность особи. У мухи жужжальца могут превратиться в

задние крылья далеких предков, у гороха однократно перистый лист может стать дважды-перистым, как у меловых предков. Эти наблюдения реанимировали сальтационные идеи, согласно которым есть мутации (так называемые системные мутации, сальтации) меняющие ход развития на его ранних этапах и тем самым способные сменить принадлежность особи роду или даже семейству. Однако системные мутации (именно из-за своей системности) не могут быть благоприятными фактически ни при каких обстоятельствах. Во всяком случае, ни одна системная мутация у дрозофилы или мыши ничего не даёт особи, кроме уродства. Но все это верно для животных. А как дело обстоит у растений?

Цветковые или покрытосеменные растения являются в настоящее время основным компонентом флоры. Они насчитывают около 300 000 видов, и их вклад в жизнь биосферы трудно переоценить. Эта группа растений появилась, как сейчас полагают, в первой половине юрского периода (около 180 млн лет назад), но основные современные семейства сформировались к концу мелового периода (Wikström et al, 2001). Белки хромосом у растений и животных практически одни и те же. Индивидуальное развитие тех и других управляется сходными генами-регуляторами. Есть, пожалуй, несколько существенных особенностей в системе развития растений. Во-первых, здесь отсутствует зародышевый путь, так как зародышевые клетки регулярно возникают из постоянно обновляющихся соматических клеток кончика стебля. Во-вторых, продукты мейоза образуют самостоятельный организм – гаметофит, несколько клеток которого содержат редуцированный набор хромосом. В-третьих, в оплодотворении со стороны каждого родителя участвует по две клетки гаметофита.

Для нас более важны особенности эволюции растений. Здесь мы имеем все основания говорить о регулярно случающихся сальтациях. Представьте себе, что есть два родственных диплоидных вида, которые существуют независимо друг от друга уже несколько миллионов лет (Рис 1).

Аллополиплоидизация в эволюции растений

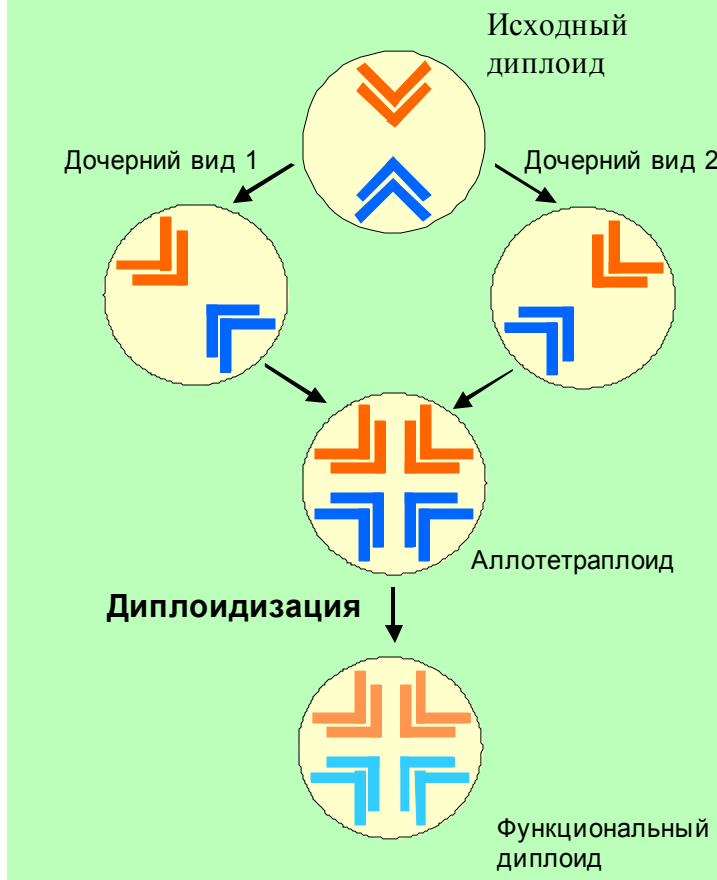


Рис. 1.

