

#### **Лекція 4. Використання методу експериментального мутагенезу в селекції. Поліплоїдія. Біотехнологічні методи.**

1. Мутаційна мінливість.
2. Класифікація мутацій.
3. Експериментальний мутагенез.
4. Ефективність мутаційної селекції.
5. Поліплоїдія і селекція.
6. Методи біотехнології в селекції рослин.

1. Мутації – це структурні зміни генетичного потенціалу, що призводять до порушень біохімічного гомеостазу і в кінцевому результаті – до появи нових властивостей у клітині чи організмі. Мутації – це зміни в генах і хромосомах, унаслідок яких організм набуває нових якостей.

Термін "мутація" вперше був запропонований Г. де Фрізом в його класичній праці "Мутаційна теорія". Організми, які виникають унаслідок мутацій, наз. мутантами. Гени, що властиві вихідним формам організмів, вважають дикими типами, а ті, що виникли при мутаціях – мутантними. Агенти, які викликають мутації – це мутагенні фактори, або мутагени.

Процес виникнення мутацій спонтанно або індуковано наз. мутагенезом.

Мутанти мають велику селекційну цінність, так як у них виникають нові, раніше не відомі корисні ознаки. Мутації, які виникли без втручання людини, наз. природними. До початку свідомого застосування методу гібридизації він слугував основним джерелом покращення різних с.-г. культур. Цей тип мутацій не втратив селекційного значення і в наш час. Як відмічає академік Н.П. Дунін, в законах природного мутування криються глибокі основи для розробки шляхів цілеспрямованого покращення рослин.

Прямі природні мутації відіграли велику роль у створенні цінних сучасних сортів і гібридів рослин. Так, унаслідок природного мутагенезу виникли гени карликовості японського сорту озимої пшениці Норін 10, які передані десяткам короткостеблових сортів інтенсивного типу. Виявлення карликового природного мутанту рису Dee–Woo–Gen зарубіжні спеціалісти вважають поворотним пунктом в історії селекції цієї культури. За його участю вже одержано десятки сортів рису інтенсивного типу, які володіють стійкістю до вилягання і високою продуктивністю. Мутації кукурудзи Опейк – 2 і Флаурі – 2, забезпечують покращення якості білка в зерні за рахунок збільшення долі незамінних амінокислот – лізину і метіоніну, також природні. Нині включені в популяції кукурудзи всього світу.

Але унаслідок низької частоти природного мутування і складнощів виявлення змінених форм цей метод не може бути основою сучасної селекції. Вченим вдалося знайти шляхи підвищення частоти мутаційних змін в сотні разів, що в свою чергу, збільшило можливості виявлення і добору мутантів з господарсько - цінними властивостями. Нині метод штучного одержання життєздатних корисних мутацій набуває важливого значення в селекції рослин.

Відомо багато методів створення практично цінних індукованих мутацій. В їх основу покладено вплив на організми різними фізичними і хімічними чинниками.

Мутаційна мінливість – це процес, який закономірно протікає в природі. Він підлягає певним законам. М.І. Вавилов, вивчаючи різноманіття форм культурних рослин, встановив подібність в успадкованій мінливості у близьких видів і родів. На основі аналізу об'ємних даних він сформулював у 1920 р закон гомологічних рядів спадкової мінливості. Згідно з цим законом генеотипно близькі види і роди характеризуються подібними рядами спадкової мінливості з такою правильністю, що знаючи ряд форм у межах одного виду, можна передбачити появу паралельних форм в інших видів і родів. Що ближче вони генетично у загальній системі, то повнішою є схожість у рядах їх мінливості.

Закон М.І. Вавилова стоїть у ряду найвидатніших наукових досягнень, які свідчать про єдність живої природи і про універсальність багатьох біологічних структур і функцій.

2. В основі класифікацій, що використовуються у селекційно-генетичній роботі лежать різні принципи. М.М. Макрушин із співавторами, залежно від причин, що викликають мутації, розподілили їх на спонтанні та індуковані, з подальшим розподілом на інші типи.

М.В. Тоцький (2002) розподілив мутації на такі типи.

1. Залежно від способу виникнення:

а) *спонтанні*, що постійно виникають у природі без очевидних причин з певною частотою;

б) *індуковані* мутації, що виникають у відповідь на дію різноманітних факторів середовища.

2. За виявом у гетерозиготи:

а) *домінантні* мутації (виявляються в М1);

б) *рецесивні* мутації (виявляються в М2).

