Тема 2.4. Використання мутагенезу і поліплоїдії в селекції

1. Штучний мутагенез. Мутагенні фактори.
2. Метод обробки насіння радіаційним опромінюванням. Використання мутантів у виробництві.
3. Поліплоїдія, її закономірності. Методи одержання поліплоїдів. Досягнення з експериментальної поліплоїдії.

1. Штучний мутагенез. Мутагенні фактори.

Упродовж всієї історії розвитку рослинництва мутації є основним матеріалом для природного добору та еволюції видів. Спонтанний мутаційний процес насичує популяції численними змінами, внаслідок чого такі популяції несуть у собі величезні резерви прихованої спадкової мінливості, що й підтримує пластичність виду, пристосованість до несприятливих умов середовища.

Вивчення спонтанної та індукованої мутаційної мінливості у рослин почалося наприкінці XIX — на початку XX ст. Після досліджень С.І. Коржинського (1899), Г. де Фріза (1901) та І.І. Герасимова (1901) було описано спонтанні мутації багатьох видів рослин, у тому числі гороху, тютюну, кукурудзи, ячменю, пшениці, вівса. Проте питання про експериментальне одержання мутацій і використання їх у селекції рослин привернуло увагу лише після відкриття високої мутагенної активності іонізувального випромінювання.

Наступним етапом мутаційної селекції було виявлення слабкої мутагенної дії хімічних неорганічних сполук, а потім сильнішої — органічних мутагенів.

Проблема мутаційної селекції рослин стала актуальною в 50-х роках XX ст.

З кожним роком зростає колекція мутантів багатьох видів рослин, створених методом експериментального мутагенезу. Так, якщо в 1954 р. було відомо лише чотири сорти, то на початку 60-х років їх стало втричі більше, а згодом — уже кілька сотень. Із 37 сільськогосподарських рослин, які розмножуються насінням, у світі районовано 1275 мутантних сортів, у тому числі з використанням мутантів — 525. У Державному реєстрі сортів рослин України нині налічується 57 мутантних сортів.

Мутагенні фактори бувають фізичними, хімічними і біогенними. Серед фізичних мутагенів найбільш вивченими гамма-випромінювання, ультрафіолетове, рентгенівське випромінювання, потоки швидких нейтронів, екстремальні температури тощо. За одиницю дози фізичного опромінювання прийнято 1 рентген. Потужність дози електромагнітного випромінювання (рентгенівські і гамма промені) вимірюються у рентгенах за 1 секунду. Хімічні мутагенні фактори поділяють на чотири групи: 1) високоактивні речовини, які можуть переносити алкільні групи та інші молекули. До них належать: етиленімін, диетилсульфат, диметилсульфат, нітрозоетил – і нітрозометилсечовина; 2)мінеральні солі, алкалоїди, різні кислоти (азотиста, колхіцин); 3) перекиси з активними вільними радикалами (OH, H); 4)

метаболітанологи, механізм дії яких полягає у заміщенні ними нормальних метаболітів у процесі обміну клітин (бромурацил, амінопурин, аміноптерин). Ефективність того чи іншого мутагенного фактору залежить від фізіологічного стану насіння, паростків, дорослих рослин у різних фазах розвитку тощо. Важливим є дози та експозиції обробки. Дія мутагенних факторів може бути стимулююча, канцерогенна і навіть летальна. У зв'язку з цим для кожного мутагену і виду рослин установлюють оптимальні дози мутагенів та експозиції обробки. Установлена також відмінність у дії фізичних і хімічних мутагенів. Фізичні агенти зумовлюють, головним чином, хромосомні перебудови, які супроводжуються значними змінами структури та функції організмів. Хімічні мутагени зумовлюють переважно генні мутації, що впливають на фізіологічні та кількісні ознаки. Але хімічні агенти у високих дозах також можуть викликати хромосомні аберації. Інтенсивність мутагенезу сильно зростає за спільної дії фізичних і хімічних мутагенів.