Каждый из них характеризуется своей морфологией и адаптирован к своей среде обитания. И тем не менее, с определенной вероятностью особи этих двух видов могут скреститься друг с другом, дав начало аллотетраплоидной особи с геномом, являющимся суммой геномов обоих видов. Так как оба вида родственны, то они обладают практически одним и тем же набором генов, поэтому у аллотетраплоида имеется четыре варианта каждого гена, по два от каждого генома. Такой организм может размножаться самоопылением и породить популяцию любых размеров. Причем особи ее не могут скрещиваться ни с одним из родительских видов. Оказалось, что в современной флоре цветковых растений примерно одна треть являются аллополиплоидами, а на Севере, и в горах их доля возрастает до 90%. С точки зрения нормального дарвинизма, такие тетраплоидные гибриды должны быть нежизнеспособными монстрами, а на деле, они зачастую прекрасно приспособлены к жизни. Единственный их минус (а может быть и плюс) это неспособность удержать все четыре копии генов в исходном

состоянии. К тому же их гаметы диплоидны, что снижает эффективность гаметного отбора. В итоге, вскоре после образования аллополиплоидов стартует процесс потери полного числа аллелей с $4 \text{ к } 2$, что означает их постепенную диплоидизацию (Рис 1).

Встает вопрос, а не являются ли современные диплоидные виды бывшими полиплоидами? – Ответ: скорее да, чем нет. Оказалось, что даже носители очень маленьких геномов с небольшим числом хромосом (например арабидопсис), на самом деле могут быть бывшими полиплоидами. Это обнаруживается изучением последовательности одних и тех же генов в разных негомологичных хромосомах. Сравнение степени расхождения нуклеотидных последовательностей дублированных генов у арабидопсиса показало, что у его предков имело место по не менее трех туров дубликаций, захвативших большую часть генома. Эти события произошли в промежутке между 200 – 100 млн лет назад (Simillion et al, 2002; Bowers et al, 2003). 180 млн лет – это время появления цветковых растений. Получается, что вся эволюция этой гигантской по численности видов группы протекала под знаком утилизации лишних генов.

Анализ размещения дублированных фрагментов в геноме риса показал их повышенную концентрацию в некоторых хромосомах (Vandepoele et al, 2003). Удивительно, что те же фрагменты оказались дублированными у всех изученных злаков. Отсюда вытекает, что незадолго до возникновения всего семейства злаков имела место дубликация только одной хромосомы. Такое явление называется гиперплоидией. Конкретно это трисомии или тетрасомии. Гены, расположенные в дублированных фрагментах, разошлись у риса со средней величиной $K_s = 0.87$, что соответствует 67 млн лет. Оценки дивергенции основных злаков дают величину около 50 млн лет. Если полиплоиды вполне жизнеспособны, то анеуплоиды всегда уступают и диплоидам и полиплоидам. Но они возникают довольно легко и следовательно, довольно часто. Так в потомстве гетерозигот по транслокации с большой частотой появляются третичные трисомии (Рис 2).

