

STANISŁAW MUSZYŃSKI
Katedra Genetyki SGGW

UWAGI METODYCZNE O HODOWLI RADIACYJNEJ ROŚLIN

Pierwsze próby otrzymania mutantów przy pomocy promieni jonizujących polegały na napromienieniu pewnej liczby nasion oraz na obserwacji potomstwa napromienionych roślin. Właściwą selekcję mutantów przeprowadzano w drugim pokoleniu mutacyjnym (M_2). Stosowano kilka dawek promieniowania, a w celu otrzymania drugiego pokolenia wysiewano wszystkie nasiona zebrane z roślin pokolenia M_1 , tj. roślin bezpośrednio napromienionych lub wyrosłych z napromienionych nasion.

Stopniowe ulepszenia stosowanej metodyki polegały na dążeniu do uzyskania maksymalnej ilości mutacji wśród możliwie małej ilości roślin M_2 . Za właściwych twórców metody hodowli radiacyjnej roślin należy uważać hodowców niemieckich Freislebena i Leina. Wprowadzone przez nich zmiany to przede wszystkim stosowanie jak najmniejszej ilości dawek promieniowania oraz zmniejszenie liczby roślin M_2 . Liczba roślin, obserwowanych w M_2 , jest iloczynem liczby linii (czyli potomstw pojedynczych kłosów czy roślin M_1) oraz liczby roślin w linii. Freisleben i Lein stwierdzili, że celowe jest stosowanie dużej liczby linii w M_2 , przy minimalnej liczbie roślin w poszczególnych liniach.

Wyniki uzyskane w czasie, który upłynął od chwili opublikowania badań Freislebena i Leina, całkowicie potwierdziły ich koncepcje. Obecnie dąży się do stosowania jednej tylko dawki promieniowania, tzw. dawki optymalnej. Jest to dawka, po zastosowaniu której można oczekiwać maksymalnej ilości mutacji w napromienionym materiale. Ilość mutacji indukowanych przy pomocy promieniowania zwiększa się wraz ze wzrostem dawki. Równocześnie jednak wzrasta stopień sterylności roślin M_1 , co w efekcie powoduje zmniejszenie się absolutnej liczby roślin pokolenia M_2 . Dawka optymalna ma więc zapewnić możliwie wysoką liczbę mutacji przy dopuszczalnym jeszcze spadku płodności.

Wybór dawki przeprowadzamy na podstawie wyników testu zahamowania wzrostu siewek. Stwierdzono bowiem, że istnieje wyraźna korelacja między liczbą roślin, które osiągną stopień dojrzałości — czyli które przeżyją działanie danej dawki, a stopniem zahamowania wzrostu siewek. Niewielkie próbki nasion napromieniuje się szeregiem dawek, a następnie mierzy się stopień zahamowania wzrostu pierwszych liści.

Dawka, powodująca że wysokość siewek osiąga 20—40% wysokości siewek kontrolnych, spowoduje również spadek przeżywalności do 10—20% przeżywalności roślin kontrolnych. Ta właśnie dawka uważana jest za najbardziej odpowiednią dla celów radiacyjnej hodowli roślin. Niektórzy hodowcy zalecają stosowanie dawek nawet jeszcze wyższych, które powodują 5% przeżywalność. Wydaje się jednak, że dawki tego rzędu powodować będą zbyt dużą sterylność roślin M_1 , aby mogły być opłacalne.

W ostatnich latach pojawiło się również kilka prac nad ustaleniem optymalnej liczebności pokolenia M_2 . Jak wiadomo, większość indukowanych mutacji ma charakter recesywny, stąd konieczność przeprowadzenia selekcji w drugim pokoleniu, otrzymanym przez samozapylenie roślin M_1 . Powstaje zagadnienie, czy należy wysiewać wszystkie nasiona zebrane z roślin M_1 , czyli uzyskiwać duże linie M_2 , czy też lepsze będzie uzyskiwanie licznych, choć o niewielkiej liczbie osobników, linii M_2 .

Rozważania teoretyczne na ten temat opublikował m.in. Yoshida. Wyszedł on z założenia, że czynnikiem limitującym liczebność M_2 jest obszar, jaki można przeznaczyć pod uprawę roślin M_2 . Zdaniem Yoshidy, należy znaleźć optymalną relację między ilością linii M_2 a liczbą osobników w poszczególnych liniach.