3. За відношенням до норм або так званого дикого типу:

а) *прямі мутації*, за яких гени дикого типу перетворюються в алельні форми;

б) *супресорні і зворотні* мутації, за яких відновлюється дикий фенотип. Повернення мутанта до дикого фенотипу (тобто реверсія) найчастіше є результатом супресії, тобто іншої мутації. Зворотні мутації, за яких ушкоджений ген повністю відновлює свою будову і перетворюється у вихідний ген дикого типу, бувають рідко.

4. За локалізацією в еукаріотній клітині:

а) *ядерні*, якщо мутації відбуваються в ДНК ядра;

б) *цитоплазматичні*, якщо мутації відбуваються в ДНК цитоплазми.

5. В залежності від типу клітин, в яких виникають мутації:

а) *генеративні*, виникають у статевих клітинах;

б) *соматичні*, виникають у соматичних клітинах і розповсюджуються за їх мітотичного поділу.

6. За фенотиповим виявом:

а) *морфологічні* мутації, що проявляються за тими чи іншими змінами будови клітин та організмів;

б) *фізіологічні*, супроводжуються порушенням фізіологічних функцій, що відображаються на особливостях росту та розвитку мутантів;

в) *біохімічні* мутації для яких встановлена суть основних порушень обміну речовин, у першу чергу на рівні білкових молекул.

7. За впливом на адаптивну здатність клітин та організмів:

а) *корисні* мутації, за фенотиповим проявом імітують адаптивні модифікації і тому сприяють збереженню виду за даних умов;

б) *нейтральні* мутації, не впливають на життєздатність клітин та організмів (наприклад, поява антоціану на різних органах);

в) *сублетальні* мутації, знижують життєздатність генотипів на 10-50%;

г) *напівлетальні* мутації, знижують життєвість генотипів на 50-90%;

д) *летальні*, призводять до загибелі 100% генотипів, що мають таку мутацію;

е) *умовно-летальні* мутації, проявляються тільки за певних умов.

8. Залежно від змін генотипу:

а) *генні або точкові* мутації, зміни структури ДНК у межах гена;

б) *хромосомні* мутації або хромосомні перебудови, порушення структури хромосом;

в) *геномні* мутації, випадкові зміни кількості окремих хромосом або хромосомних наборів.

3. Експериментальний мутагенез – нове важливе джерело створення вихідного матеріалу в селекції рослин. Але значення експериментального мутагенезу в селекції рослин було прийняте не відразу.

А.А. Сапегін і Л.Н. Делоне – перші дослідники, які довели значення штучних мутацій (іонізуюче випромінювання) для селекції рослин. Своїми дослідженнями (1928-1932 рр. в Одесі

і Харкові) вони одержали цілу серію господарсько-корисних мутаційних форм у пшениці. Лише в кінці 50-х років до експериментального мутагенезу проявили підвищений інтерес. Він був пов'язаний, по-перше, з великими досягненнями ядерної фізики і хімії, які дозволили використовувати для створення мутацій різні джерела іонізуючих випромінювань і високоактивних хімічних речовин і, по-друге, з одержанням за допомогою цих методів на різних культурах практично цінних спадкових змін.

Останнім часом значно мірою розгорнулися роботи по експериментальному мутагенезу в селекції рослин в багатьох країнах світу, в т.ч і в Україні.

Мутагенні фактори бувають фізичними, хімічними і біогенними.

Серед фізичних мутагенів найбільш вивченими є 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 (ОН, Н); 4) метаболітанологи, механізм дії яких полягає у заміщенні ними нормальних метаболітів у процесі обміну клітин (бромуратил, амінопурін, 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.

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. Останнє проводиться за наступною схемою:

Мутант будь-якої форми	x	Даний вихідний поліпшуваний сорт
з потрібною ознакою		I
		F1 x Даний поліпшуваний сорт
		I
		F2 x Даний поліпшуваний сорт

Експериментальний мутагенез використовують в поєднанні з віддаленою гібридизацією. 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 нейтрони, а з хімічних мутагенів – алкіруючі сполуки: етиленімін, нітрозоетилсечовина, етилметансульфонат 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 (ЛД<sub>50</sub>). 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 (ЛД<sub>50</sub>) чи летальними (ЛД<sub>100</sub>) дозами.

**Критичною** наз. таку дозу, за якої спостерігається сильне пригнічення організмів, але більша частина г<sub>x</sub> (>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.