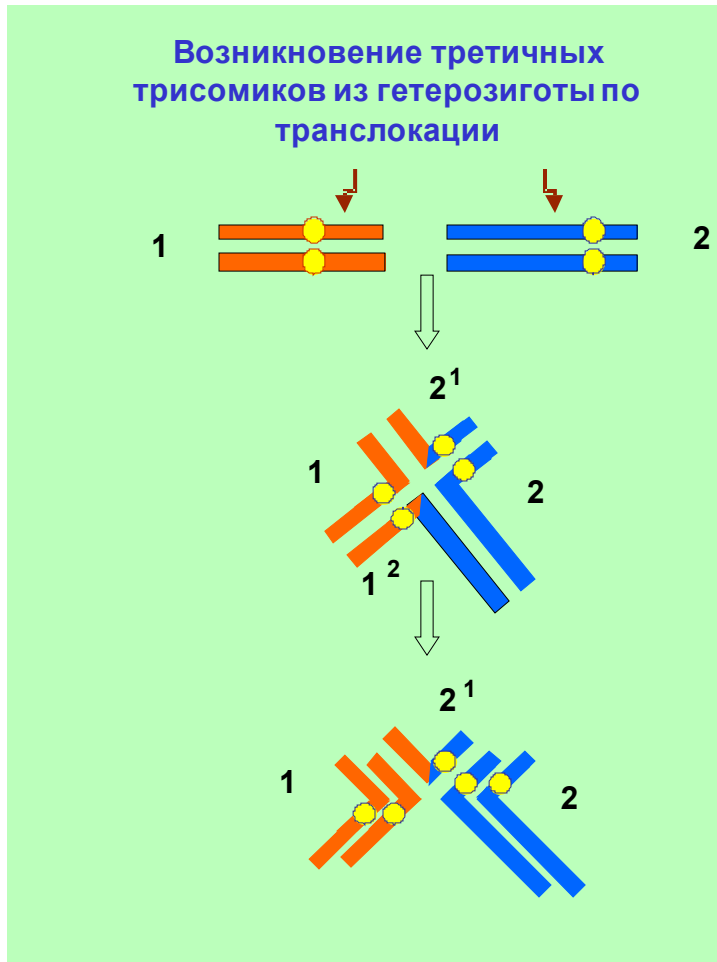


Рис. 2.

Какова судьба дополнительной хромосомы?

1. Она может быть легко потеряна, так как потомство трисомика от самоопыления и от скрещивания с диплоидом в основном состоит из более жизнеспособных диплоидов.
2. Есть одна ситуация, когда лишняя хромосома спасает трисомика. В популяции гетерозигот по транслокации в одну из хромосом с нормальным порядком может попасть мутация – рецессивная спорофитная леталь, убивающая организм в гомозиготе. Но трисомик, появляющийся в потомстве от самоопыления, может жить, так как экстрахромосома несет нормальную копию гена (Рис 3).

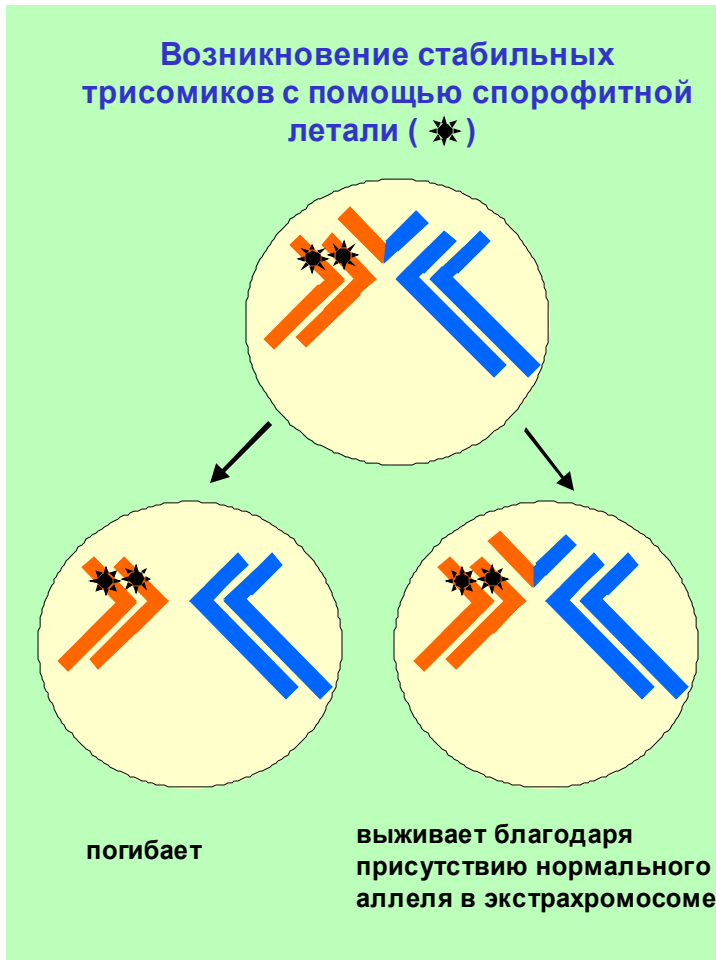


Рис. 3.

Интересно, что потомство такого трисомика состоит исключительно из трисомиков с генотипом родителя. Это показывает, как в природе может появиться популяция состоящая исключительно из трисомиков. Есть правда одно условие, которое необходимо выполнить. – хромосомный обмен между леталью в точке разрыва должен быть подавлен (Berdnikov et al, 2003).