Najstarszą z metod hodowli radiacyjnej jest tzw. metoda kłosowo-rzędowa (A). Polega ona na tym, że w oddzielne rzędy wysiewa się nasiona poszczególnych kłosów lub roślin M_1 . Można przy tym wysiewać bądź wszystkie nasiona zebrane z danej rośliny lub znajdujące się w jednym kłosie, bądź też liczba wysianych nasion może ulec zmniejszeniu. Nybom wysiewał po 20 nasion z poszczególnych kłosów jęczmienia, stosując około 2000 linii, co daje łączną liczbę 40 000 osobników pokolenia M_2 . Nishimura wysiewał po 2000—4000 linii M_2 , przy czym linie zawierały po 20—50 sztuk roślin ryżu. Biorąc średnio 3000 linii, po 35 roślin w obrębie linii, otrzymamy 105 000 roślin M_2 . Zamiast tej metody Yoshida proponuje stosowanie tzw. ulepszonej metody kłosowo-rzędowej (B).

Metoda ta opiera się na następującym rozumowaniu statystycznym. Aby ustalić optymalną liczebność pokolenia M_2 , należy wziąć pod uwagę prawdopodobieństwo wystąpienia w M_2 linii, która zawierałaby co najmniej jedną — lub więcej — pożądaną mutację. Trzeba też rozpatrzyć prawdopodobieństwo wykrycia tej linii podczas przeprowadzania selekcji wśród roślin M_2 .

Jeżeli przez m oznaczymy liczbę linii M_2 , to jest linii otrzymanych przez wysiew nasion zebranych z poszczególnych kłosów lub roślin pokolenia M_1 , a przez n oznaczymy liczbę roślin w pojedynczej linii, to ogólna liczba roślin w pokoleniu M_2 równa jest iloczynowi $m \cdot n$.

Oznaczmy teraz przez p_1 prawdopodobieństwo wystąpienia w M_2 linii zawierającej przynajmniej jedną — lub więcej — pożądaną mutację, a przez q_1 oznaczmy prawdopodobieństwo nie wystąpienia takiej linii. Odpowiednio przez p_2 oznaczmy prawdopodobieństwo wykrycia tej pożądanego mutacji w linii pokolenia M_2 , oraz przez q_2 oznaczmy prawdopodobieństwo nie wykrycia tej linii. Oczywiście jest, że $p_1 + q_1 = 1$ oraz odpowiednio $p_2 + q_2 = 1$. Zależności matematyczne przedstawiają się następująco:

$$m = \frac{\log(1 - P_m)}{\log q_1} \qquad n = \frac{\log(1 - P_n)}{\log q_2}$$

$$m \cdot n = \frac{\log(1 - P_m) \cdot \log(1 - P_n)}{\log q_1 \cdot \log q_2} \qquad \text{oraz } m \cdot n = \frac{\{\log(1 - P_r)\}^2}{\log q_1 \cdot \log q_2}$$

gdzie: P_m — oznacza prawdopodobieństwo wykrycia przynajmniej jednej lub więcej linii zawierającej jedną lub więcej pożądanymi mutacji spośród m linii M_2 ;

P_n — prawdopodobieństwo wykrycia co najmniej jednego pożądanego mutantu wśród n roślin jednej linii pokolenia M_2 ;

P_r — prawdopodobieństwo wykrycia co najmniej jednego pożądanego mutantu wśród m linii lub n roślin, gdy $P_m = P_n$.

Iloczyn $m \cdot n$ oznacza ogólną liczbę obserwowanych roślin M_2 ; liczba ta musi być odpowiednio duża, aby mogły wystąpić oczekiwane mutacje. Iloczyn $P_m \cdot P_n$ oznacza prawdopodobieństwo wykrycia co najmniej jednego pożądanego mutantu wśród $m \cdot n$ roślin pokolenia M_2 . Wartości P_m i P_n muszą być znane; określamy je na podstawie danych eksperymentalnych.