Наприклад:

Культура	Доза Гр	
	стимулююча	критична
Пшениця	5-8	150-250
Кукурудза	5-10	100-200
Горох	3	75-200
Томати	5-10	200
Льон	8-10	400-1000
Редька	10	1000-2500
Огірок	3	500

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 аберациями.

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

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.

**Біологічні мутанти.** Мутаційна дія *екзогенної ДНК* вперше була відкрита на дрозофілі. Дослідження мутагенної екзогенної ДНК на рослинах були використані значно пізніше. Екзогенна ДНК може зумовлювати морфологічні і фізіологічні зміни, відновлення ознаки дикого типу, детермінацію остистості, зміни у висоті рослин, довжині і ширині верхнього листка, довжині верхнього міжвузля у пшениці. За ознаками остистості, довжини колосу, кількості міжвузлів змінені рослини теж відрізнялися від вихідних форм.

У монографії В.В. Моргуна (1995) наводяться сотні прикладів того, як екзогенна ДНК сприяє генетичним змінам різних видів рослин. Зокрема виявлена передача генетичної інформації за ознакою пурпурового забарвлення колоскових лусок у рису після введення чужерідної ДНК через пилкову трубку на приймочку маточки. Результати досліджень свідчать, що чужерідна ДНК може бути інтегрована у геном реципієнта і вступати з ним у рекомбінацію, або зумовлювати перебудови в генотипі реципієнта на ранніх стадіях розвитку зародка після запліднення.

Досліджується *мутагенна активність вірусів*. Уже доказано, що мутагенну дію вірусів можна полрівняти з дією широко використовуваних хімічних і фізичних мутагенів. На рослинах досліджено окремі представники вірусів, зокрема ВШМЯ (вірус штрихуватої мозаїки ячменю). На сорті пшениці Старт під впливом дії ВШМЯ отримано більше 70% змін нащадків з рослин, які характеризувались сповільненим темпом росту у початковій фазі розвитку – це короткостеблові форми. ВШМЯ підвищував у нащадків вміст білку, склад амінокислот, вміст та якість клейковини. На основі одержаних результатів автори дійшли висновку, що названий біологічний агент – нове джерело спрямованої мутаційної мінливості у рослин.

Отже віруси, які індукують високу частоту і широкий спектр мутацій, можуть мати значну користь для селекції різних видів рослин, як новий мутагенний фактор. Мутагенний ефект вірусів залежить від генотипу сорту.

У своїй монографії Моргун і Логвіненко (1995) наводять багато прикладів про мутагенну активність екстрактів, виділених із рослин. Екстракти рослин в активному фізіологічному стані здатні індукувати спадкові зміни у рослин. Наводяться факти, що екстракти із полину здатні викликати появу різних морфометричних змін колосу, ранньостиглих форм у м'якій пшениці.

**4.Інтенсивна селекція** більшості культурних рослин призвела у певній мірі до ерозії генофонду вихідних форм. Останнім часом у практичній селекції використовуються, в основному, один і той же генофонд, що призводить до уразливості новостворених сортів: вони недостатньо зимо- і посухостійкі, слабо захищені генетичними механізмами стійкості до хвороб та шкідників, тощо. Відчувається дефіцит нових генів, які б у системних схрещуваннях забезпечували широкий формотворчий процес. У вирішенні проблеми ерозії генофонду значну роль могли б відіграти експериментальні мутації. Прикладом такого рішення може бути «мутаційна селекція пшениці», яка успішно розвивається В.В. Моргуном зі співробітниками (1995).

За даними авторів, за допомогою індукованих мутацій створено 1611 сортів (1995). Це число включає 1152 мутантних сортів, створених методом прямого добору і 459 сортів, отриманих шляхом використання мутантів у схрещуваннях. Найбільша кількість мутантних сортів районована у світі по зернових: рису – 282, ячменю – 234, пшениці – 164, кукурудзи – 424 по зернобобових – гороху – 28, квасолі – 19; по технічних культурах – сої – 44, арахісу – 33 тощо.

З часу публікації даних по мутантних сортах пройшло 20 років і за цей час індуковано і районовано ще чимало сортів.

