

УДК 575.24 : 633.11

Ханс КЮЙТС, Тойво ОРАВ, Кадри ЯРВЕ

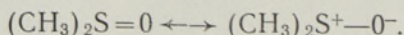
ВОЗМОЖНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В СЕЛЕКЦИИ ЯЧМЕНЯ

В селекции ячменя уделяется большое внимание получению сортов с разными сроками созревания, в особенности сверхраннеспелых, так как они дают возможность провести уборку части полей до начала основных уборочных работ (Кюйтс, Орав, 1987). В условиях Эстонской ССР наиболее раннеспелым сортом считается 'Отра' со средним вегетационным периодом немного более 80 дней. Поскольку традиционными методами селекции от 'Отра' не удалось получить более ранних форм, было решено применить обработку высокоэффективными химическими мутагенами типа нитрозоалкилмочевин. В популяциях, полученных от обработки мутагенами, было выделено около 150 раннеспелых мутантов, из которых наиболее перспективной оказалась форма М-33.

В опытах на Йыгеваской селекционной станции в 1983—1985 гг. урожайность М-33 приравнивалась к сорту 'Отра' (соответственно 35,9 и 36,6 ц/га), в производственных опытах (на полях нескольких совхозов республики) — значительно превосходила ее. Вегетационный период М-33 был в среднем на три дня короче, чем у 'Отра' (78 и 81 дней). По высоте форма М-33 на несколько сантиметров уступала 'Отра', а по массе 1000 зерен была примерно равной. Несколько устойчивее был М-33 к полеганию. Зато по двум представляющим практический интерес признакам М-33 значительно превзошел 'Отра' — содержание протеина было на 0,6% выше (15,6 и 15,0%), а пленчатость — на 0,6% ниже (8,8 и 9,4%). Таким образом, форма М-33 весьма перспективна для практики.

Каталогизация выделенных мутантов показала, что, в отличие от других измененных форм, М-33 происходит не из вариантов обработки супермутагенами, а из контрольного варианта с растворителем. В этом опыте контрольные варианты были двоякие.

В «контроле с водой» семена ячменя находились в течение 16 ч в водопроводной воде, затем 4 ч промывались в проточной воде. Однако данные этого контроля нельзя считать адекватными, поскольку как N-нитрозометилмочевина, так и N-нитрозоэтилмочевина плохо растворимы в воде и для получения раствора нужен еще третий компонент — специальный растворитель. Значит, нужен и дополнительный контроль с последующим промыванием, как и в вариантах мутагенной обработки. В данном случае, как и в большинстве работ с нитрозоалкилмочевинами, растворителем служил 1%-ный диметилсульфоксид (DMSO)



DMSO — превосходный растворитель многих органических и анионно-органических соединений как в практике химического мутагенеза (Руеуо, 1978), так и при тестировании мутагенности химических соединений, например, при апробации 18 соединений по трем локусам у *Salmonella typhimurium* (Skopek, Thilly, 1983).

DMSO считается генетически неактивным — это доказано тестами на *Schizosaccharomyces pombe* и на культуре клеток китайского хомяка V 79 (Abbondandolo и др., 1980).

В рапорте Международной комиссии по защите от мутагенов среды (International Commission..., 1983) приведены результаты исследования мутагенности в восьми системах. В шести случаях мутагенного действия не было обнаружено, в одном — результаты нечеткие, а в другом — при концентрации 1400 мМ (~11%) повысилась частота генетических изменений от $2,2 \cdot 10^5$ до $7,5 \cdot 10^5$ (объект *Saccharomyces cerevisiae*). Авторы доклада считают, что в данном случае DMSO сыграл роль промутагена при метаболической активации. Другие авторы (Singh и др., 1973) показали, что DMSO способен вызывать респираторно-дефицитные клетки в растущих культурах дрожжей, но является генетически инактивным в стационарных культурах.