Dążeniem hodowców roślin jest uzyskanie takiej wartości iloczynu $P_m \cdot P_n$, która byłaby bliska jedności, przy jednocześnie możliwie małej wartości iloczynu $m \cdot n$. Przytoczone równania mogą mieć zastosowanie praktyczne, ponieważ w hodowli radiacyjnej roślin operuje się dużymi liczebnościami w pokoleniu M_2 . Iloczyn $m \cdot n$ osiąga swą wartość minimalną, gdy $P_m = P_n$.

Powyższe rozumowanie stanowi podstawę zaproponowanej przez Yoshidę ulepszonej metody kłosowo-rzędowej.

Biorąc pod uwagę szereg prac, w których podane zostały częstości pojawiania się mutacji indukowanych promieniowaniem, Yoshida przyjmuje, że w przypadku jęczmienia p_1 wynosi 1/740, zaś w przypadku ryżu — 1/100. Maksymalna wartość p_2 dla mutacji recesywnej powinna wynosić 1/4, ponieważ rośliny M_1 są najczęściej chimerami, jak również wskutek eliminacji gamet wartość p_2 wynosi średnio 1/5, zarówno dla jęczmienia jak i dla ryżu.

Tabela 1

Porównanie metod A i B. Dane dla metody B obliczono na podstawie danych rzeczywistych, uzyskanych przez Nyboma (jęczmień) oraz Nishimurę (ryż) dla metody A (Wg Yoshidy 1962)

	Metoda A				Metoda B							
	Dane Nyboma			Dane Nishimury	Dane Nyboma					Dane Nishimury		
m	2000	2000	2000	3000	2457	2317	2388	2719	3918	848	366	527
p_1	1/824	1/667	1/740	1/100	1/824	1/667	1/740	1/740	1/740	1/100	1/100	1/100
$P_m(\%)$	91,19	95,02	93,31	100—	94,94	96,91	96,04	97,47	99,50	99,98	97,47	99,50
				—(8.10— ¹²)								
n	20	20	20	35	13,4	15,6	14,5	16,5	23,7	38,2	16,5	23,7
p_2	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
$P_n(\%)$	98,85	98,85	98,85	99,96	94,94	96,91	96,04	97,47	99,50	99,98	97,47	99,50
$m.n$	40000	40000	40000	105000	32924	36145	34626	44864	92857	32394	6039	12496

W tabeli 1 podano obliczenia pozwalające na porównanie obu metod — A i B. Przy założeniu, że liczba roślin M_2 jest stała, korzystne jest zmniejszenie liczby roślin w linii i odpowiednie zwiększenie liczby linii. W przypadku jęczmienia, gdy $p_1 = 1/740$ oraz gdy $p_2 = 1/5$, zaś obserwowana liczba roślin M_2 wynosi 4000 a liczba linii 2000, prawdopodobieństwo wykrycia chociaż jednego mutanta ma wartość 92,24%. Odpowiednio zmniejszając liczbę roślin w linii z 20 do 16,5 (średnio) oraz zwiększając liczbę linii z 2000 do 2719, powoduje się wzrost prawdopodobieństwa wykrycia przynajmniej jednego mutanta do 95%.

Dalsze zwiększenie prawdopodobieństwa do 99% wymaga zwiększenia ogólnej liczby obserwowanych roślin M_2 do 92 857, przy czym liczba linii powinna wynosić 3918, przy 23,7 roślinach w linii. Obliczenia według metody A przedstawione w tabeli 1 obok obliczeń metodą B, wykazują przewagę metody B. Różnica ta uwydatnia się jeszcze bardziej przy porównaniu danych dotyczących ryżu, gdzie $p_1 = 1/100$. Aby osiągnąć prawdopodobieństwo wykrycia mutanta równe 99,96%, trzeba obserwować 32 394 roślin M_2 w metodzie B oraz aż 105 000 roślin przy metodzie A.