Величезні успіхи мутаційної селекції у Китаї. Тут отримані сорти, які поєднують у своєму фенотипі ранньостиглість, високу урожайність, стійкість до хвороб, вилягання В Індії створені сорти NP 836 (X-промені 160 Гр) – висока урожайність, стійкість до вилягання і бурої іржі; Шарбаті і Сонора (ультрафіолетові промені) – коротке стебло, ранньостиглість, високий вміст білка і лізину у янтарному зерні; Пуза Лерма (гама-промені) – янтарні зерна, високий вміст якісної клейковини.

У США під дією теплових нейтронів отримані різні сорти, серед них Стадлер Люїс – ранньостиглість, стійкість до вилягання, зимостійкість, високі урожайність та якість зерна.

Рекомендую монографію В.В. Моргуна і В.Ф.Логвиненка "Мутационная селекция пшеницы". Киев: Наукова думка, 1995.–624 с.

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.

**5. 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 AA подвоєні AA+AA – AAAA);

2) аллоплоїди, в яких складаються різні набори хромосом шляхом міжвидових схрещувань. Іноді таке поєднання наз. амфідіплоїдією (поєднання геномів різних видів A+B=AB, а потім їх подвоєння – AABV).

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 хромосоною (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 сянців ( 1) лезом зрізають верхівку рослини, залишаючи шматочок стебла довжиною 2-3 см. В піпетку набирають розчин колхіцину і закріплюють піпетку з надломаним кінчиком на зрізане стебло за допомогою утримувача. Обробка триває 3 год. 2) крапельний метод – краплю колхіцину наносять на верхівку – точку росту молодих сянців вранці і ввечері або через кожні 3-4 год впродовж 3-4 діб. 3) ватні тампони –

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 по чергово, 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 їй можна створити лінії з заміщеними хромосомами. Це можна показати на прикладі отримання житньо-пшеничних гібридів та введення хромосом жита в генوم 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 *Trutucalc* ( $2n=56$ ).

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

Шляхом поліплоїдизації 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 краснадарська 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 листової 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.

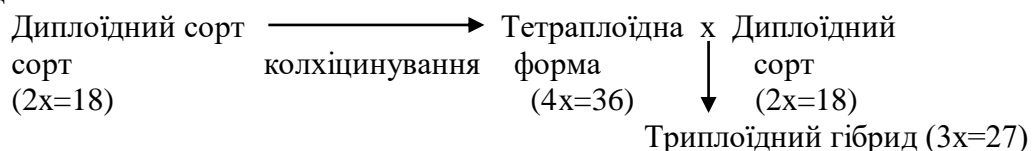
Гаплоїдія широко використовується у селекційно-генетичних дослідженнях вищих рослин. Це пояснюється тим, що у гаплоїдів легко виявити шкідливі і корисні рецесивні гени, а гаплоїдну форму рослини, позбавлену мутацій, можна перевести у диплоїдну. Саме перетворенням перспективних гаплоїдів у диплоїди отримано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

Перетворення гаплоїдів у диплоїди можна досягти самозапиленням рослин, а також диплоїдизацією 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 розмножуються 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 ( $4x=36$ ). Тетраплоїдні рослини, що вирости з такого насіння, природньо перезапилуються з диплоїдними сортами, утворюючи у великій кількості триплоїдні гібриди ( $3x=27$ ). Приблизно  $4/5$  насіння триплоїдне і  $1/5$  – тетраплоїдне.

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

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 безнасінневий кавун, який має прекрасні смакові якості.

**6. Внесок біотехнології у сільськогосподарське виробництво** полягає в полегшенні традиційних методів селекції рослин, розробці нових технологій, що дають змогу підвищити ефективність сільського господарства.

У сучасній біотехнології рослин виділяють три напрями:

- клітинні технології (ґрунтуються на використанні культури клітин, тканин та органів);
- молекулярні технології або ДНК-технології (молекулярні методи аналізу, створення генних конструкцій та аналіз їхніх регуляторних ефектів на експресію генів);
- одержання трансгенних рослин, трансгеноз.

**Клітинна біотехнологія** рослин ґрунтується на вирощуванні клітин, тканин або органів *in vitro* на штучних живильних середовищах (рис.1).

Окремі клітини рослин або групи клітин висівають за допомогою мікробіологічної техніки на поживне середовище, яке володіє дедиференціюючими властивостями. У результаті отримують клони дедиференційованих меристематичних клітин – **калус**. Його висівають на диференціююче середовище. У сукупності (колонії) клітин калусу виникають конкурентні взаємовідношення, зумовлені гормональною взаємодією клітин і дією гормонів, які знаходяться в поживному середовищі. Починається диференціація клітин калусу, у ньому утворюються спеціалізовані клітини вегетативних органів і меристеми, у тому числі носії зародкової плазми. Процес диференціації всередині калусу подібний такому, який відбувається у зародку (ембріоні). У результаті цього може виникати повністю сформована і життєздатна рослина – **регенерант**. (рис.2).