Т. Сальникова и др. (1976, 1980) доказали на семенах мягкой пшеницы, что DMSO (5%-ный раствор) в качестве растворителя способствует достоверному снижению генетической активности мутагенов — нитрозоалкилмочевин НММ, НДММ, НЭМ и НДЭМ, и усиливает мутагенный эффект НМБ. В то же время DMSO, как и некоторые другие органические растворители, может вызывать незначительное повышение частоты мутантов в M_1 и M_2 по сравнению с контролем без растворителя. Способность DMSO к повышению или понижению действия мутагенов отмечена и другими авторами (Herman и др., 1978; Yahagi и др., 1977).

Последний факт (появление небольшого количества измененных форм в M_1) наводит на мысль о том, что в случае DMSO мы имеем дело с индуцированной реализацией ранее имеющихся в популяции отклоняющихся от основного типа генов, т. е. с «эффектом выявления». Способность индуцировать подобную реализацию установлена нами у многих биологически активных веществ (Орав, Орав, 1971; Калам, Орав, 1974; Орав, 1981, 1983), в том числе и у эндогенных ферментов ячменя (Шангин-Березовский, Орав, 1975). Из работ последних лет (Шангин-Березовский, Орав, 1987; Орав, 1987) можно заключить, что индуцированная реализация скрыто передаваемого гена представляет собой частный случай т. н. эпигенетической изменчивости. Новый подход к трем формам наследственной изменчивости эукариот — мутационной, вариационной и эпигенетической — дан в работах М. Голубовского. Под эпигенетической изменчивостью он (Голубовский, 1985) понимает наследуемое такое изменение генной активности, при котором активность генетического материала меняется без изменения его структуры. Понятие эпигена как структурной основы такой изменчивости введено Р. Чураевым (1975). По его подходу эпиген — это циклическая система, состоящая по крайней мере из двух генов и обладающая не менее чем двумя функциональными состояниями, «переключение» которых фиксируется наследственно.

В наших опытах роль «переключателя» играют индуцирующие реализацию гена химические вещества, описанные в случае с формой М-33 — DMSO, в опытах с хлорофильными мутациями ячменя это в основном гидразинхлорид и сланцевые ростовые вещества, но установлено «выявляющее» действие еще у целого ряда препаратов (Орав, 1981). В цитируемой работе приведен также обзор работ Н. Тимофеева-Ресовского периода 1927—1935 гг. по неполной реализации гена у дрозофилы. Наши эксперименты можно считать логическим продолжением его исследований на растительном объекте, который является благодаря богатому и четкому спектру хлорофильных мутаций и самоопылению не менее удобной моделью, чем сама дрозофила.

Эволюционный аспект эпигенетической изменчивости, в частности

индуцированной реализации гена, нами затронут в нескольких работах (Орав, 1983, 1987). Следует отметить, что на формирование наших взглядов ощутимое влияние оказало учение академика Н. И. Вавилова о центрах происхождения культурных растений (Вавилов, 1935) и эволюционные подходы академика Д. Беляева (дестабилизирующий отбор) в интереснейших исследованиях на пушных зверях.

Как же все-таки объяснить появление сверхранней формы ячменя из раннего сорта 'Отра' после воздействия DMSO? В чем роль DMSO как «переключателя» в нашем случае?

Количественные признаки, подобные раннеспелости, нередко определяются олигогенными системами. Такие системы имеются у ряда злаковых по карликовости — они хорошо изучены на примере типа карликовости 'Норин', где рост пшеницы определяется тремя рецессивными генами, каждый из которых сокращает рост растения примерно на 20 см.

В системе определения раннеспелости генотипа 'Отра', по-видимому, существует скрытый ген (скорее всего — один, судя по трудности получения сверхраннеспелых форм) раннеспелости, сокращающий срок созревания примерно на три дня. Обработка DMSO привела к реализации этого гена, что в данном случае означает, на наш взгляд, и полную реализацию наследственных возможностей этого генотипа. Специфично и повторяемо ли подобное действие DMSO, или мы имеем дело со случайной случайностью, должны показать дальнейшие опыты.

Применение эпигенетической изменчивости в селекции делает пока первые шаги, однако перспективность этого метода явна в одном отношении — по сравнению с мутагенезом будет меньше возможностей для проявления сопутствующих отрицательных эффектов (это показывает на экспериментальном материале и данный опыт).