Геном интегрирован системой межгенных взаимодействий, при этом некоторые гены должны поддерживать друг с другом отношение 1:1. Такое соотношение называется генным балансом. Заметим, что у тетраплоида баланс не нарушен, но у трисомика соотношение некоторых генов изменяется до 1,5:1. Нарушение генного баланса означает снижение приспособленности трисомиков и особенно тетрасомиков. Молекулярная сторона этого явления остается пока неясной. Хотя ясно, что есть гены, ответственные за генный баланс, которые способны «считать» число копий других генов.

Генный баланс может быть восстановлен тремя способами:

1. Снижением дозы генов захваченных дупликацией. Следует заметить, что преимущественные гаметофитные летали и детриментали должны накапливаться преимущественно в экстрахромосоме (Рис 4) (Berdnikov et al, 2003).

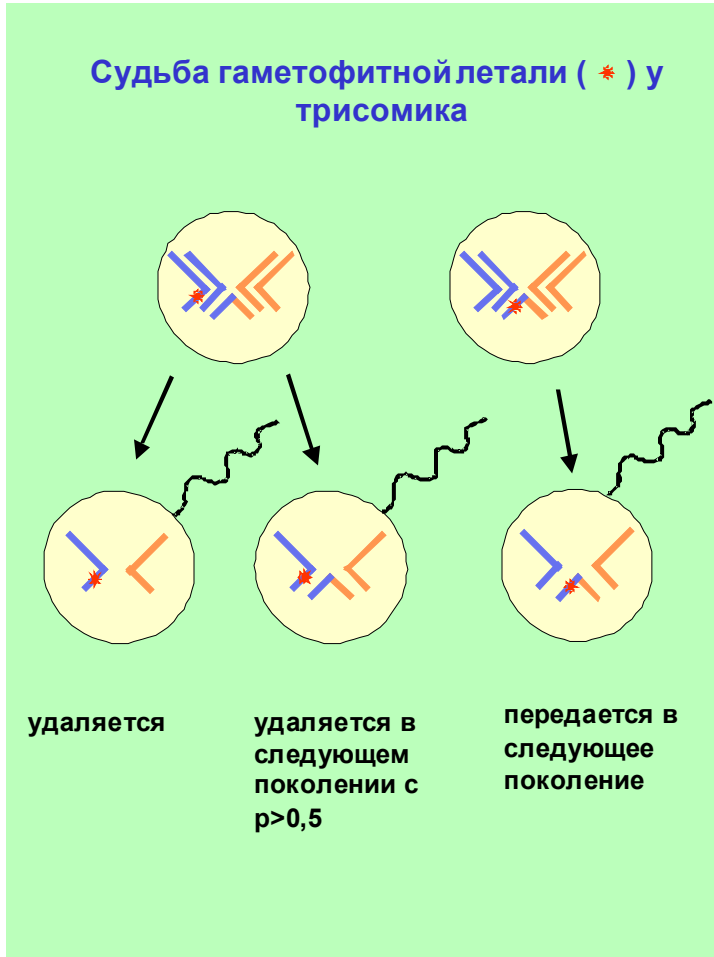


Рис. 4.

2. Увеличением дозы генов, считающих дозу дублированных генов.
3. Преобразованием лишних генов, с тем чтобы их копияность упала, но сами гены могли быть использованы для реализации новых функций.

Обобщение

Главная особенность гиперплоидов состоит в том, что их приспособленность в сравнении с родительским видом существенно снижена, поэтому их популяции находятся под постоянным давлением отбора, стремящимся снизить уровень генного дисбаланса. Это постоянное давление отбора способно существенно ускорить процессы,

ведущие к функциональной диверсификации генов, что лежит в основе серьёзных эволюционных сдвигов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРЕДИСТОРИЯ

Мы потратили несколько лет на создание модели для исследования такой проблемы. В качестве объекта был выбран горох *Pisum sativum*. Этот вид очень чувствителен к гиперплоидии. Трисомики обычно очень слабы и стерильны. Правда, нет правил без исключений. Гетерозиготы по одной транслокации – транслокации Хаммарлунда – в определенном проценте дают трисомиков, которые, хотя и уступают по силе диплоидам, но достаточно успешны и способны давать фертильное потомство (Pellew, 1940). Сначала мы ввели в нормальную хромосому 3 рецессивную мутацию, *cri* сильно изменяющую морфологию листьев. Это позволило легко отличать в потомстве трисомиков. Трисомики имели нормальный фенотип, а диплоиды – мутантный (Рис 5).