Korzyści, wynikające ze stosowania metody Yoshidy, są oczywiste. Metoda ta jest szczególnie cenna, gdy poszukiwane mutacje są trudno wykrywalne. Jeżeli pożądane mutacje należą do łatwo wykrywalnych spośród obserwowanych roślin M_2 , można stosować inne metody, polegające na dalszej redukcji liczby roślin w liniach M_2 , przy równoczesnym zwiększeniu liczby linii. Należą tu następujące metody: wysiewanie tylko 1 ziarna z rośliny M_1 w celu otrzymania linii M_2 (metoda C); wysiewanie

Tabela 2

Wartości iloczynu $m \cdot n$ dla metod A i B przy różnych wartościach p_1 i p_2 ; liczby górne: $P = P_r^2 = 0,95$; liczby dolne: $P = P_r^2 = 0,99$ (Wg Yoshidy, 1962)

p_1	Metoda B				Metoda C		
	p_2	1/4	1/5	1/6	1/4	1/5	1/6
	n	12,7	16,5	20,1	1	1	1
m	18,4	23,7	29,1	1	1	1	
1/2	5,3	67,3	87,5	107	22,4	28,4	34,4
	7,6	140	180	221	34,5	43,7	52,9
1/5	16,5	210	272	332	58,4	73,4	88,4
	23,7	436	562	690	89,8	113	136
1/10	34,9	443	576	702	119	149	176
	50,3	926	1192	1464	182	223	274
1/50	182	2311	3003	3658	598	748	898
	262	4821	6209	7624	919	1149	1330
1/100	366	4648	6039	7357	1197	1497	1796
	527	9698	12490	15336	1840	2300	2761
1/200	734	9322	12111	14753	2396	2995	3595
	1057	19449	25051	30759	3682	4603	5525
1/300	1101	13983	18167	22130	3595	4491	5392
	1587	29201	37612	46182	5525	6904	8289
1/500	1837	23330	30311	36924	5991	7491	8986
	2646	48686	62710	76999	9209	11515	13813
1/700	2572	32664	42438	51697	8389	10484	12583
	3707	68209	87856	107874	12895	16117	19343
1/1000	3675	46673	60638	73868	11981	14972	17971
	5296	97446	125515	154114	18417	23015	27625
1/2000	7352	93370	121308	147775	23961	29978	36040
	10594	194930	251078	308285	36833	46083	55402
1/3000	11028	140056	181962	221663	36040	44864	53985
	15891	292394	376617	462428	55402	68966	82988
1/5000	18376	233375	303204	369358	59956	74772	89727
	26479	487214	627552	770539	92166	114943	137931
1/7000	25756	327101	424974	517696	83938	104922	125099
	37113	682888	879578	1079988	129033	161291	192308
1/10000	36795	467297	607118	739580	119361	149544	176771
	53019	975550	1256550	1542853	183487	229885	271740

2 ziarn z rośliny M_1 (metoda D); wysiewanie 3 ziarn z rośliny M_1 (metoda E).

Stosunkowo często stosuje się wysiew jednego nasienia z rośliny M_1 .

W tabeli 2 podane są wartości m , n oraz $m \cdot n$ dla metody B i C w przypadku roślin samopylnych, przy założeniu, że znane są wartości p_1 i p_2 . Ponieważ w zależności od właściwości danego materiału roślinnego

Tabela 3

Wartości $m \cdot n$ oraz $E(I)$ dla różnych wartości p_1 w metodach B, C, D i E, gdy $p_2 = 1/5$ (Wg Yoshidy, 1964) liczby górne oznaczają $P = 0,95$; liczby dolne — $P = 0,99$