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилов Н. И. Ботанико-географические основы селекции. М.-Л., 1935, 1—60.
- Голубовский М. Организация генотипа и формы наследственной изменчивости эукариот. — В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М., 1985, 146—162.
- Калам Ю., Орав Т. Хлорофильная мутация. Таллин, 1974.
- Кюйтс Х., Орав Т. Перспективные мутанты раннеспелого ярового ячменя. — В кн.: Современные проблемы теории химического мутагенеза. Таллин, 1987, 77—82.
- Орав Т., Орав И. Об изменении пенетрантности индуцированных хлорофильных мутаций при помощи биологически активных веществ. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1971, 20, № 2, 159—167.
- Орав Т. Проблема пенетрантности и его реализации: теоретический и практический аспекты. — В кн.: Академия наук Эстонской ССР в 1973—1979 годах. Таллин, 1981, 214—244.
- Орав Т. Индуцированная активация мутантного гена как способ изучения поведения скрытых и малопенетрантных генов в эволюционном процессе. — В кн.: Вопросы современного дарвинизма. Тарту, 1983, 102—114.
- Орав Т. Определенные аспекты реализации гена как условия его участия в эволюционных процессах. — В кн.: Теоретические проблемы эволюционной биологии. Тарту, 1987 (в печати).
- Сальникова Т., Досмайлова О., Амеликина Н. Модифицирующее влияние некоторых органических растворителей и рН раствора на генетическую активность N-нитрозо-N-алкилмочевин. — В кн.: Эффективность генетических мутагенов в селекции. М., 1976, 61—66.
- Сальникова Т. Генетическая активность N-нитрозо-N-метилбиурета на мягкой пшенице при различных условиях обработки. — В кн.: Химический мутагенез и иммунитет. М., 1980, 114—121.
- Чураев Р. Гипотеза об эпигене. — В кн.: Исследования по генетике. Новосибирск, 1975, 77—92.
- Шангин-Березовский Г., Орав Т. Влияние альфаамилазы и солода на реализацию вызванных этиленином хлорофильных мутаций. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1975, 24, № 1, 42—50.

- Шангин-Березовский Г., Орав Т. Биологически активные соединения в генетических процессах. — В кн.: Современные проблемы теории химического мутагенеза. Таллин, 1987, 156—162.
- Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corsi, C., Corti, G. The use of organic solvents in mutagenicity testing. — *Mut. Res.*, 1980, **79**, 141—150.
- Herman, M., Bedovelles, H., Hofnung, M. Influence of solvents in the Salmonella microsome assay. — *Mut. Res.*, 1978, **53**, 199—206.
- International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Committee's 1st Final Report. Screening strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. — *Mut. Res.*, 1983, **114**, 117—177.
- Pueyo, C. Forward mutations to arabinose resistant Salmonella typhimurium strains. — *Mut. Res.*, 1978, **54**, 311—321.
- Singh, D., Mahajan, J., Krishwan, D. Effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on radiation-induced heteroallelic reversion in diploid yeast. — *Mut. Res.*, 1973, **37**, 193—200.
- Skopek, T., Thilly, W. Rate of induced forward mutations at 3 genetic loci in Salmonella typhimurium. — *Mut. Res.*, 1983, **108**, 45—56.
- Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., Onada, M. Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. — *Mut. Res.*, 1977, **40**, 121—130.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
14/IV 1987

Иыгеваская селекционная станция

Hans KUÜTS, Toivo ORAV, Kadri JÄRVE

EPIGENEETILISE MUUTLIKKUSE KASUTAMISVÕIMALUSTEST ODRA SORDIARETUSES

Klassikaliste aretusmeetoditega on praktiliselt võimatu saada varasest odrasordist 'Otra' veel varasemaid vorme. Pärast keemilist mõjutust tugevatoimeliste mutageenidega (nitrosoalküülkarbamiididega) õnnestus sellest sordist eraldada 150 veel varasemat liini, millest perspektiivsemaks osutus M-33. Enamiku tunnuste (ka saagikuse) poolest 'Otra-ga' võrdne M-33 ületab kolme näitaja osas lähtesordi: on keskmiselt kolme päeva võrra varasem (vastavalt 78 ja 81 päeva), sisaldab 0,6% rohkem proteiini (15,6 ja 15,0%) ja söklasus 0,6% võrra madalam (8,8 ja 9,4%). 1987. aastast peale on M-33 riiklikes sordivõrdluskatsetes.