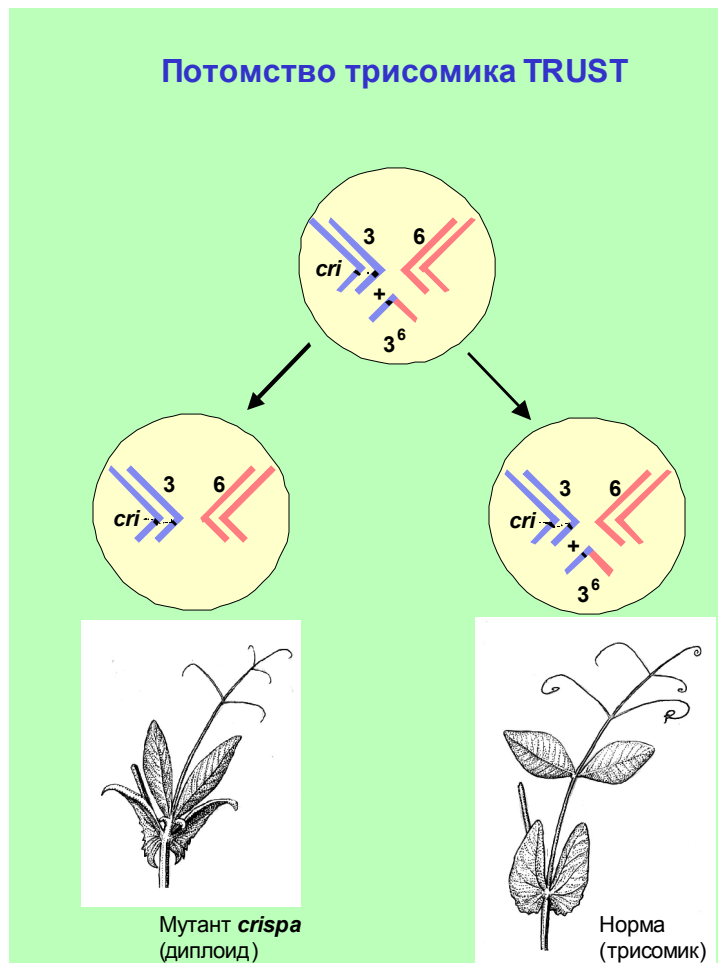


Рис. 5.

Далее, мы индуцировали рядом с мутацией *cri* еще одну мутацию – эмбриональную леталь *remover*, после чего в потомстве трисомиков исчезли диплоиды. То есть, мы получили популяцию стабильных трисомиков, содержащих в своем геноме небольшую экстрахромосому (Рис 6, 7) (Berdnikov et al, 2003).

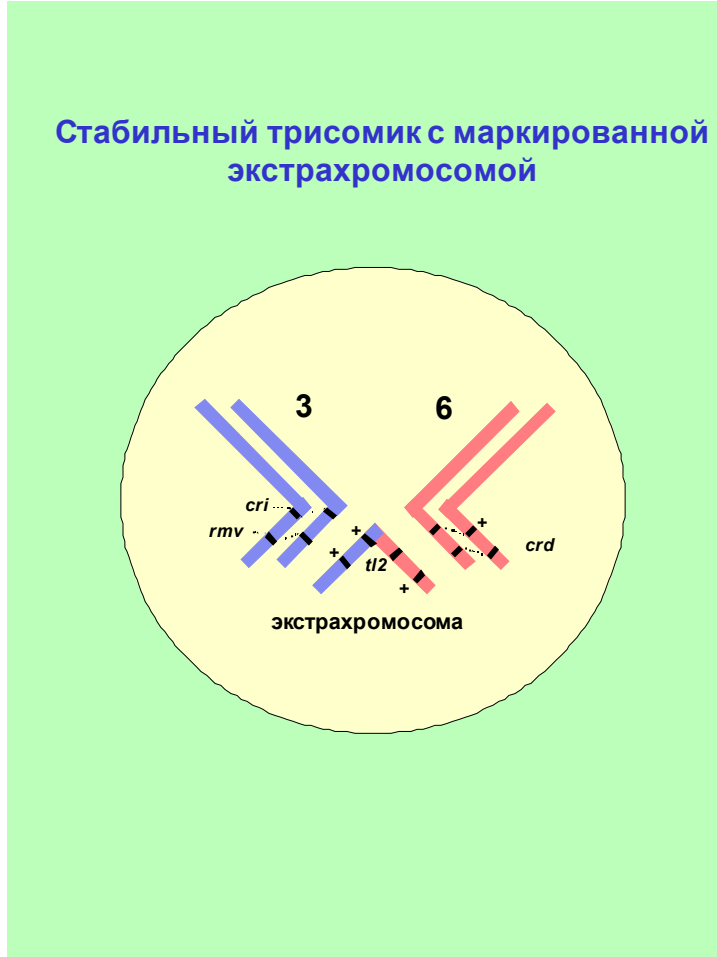
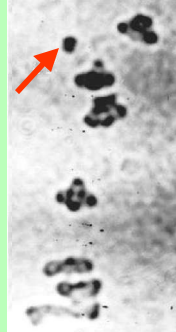