2. *Метод обробки насіння радіаційним опромінюванням. Використання мутантів у виробництві.*

Можливі два основні шляхи селекційного застосування штучних мутацій: пряме використання мутацій, одержаних в самих кращих районованих сортах, і в процесі гібридизації. В першому випадку постає завдання покращення існуючих сортів за деякими господарсько-цінними ознаками, покращення певних недоліків. Цей метод вважають перспективним в селекції на стійкість до хвороб. Метод прямого використання мутацій розрахований на швидке створення вихідного матеріалу з потрібними ознаками і властивостями. Але пряме і швидке використання мутацій при всіх високих вимогах, які пред'являють до сучасних селекційних сортів, не завжди дає позитивні результати. Одержаний з використанням мутагенезу вихідний матеріал повинен, як правило, пройти через гібридизацію. Це другий шлях використання штучних мутацій. Мутації можуть змінювати своє фенотипове проявлення залежно від того, в який генотип вони включені. Тому схрещування якісно змінює вплив окремих мутацій на розвиток багатьох ознак. Широко також застосовують також поєднання індукованого мутагенезу з гібридизацією, обробка мутагенами гібридного насіння Fo, F1 і старших поколінь, схрещування мутантних форм між собою і з кращими районованими сортами, бекросна гібридизація.

Експериментальний мутагенез використовують в поєднанні з віддаленою гібридизацію. Підбір вихідного сорту для одержання мутацій важливий як і підбір батьківських пар при гібридизації. Для створення потрібних мутацій необхідно враховувати здатність сортів до утворення тих чи інших мутацій, а також частоту їх виникнення. Для одержання господарсько-цінних мутацій найбільше використовують гамма-промені, рентгенівське проміння і нейрони, а з хімічних мутагенів – алкіруючі сполуки: етиленімін, нітрозоетилсечовина, етилметансудьфонат та ін. Концентрації хімічних мутагенів і дози іонізуючих випромінювань не повинні бути високими. Для характеристики реакцій організмів до одного із поширених фізичних мутагенних факторів – іонізуючого випромінювання, використовують ряд показників.

Радіочутливість – чутливість біологічних об’єктів до дії іонізуючих факторів. Мірою радіочутливості є доза опромінення, що викликає загибель 50% клітин або організмів (ЛД50). Одиницею виміру цього показника рад, який відповідає поглиненій енергії будь-якого іонізуючого випромінювання, що дорівнює 100 егр/г. Одиницею поглиненої дози Грей (Гр): 1 Гр=1Дж/кг = 100 рад. Радіостійкість – здатність організму витримувати високі рівні опромінення, які вважаються напівлетальними (ЛД50) чи летальними (ЛД100) дозами. Критичною наз. таку дозі, за якої спостерігається сильне пригнічення організмів, але більша частина гх (>50%) виживає і дає значну мутантів. Цей показник є верхньою межею радіостійкості. Летальною наз. дозу, що призводить до загибелі організмів. Стимулюючі і критичні дози випромінювання для різних видів рослин не однакові. Стимулюючі дози укладаються в діапазон 3-10 Гр, а критичні коливаються від 75 до 2500 Гр

Хімічні мутагени володіють деякою специфічністю у своїй дії. Наприклад: при застосуванні етиленіміну (Еі) в обробці насіння пшениці в концентрації 0,01-0,04% основну масу мутацій становили крупноколосі форми, стійкі проти хвороб і з невеликих восковим нальотом. Підвищення концентрації до 0,06-0,12% не підвищувало загальної кількості мутацій, натомість з'являлися більш рідкісні мутації – спельтоїди, скверхеди та інші морфологічні зміни, часто пов'язані з хромосомними аберраціями. Хімічні мутагени використовують у вигляді водних розчинів 0,05-0,2% концентрації при тривалому замочуванні насіння від 12 до 24 год. Унаслідок цього забезпечується краще виживання рослин і збереження серед них мутацій з господарсько корисними ознаками. Не варто допускати великий період між обробкою насіння і його посівом, бо може знизитися схожість. Щоб знизити пошкоджуючу дію мутагенами, оброблене насіння рекомендують промивати в проточній воді. Різні покоління рослин, одержаних із насіння обробленого мутагенами, позначають буквою М – М1 – перше покоління, М2 – друге покоління і т.д. Для одержання господарсько корисних мутацій рекомендують обробляти мутагенами 2-4 тис. насіння. Добір зазвичай проводять у М2. М1 висівають, вирощують за оптимальних умов живлення і зволоження. Рослини М1 обмолочують окремо або разом. За окремого обмолоту в М2 висівають індивідуальні потомки (сім'ї) окремими рослинами, що полегшує 5 виділити мутації з господарсько цінними ознаками. У М2 відбирають мутанти з добре вираженими цінними ознаками. В подальшому мутації підлягають добору або використовують в схрещуваннях між собою чи з сортами.

На даний час створено більше 35 тис. мутантів, які представляють 130 видів рослин. У результаті багаторічної праці у галузі експериментального мутагенезу у пшениці, ячменю, рису, кукурудзи, проса, гороху, гречки та ін культур отримані мутанти: ранньостиглі, короткостеблові з високим вмістом білка, стійкі до хвороб, з поліпшеним складом жирних кислот тощо.