Vorm-33 ei ole aga pärit tugevatoimelise mutageeniga töödeldud variandist, vaid nn. lahustikontrollist, milles efektiivseks toimeaineks oli dimetüülsulfoksüüdi (DMSO) 1%-line vesilahus. 'Otra' seemneid hoiti selles 16 tundi. DMSO on keemilises mutagenesis sageli kasutatav lahusti, mis spetsiaaltestides on end näidanud geneetiliselt inertsenä, modifitseerib aga keemiliste mutageenide toimet (enamasti nõrgendamise suunas), töötlemata kontrollis aga tõstab vähesel määral muutunud taimede arvu, sealhulgas töödeldud põlvkonnas endas. See viib mõtlele, et tegu on nn. ilmutiefektiga — peitelise geeni indutseeritud realiseerimisega, mida meie katsetes on täheldatud paljude geneetiliselt väheaktiivsete ainete juures, nagu hüdrasiinkloriid, põlevkivi kerogeenist saadud kasvustimulaatorid jt., sealhulgas sama odra endogeenne alfaamülaas.

Võib oletada, et ka M-33 juhul on tegu mitte mutatsioonilise, vaid epigeneetilise muutlikkusega, s. t. geeni aktiivsus muutub funktsionaalselt, ilma et muutuks geneetiline struktuur. Nähtavasti määrab sordil 'Otra' varavalmivust vähesest arvust retsessiivsetest geenidest koosnev süsteem, millele lisaks sordi potentsiaalis on varavalmivuse suunas töötav peiteline geen (geenid). DMSO-ga mõjutamine kutsus esile epigeneetilise muutuse — peitelise geeni aktiveerumise.

A priori, aga ka kirjeldatud katse tulemuste põhjal võib öelda, et epigeneetiliste muutuste kasutamisel on mutagenesi ees sordiaretuses oluline eelis — puuduvad mutatsioonidele sageli omased kaasnevad negatiivsed efektid. Kogu küsimus ise aga vajab uurimist, kuna esialgu on tegu vaid ühe õnneliku juhuse tõttu saadud vormiga.

ON THE POSSIBILITY OF USING THE EPIGENETIC VARIABILITY IN BARLEY SELECTION

After chemical mutagen treatment with N-nitroso-N-alkylureas 150 early mutants were isolated from the 'Otra' variety, including a perspective genotype M-33, 3 days earlier than 'Otra', with equal productivity, higher protein content (15.6 and 15.0 per cent, respectively).

The line M-33 was detected not after mutagen treatment, but in the "solvent control" variant, treated with 1% dimethylsulfoxide (DMSO) aqueous solution. DMSO is a most widely used solvent for chemical mutagens, genetically ineffective in most experiments. Nevertheless, DMSO modifies the action of several mutagens (as a rule it decreases their mutagenity). Without mutagen treatment DMSO leads to a small increase of frequency of changed plants, including the generation of the presoaking treatment. This fact suggests that we have here the "revealing effect" — an induced realization of a cryptic gene, in our experiments detected in many genetically ineffective substances like hydrazine hydrochloride, any synthetic growth substance and barley native growth substance — alfa-amylase.

It is proposed that it is a case of an epigenetic alteration, not the mutational variability, in the course of which the functional activity of the gene is altered without a structural change in its genetic structure. Apparently, early ripeness of the 'Otra' type is determined by a small number of recessive genes. Additionally, the genetic system of this variety includes at least one cryptic gene of early ripening. The treatment with DMSO has provoked an epigenetic alteration — an activation of the cryptic gene.

The results of our experiments give reason to assume that the use of epigenetic variability in plant selection must have an advantage in comparison with mutations — it does not have the negative correlating effects that are usual in mutations.