Metoda P_1	B		C		D		E	
	mn	E(I)	mn	E(I)	mn	E(I)	mn	E(I)
1/2	87,5	8,8	28,4	2,8	30,2	3,0	32,1	3,2
	180	18,0	43,7	4,4	46,4	4,6	49,4	4,9
1/5	272	10,9	73,4	2,9	80,2	3,2	87,5	3,5
	562	22,5	113	4,5	123	4,9	135	5,4
1/10	576	11,5	149	3,0	163	3,3	180	3,6
	1192	23,8	228	4,6	251	5,0	276	5,5
1/50	3003	12,0	748	3,0	829	3,3	917	3,7
	6209	24,8	1148	4,6	1275	5,1	1409	5,6
1/100	6039	12,1	1497	3,0	1662	3,3	1837	3,7
	12490	25,0	2300	4,6	2554	5,1	2824	5,7
1/300	18167	12,1	4491	3,0	4990	3,3	5521	3,7
	37612	25,1	6904	4,6	7670	5,1	8486	5,7
1/500	30311	12,1	7491	3,0	8321	3,3	9205	3,7
	62710	25,1	11490	4,6	12788	5,1	14148	5,7
1/700	42438	12,1	10484	3,0	11651	3,3	12893	3,7
	87856	25,1	16117	4,6	17906	5,1	19816	5,7
1/1000	60638	12,1	14972	3,0	16641	3,3	18415	3,7
	125515	25,1	23015	4,6	25576	5,1	28302	5,7
1/3000	181296	12,1	44864	3,0	49954	3,3	55218	3,7
	376617	25,1	68966	4,6	76776	5,1	84866	5,7
1/5000	303204	12,1	74772	3,0	83150	3,3	92291	3,7
	627552	25,1	114943	4,6	127796	5,1	141844	5,7
1/10000	607118	12,1	149544	3,0	165777	3,3	184146	3,7
	1256550	25,1	229885	4,6	254778	5,1	283018	5,7

mogą zmieniać się wartości p_1 , natomiast p_2 jest stosunkowo mniej zmienne, Yoshida dokonał obliczenia wartości oczekiwanych (Ei) wystąpienia pożądaných mutacji wśród roślin M_2 oraz liczby $m \cdot n$ dla różnych wartości p_1 (tabela 3).

Na zakończenie tych kilku uwag należy zaznaczyć, że możliwości hodowli radiacyjnej roślin polegają nie tylko na indukowaniu określonych mutacji genowych. Prace Searsa zapoczątkowały nowy kierunek w hodowli radiacyjnej. Przez napromienienie mieszańców *Aegilops* × *Triticum* spowodowano przeniesienie fragmentu chromosomu, w którym znajdował się gen odporności, z genomu *Aegilops* do genomu *Triticum*. Po ogłoszeniu wyników prac Searsa w 1956 r., metodę tę zastosował Knott w celu przeniesienia odporności z *Agropyron* do *Triticum*. I ta praca zakończyła się sukcesem.

Innym odkryciem, które wskazuje na nowe możliwości w dziedzinie ulepszania roślin uprawnych drogą hodowli mutacyjnej, jest stwierdzenie, że mutacje mogą wpływać na skład aminokwasów białek roślinnych. Przed około 30 laty opisano mutacje spontaniczne kukurydzy, dotyczące zabarwienia bielma, a mianowicie opaque-2 (0—2), oraz floury-2 (flr). Dopiero jednak w 1964 i 1965 r. stwierdzono, że mutacja dotyczy nie tylko barwy bielma, lecz również samego składu białek. Oba mutanty wykazują wzrost procentowy zawartości frakcji azotu niebiałkowego oraz frakcji glutein, przy zmniejszeniu procentowej zawartości zeiny. Badania nad wartością pokarmową obu mutantów, przeprowadzone na szczurach, wykazały, że oba mutanty mają o wiele bardziej wartościowe białko w porównaniu nie tylko ze znanymi odmianami kukurydzy, lecz również w porównaniu z innymi zbożami. Szczególnie wartościowy jest mutant 0-2.

LITERATURA

1. Freisleben R., Lein A.: Zeitschrift für Pflanzenzüchtung 25:235—254, 1943.
2. Freisleben R., Lein A.: Z. Pflanzenzüchtung 25:256—283, 1943.
3. Freisleben R., Lein A.: Kühn-Archiv 60:211—225, 1943/1944.
4. Knott D. R.: Can. J. Plant Sci. 41:109—123, 1961.
5. Kuźdowicz A.: Biuletyn IHAR, nr 1—2(64—65):5—12, 1965.
6. Nelson O. E.: Mutant Genes That Change the Composition of Maize Endosperm Protein. Federation Proc. 25:1676—1678, 1966.
7. Sears E. R.: The Transfer of Leaf-rust Resistance from *Aegilops umbellata* to wheat. Brookhaven Symp. Biol. 9:1—22, 1956.
8. Yoshida Y.: Euphytica 11:95—111, 1962.
9. Yoshida Y.: Euphytica 13:65—74, 1964.