Клітинні технології дозволяють за порівняно короткі строки створити і розмножити цінний вихідний високопродуктивний матеріал, гетерозисні гібриди та сорти с.-г. культур. Розробка основ методу культури тканин рослинних організмів має порівняно коротку історію й починається з досліджень, виконаних Габерландтом у 1902 р.

**Використання молекулярно-генетичних маркерів** відкрило широкі перспективи в селекції рослин. В якості генетичних маркерів використовують запасні білки, ферменти, ДНК.

Генетика і селекція рослин використовує різні біохімічні методи, у тому числі 2 типи білкових маркерів – серологічні та електрофоретичні. Перші найбільш зручні для розпізнання та ідентифікації видів, геномного аналізу аллоплоїдних форм, другі – для визначення внутрішньовидової диференціації, ідентифікації сортів та аналізу популяцій.

З появою методів білкових маркерів відкрилися принципово нові можливості для сортової ідентифікації та оцінки сортової чистоти насіння.

Широкі можливості для сортової ідентифікації і характеристики насіння відкрилися з розробкою методу електрофоретичного аналізу із виявленням специфічності спектру компонентів поліморфних білків.



Найбільш надійним і зручним лабораторним методом сортового контролю є ідентифікація сортів пшениці за електрофоретичним спектром гліадину. Гліадин пшениці являє собою досить гетерогенний поліморфний запасний білок з великою вирішальною здатністю у генетичному аналізі популяцій. Він локалізований в ендоспермі (в морфогенетично однорідній тканині) складає майже половину всього білку, його легко виділити та аналізувати. Електрофоретичні спектри гліадину генотипові, вони не залежать від року репродукції і умов вирощування рослин і чітко відображують генетичні відмінності між сортами, біотипами і лініями. На великій кількості сортів був проведений електрофоретичний аналіз окремих зерен із різних частин колоса однієї і тій же рослини. Доведено, що всі зерна рослини дають однаковий спектр гліадину, і що при необхідності сортова формула може бути отримана при аналізі одного чи декількох зерен. Але у пшениці, як і в інших самозапильних культур, бувають випадки перехресного запилення, за рахунок цього, особливо на малих ділянках колекційного розсадника, або розсадників первинних ланок насінництва можна виявити зерна, які за формулою гліадину належать іншому сорту.

У більшості сортів пшениці рослини за спектром гліадину однорідні, але деякі сорти виявляються неоднорідними і вони дають декілька типів спектру гліадину, кожний з них свідчить про наявність відповідних біотипів. Так, у сорту Кавказ при аналізі 100 рослин виявлено 7 біотипів, у Краснодарської 39 – 3, Одеської 51 – 6 типів спектру гліадину, Одеська 3 – 5, Одеська 16– 2.. Сорт Миронівська 808 – гетерогенний сорт, фенотипова формула вміщує три блоки, які пов'язані з високою морозостійкістю, а також блоки, які зумовлюють високі хлібопекарські якості і "силу борошна". Один із вірогідних батьків сорт озимої пшениці Білоцерківська 198, тому що п'ять із шести блоків цих сортів співпадають.

Сьогодні найефективнішим вважається аналіз за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР-аналіз), який дозволяє досліджувати молекулярно-генетичний поліморфізм із найменшими витратами часу й матеріалів. Широке розмаїття різновидів ПЛР-аналізу, висока технологічність, забезпечення комп'ютерними програмами сприяють вирішенню багатьох проблем у генетико-селекційних дослідженнях. Залежно від мети добирається домінуючий або кодомінуючий, моно- або полілокусний тип маркера, який забезпечує потреби дослідження.

У цій галузі українські вчені змогли зберегти позиції, що відповідають сучасному рівню досліджень.. Так, у Південно біологічному центрі в рослинництві розроблено повну технологію використання ПЛР у генетиці, селекції та насінництві пшениці, ячменю, кукурудзи, сої, соняшника та винограду.