Рис. 6.

Экстрахромосома трисомика TRUST-R в мейозе и митозе

МЕЙОЗ



МИТОЗ

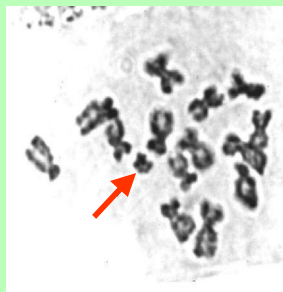


Рис. 7.

Эти растения мы успешно культивируем уже 4 года. Более того, в этом году нам удалось ввести в экстрахромосому полудоминантную мутацию *t12*, превращающую усики листа гороха в узкие листочки. Тем самым мы получили дополнительный критерий присутствия экстрахромосомы. Мы установили, что экстрахромосома не рекомбинирует с хромосомами основного набора (Berdnikov et al, 2003). Это обстоятельство предопределяет ее избирательную деградацию вследствие накопления гаметофитных мутаций. Ещё одной особенностью наших трисомиков является их неспособность порождать тетрасомиков. Мы искали их чрезвычайно прилежно, просмотрев тысячи растений, но не нашли ни одного тетрасомика в потомстве стабильных трисомиков (Berdnikov et al, 2003). Очевидно, тетрасомики гибнут из-за непереносимости генного дисбаланса.

В настоящее время мы располагаем набором стабильных трисомиков, у которых районы хромосом основного набора, гомологичные экстрахромосоме, несут генетические маркеры. В одной из стабильных трисомных линий (TRUST-R-

23) мы в течение 11 поколений проводили отбор на увеличение числа семян. Важно отметить, что этот отбор протекал в отсутствии искусственного мутагенеза.

Нетрудно заметить, что мы располагаем моделью, фактически воспроизводящей один из моментов эволюции растений. Поскольку по приспособленности трисомии несколько уступают нормальным диплоидам, то важно оценить, с какой скоростью эта разница в приспособленности может быть устранена в реальной эволюции. Для этого нужно оценить скорость спонтанного мутирования по генам ответственным за дисбаланс и число таких генов. Наличие хорошо разработанной генетики гороха и нескольких стабильных линий с маркированными экстрахромосомами позволяют решить эти задачи. В рамках данного проекта мы ставим перед собой следующие задачи:

1. Сравнить растения трисомной линии по всевозможным параметрам после 11 поколений отбора на число семян, собранных с одного растения. Прежде всего следует провести тщательное измерение растений.

2. Провести обработку семян трисомии химическим мутагеном, и найти мутантов с повышенной мощностью и плодовитостью.

3. Провести генетический анализ и хромосомную локализацию мутаций, полученных в эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

Berdnikov VA, Gorel FL, Kosterin OK, Bogdanova VS (2003). Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. *Heredity* 91: 577-583.

Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422: 433-438.

Pellew C (1940). Genetical studies on the first reciprocal translocation found in *Pisum sativum*. *J Genet* 39: 363-390.

Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MC, Zabeau M, Van de Peer Y (2002). The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13627-13632.

Vandepoele K, Simillion C, and Van de Peer Y (2003). Evidence that rice and other cereals are ancient aneuploids. *Plant Cell* 15: 2192-2202.

Wikström N, Savolainen V, Chase MW (2001). Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proc R Soc Lond* 268: 2211-2220.