3. Поліплоїдія, її закономірності. Методи одержання поліплоїдів. Досягнення з експериментальної поліплоїдії.

Поліплоїдія значно розширила можливості добору і гібридизації. Одержані поліплоїдні форми не є готовими сортами, вони є лише вихідним матеріалом для селекції.

Еволюція вищих рослин тісно пов'язана зі збільшенням числа хромосом, яке супроводжує поліплоїдію. Це явище набуло поширення серед різних видів рослин. Майже половина важливих культурних рослин є поліплоїдами.

Більшість із них являють собою еуплоїди (тетраплоїди, гексаплоїди), які мають кратне збільшення основного набору хромосом. Наприклад, рід Triticum складається із видів з набором хромосом 2n, 4n, 6n і т.д. (n – основне, базове число, характерне для гаплоїдів). Такий ряд чисел отримав назву поліплоїдний ряд. Основне число хромосом організму може бути збільшене кратно – ортоплоїдія, наприклад, у два рази – диплоїд, в чотири – тетраплоїд, в шість – гексаплоїд. Непарне збільшення кратності (анортоплоїдія) – в три рази утворює триплоїд, в п'ять – пентаплоїд.

Японські вчені-генетики Кіхарі і Оно (1926) вперше вказали, що в природі існує два типи поліплоїдів:

1) автоплоїди, в яких подвоєний один і той же набір хромосом (одного виду АА подвоєні АА+АА – АААА);

2) аллоплоїди, в яких складаються різні набори хромосом шляхом міжвидових схрещувань. Іноді таке поєднання наз. амфідіплоїдією (поєднання геномів різних видів А+В=АВ, а потім їх подвоєння – ААВВ.

В обох групах – автоплоїдів і аллоплоїдів – часто зустрічається так звана анеуплоїдія – це зменшення або збільшення числа хромосом виду. Такі організми дістали назву – анеуплоїди. Організми, в яких диплоїдний набір доповнюється ще однією хромосомою (2n +1) наз. трисомиками; в яких не вистачає хромосоми (2n -1) – ортимали назву моносомики і не вистачає двох хромосом – (2n-2) – нулесомиками.

Автоплоїди.

Методи отримання поліплоїдних форм. В селекції найбільше застосовують колхіцин:

– обробка насіння (насіння замочують в розчині колхіцину 0,1-0,2% впродовж 3-10 днів;

– обробка проростків (повне занурення проростків у водний розчин колхіцину або розміщення проростків на фільтрувальний папір, змочений колхіцином);

– обробка молодих сіянців 1) лезом зрізають верхівку рослини, залишаючи шматочок стебла довжиною 2-3 см. В піпетку набирають розчин колхіцину і закріпляють піпетку з надламаним кінчиком на зрізане стебло за допомогою утримувача. Обробка триває 3 год.

2) крапельний метод – краплю колхіцину наносять на верхівку – точку росту молодих сіянців вранці і ввечері або через кожні 3-4 год впродовж 3-4 діб.

3) ватні тампони – 7 накладають на верхівку.

4) метод ін’єкції шприцом в центральну частину стебельця на рівні кореневої шийки).

– обробка коренів – рослини відкопують, промивають і занурюють в розчин колхіцину на 12 год і в проточну воду на 12 год почергово, при цьому корені менше пошкоджуються;

– обробка бруньок, стебел і пагонів за допомогою ін’єкції шприцом, тампонів.

Аллоплоїдія

Аллоплоїди або амфідіплоїди виникають унаслідок схрещування різних видів, коли об'єднуються різні геноми. Міжвидові і міжродові схрещування – це генетично віддалена гібридизація. Завдяки її можна створити лінії з заміщеними хромосомами. Це можна показати на прикладі отримання житньо-пшеничних гібридів та введення хромосом жита в геном пшениці. Схрещування жита (2n=14) з м'якою пшеницею (2n=42) вдалося отримати міжвидовий гібрид з 2n=28. Подвоєння кількості його хромосом за допомогою колхіцину призвело до створення форми, яка отримала назву Trutucale (2n=56).

Поліплоїдія являє собою важливе джерело спадкової мінливості, яке збільшує можливості добору і дивергенції видів. В еволюції самозапильних рослин більше значення мала автоплоїдія, а в перехреснозапильних рослин – аллоплоїдія.