**Створення ген-модифікованих рослин.** Всі маніпуляції, які пов'язані з гібридизацією рослин, тобто рекомбінацією генетичного матеріалу і заміщенням хромосом одного виду хромосомами іншого виду (віддалена гібридизація), використання культури клітин і тканин – все це входить у поняття "генетична інженерія". Якщо ж маніпуляції здійснюються на рівні окремих генів або інших фрагментів ДНК, то мають на увазі "генну інженерію".

Новизна і цінність методів генної інженерії полягає в тому, що вони дають можливість вводити в організм окремі гени точними і порівняно простими методами. При звичайній селекції види для перенесення генів повинні бути здатними до утворення природних гібридів, для генної інженерії це не потрібно.

Гени, які штучно введені у геном багатоклітинних організмів і передаються від батьків потомкам, отримали назву **трансгенів**, а сам процес такого переносу позначили терміном **трансгенозом**. Рослини, які є носіями трансгенів у геномі своїх клітин, отримали назви **трансгенні** або генетично модифіковані організми (ГМО).

Розробка методів трансгенозу у с.-г. рослин обґрунтовується необхідністю конструкції нових генотипів, які забезпечують більш високу продуктивність і стійкість до несприятливих впливів середовища. Створення ген-модифікованих рослин частіше за все виконуються для вирішення наступних задач:

- з метою підвищення врожаю;
- з метою підвищення стійкості до абіотичних і біотичних факторів;
- з метою поліпшення характеристик якості продукції.

По суті, задачі трансгенної селекції такі ж як і задачі традиційної, але вони вирішуються більш оперативно і більш спрямовано.

Важливим напрямом створення ГМР(рослин) з ознакою чоловічої стерильності. Крім того, завдяки генетичній модифікації, рослини можуть виконувати не властиву їм раніше роль. Це наприклад, коренеплоди цукрових буряків, що накопичують замість сахарози низькомолекулярні фруктози, або банани, які використовують як їстівну вакцину. Завдяки введенню генів бактерій, вищі рослини набувають властивості брати участь у руйнуванні чужорідних сполук (ксенобіотиків), які забруднюють навколишнє середовище. Вирощування ГМР, стійких до широкого спектру хвороб та фітофагів, може суттєво понизити, а в подальшому звести до мінімум пестицидне навантаження на навколишнє середовище. Зростання площ під трансгенними культурами в розвинених країнах відбувається набагато інтенсивніше, ніж у країнах, які розвиваються.

Нині українські селекціонери випробовують трансгенні сорти кукурудзи, цукрових буряків і ріпаку, стійкі до гербіцидів; кукурудзи, стійкої до кукурудзяного метелика; картоплі, стійкої до колорадського жука. Створено систему органів із залученням генетиків, селекціонерів, генних інженерів, екологів, медиків, токсикологів, які оцінюють трансгенні сорти для визначення потенційного впливу на людину, тварин і навколишнє середовище. І тільки після таких експертиз сорти буде допущено до випробування з дотриманням усіх вимог до трансгенних сортів, узаконених у Європейському Союзі.

Під час розгляду проблеми можливого впливу трансгенних рослин на навколишнє середовище спеціалісти в основному обговорюють такі важливі аспекти:

- сконструйовані гени буде передано з пишком близькородинним диким видам, і їхнє гібридне потомство набуде властивості підвищеної насінневої продуктивності або здатності конкурувати з іншими рослинами;
- трансгенні сільськогосподарські рослини стануть бур'янами для сільськогосподарських культур і витіснять рослини, що ростуть поряд;
- трансгенні рослини стануть прямою загрозою людині, домашнім та диким тваринам (наприклад, через свою токсичність або алергенність).

Ще одним аспектом впливу трансгенних рослин на навколишнє середовище є отримання трансгенних рослин із кращою здатністю використовувати мінеральні сполуки, що крім посилення росту, буде перешкоджати їхньому змиванню в ґрунтові води та попаданню в джерела водопостачання.

Гарантію проти небажаних наслідків генетичної модифікації рослин є законодавче регулювання поширення ГМР та розробка пов'язаних із цим методів оцінки екологічного ризику. Багато уваги приділяється посиленню інформованості агрономів, селекціонерів, насінневодів та потенційних покупців про особливості продуктів із генетично модифікованих рослин. В Україні та багатьох інших країнах прийнято закони, які попереджають про покарання за несанкціоноване поширення трансгенного насінневого матеріалу, сприяють забезпеченню моніторингу посівів, а також маркуванню харчових товарів, виготовлених із продуктів ГМР або з їхнім додаванням.