Шляхом поліплоїдізації створено багато сортів і гібридів ряду культурних рослин. Серед них тетраплоїдні сорти жита Белта, Українське тетра, Поліське тетра, Утро і Вересень; тетраплоїдний сорт цукрового буряку – Білоцерківський полігібрид 41; тетраплоїдна конюшина – сорт Кумач.

Крім тритикале практичну цінність мають і інші аллоплоїди. Зокрема, сорти перцевої м'яти – Прилуцька краснодарська 2, Медичка та ін, вміст ментолу в яких на 20-25% більше, ніж у звичайних сортів. У Швеції Г. Ослон створив синтетичну форму ріпаку (2n=38) схрещуванням листкової капусти (2n=18) з польовою капустою (свиріпою 2n=30), подвоюючи у гібрида кількість хромосом. Ця форма ріпаку давала на 7% більше олії з одиниці площі, ніж кращі сорти природного ріпаку.

Значна частина поширених у природі поліплоїдних рослин, що розмножуються за природних умов насінням, є аллоплоїдами. До них належать більшість видів пшениці, вівса, тетраплоїдної вики, бавовнику, тютюну, ріпаку, суниці та ін.

Гаплоїди

Гаплоїдом або моноплоїдом наз. організм, що утримує у соматичних клітинах гаплоїдний набір не гомологічних хромосом. Гаплоїдія може бути природною і штучною.

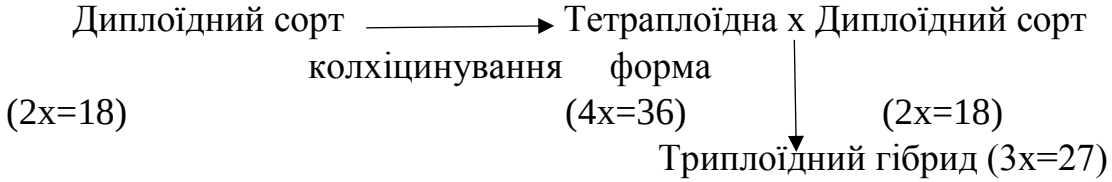
Гаплоїдія широко використовується у селекційно-генетичних дослідженнях вищих рослин. Це пояснюється тим, що у гаплоїдів легко виявити шкідливі і корисні рецесивні гени, а гаплоїдну форму рослини, позбавлену мутацій, можна перевести у диплоїдну. Саме перетворенням перспективних гаплоїдів у диплоїди отримано нові форми ячменю, томату, тютюну, бавовнику, рису та ін. культур.

Перетворення гаплоїдів у диплоїди можна досягти самозапиленням рослин, а також диплоїдізацією за допомогою колхіцину та інших мітотичних речовин.

У більшості випадків гаплоїдні рослини характеризуються меншою висотою стебла, слабким розвитком, пізньостиглістю. Через це гаплоїди зберігаються тільки у видів, які розмножуюиться вегетативно, у решти видів – не виживають.

Триплоїди

У деяких культур поліплоїдія використовується для створення триплоїдних гібридів. У таких гібридів одночасно поєднується ефект поліплоїдії і гетерозису. Найбільш цінні результати з використанням цього методу одержані при роботі з цукровим буряком. Він базується на одержанні тетраплоїдних форм цієї культури і схрещування їх із звичайними диплоїдами за схемою:



Для одержання тетраплоїдних форм насіння цукрового буряку перед посівом замочують у 0,2% розчині колхіцину або діють цим розчином на точку росту рослин у фазі сім'ядольних листочків. Із бруньки молодих рослин розвиваються тканини, в багатьох клітинах яких є подвоєна кількість хромосом (4х=36). Тетраплоїдні рослини, що виросли з такого насіння, природньо перезапилюються з диплоїдними сортами, утворюючи у великій кількості триплоїдні гібриди (3х=27). Приблизно 4/5 насіння триплоїдне і 1/5 – тетраплоїдні.

Окрім високої врожайності і цукристості, триплоїдні гібриди цукрового буряку відрізняються підвищеною стійкістю до церкоспорозу.

В Україні у виробництві використовують триплоїдні сорти буряків Авангарду, Аміго, Барбара, Кірас, Казіма, Крокус, Львівський жовтий, Магнум, Тамара, Трипільський, Троя. Вони перевищують раніше районовані

сорти диплоїдних кормових буряків за урожаєм коренеплодів на 15-40% і за виходом сухих речовин на 25-40%.

Японський генетик і селекціонер Г. Кіхара шляхом схрещування тетраплоїдної і диплоїдної форми кавуна одержав триплоїдний безнасіннєвий кавун, який має прекрасні смакові якості.