



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15154 (13) U
(51) МПК (2006)
A01H 1/00
A01G 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО МАРКУВАННЯ І ВІДБОРУ ДЕРЕВ З ВЕЛИКОЮ КІЛЬКІСТЮ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НАСІННЯ У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ СОСНИ КРИМСЬКОЇ

1

2

(21) u200512329

(22) 21.12.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Коршиков Іван Іванович, Мудрик Олена Ана-
толіївна

(73) ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇ-
НИ

(57) Спосіб генетичного маркування і відбору де-
рев з великою кількістю гетерозиготного насіння у
природних популяціях сосни кримської, який вклю-
чає електрофоретичне розділення ізоферментів і
визначення генотипів за даними ізоферментних
локусів, який **відрізняється** тим, що як генетичний
маркер дерев використовують ізоферментний ло-
кус малатдегідрогенази Mdh-3.

Корисна модель відноситься до лісництва, зо-
крема, до способів отримання насіння з покраще-
ними генетичними показниками для створення
лісонасінневих плантацій сосни кримської.

У зв'язку зі зростаючими потребами виробни-
чого використання цінних деревних порід і необ-
хідності їх збереження та штучного відтворення,
набуває актуальності ефективна організація селе-
кційного процесу створення насаджень потенційно
життєздатних і продуктивних рослин. Традиційні
методи лісової селекції, що базуються на групово-
му та індивідуальному відборі кращих за продук-
тивністю рослин на основі фенотипічних (морфо-
логічних) ознак, не запобігають попаданню у
сукупність селективних рослин дерев, які продуку-
ють генетично послаблене (інбредне, гомозиготне)
потомство. Інбредність потомства рослин, зокрема
хвойних, виражається у погіршенні показників рос-
ту та маси проростків, їх стійкості та в цілому жит-
тєздатності, і зумовлена підвищеним рівнем гомо-
зиготності. Через це з згодом гомозиготне
потомство у насадженнях гине, а найбільш прис-
тосованими та життєздатними виявляються гете-
розиготні рослини, які мають підвищений адаптив-
ний потенціал. Оскільки генетична якість
потомства залежить від генетичних якостей мате-
ринських дерев, зокрема, їх гетерозиготності, пос-
тає питання пошуку генетичних маркерів рослин,
які продукують насіння з покращеними генетични-
ми якістьями (гетерозиготне), що дозволить мінімі-
зувати загибель нежиттєздатних сіянців при ство-
ренні штучних насаджень.

Використання ізоферментних локусів у якості

генетичних маркерів у селекції рослин відомо з
багатьох робіт генетиків-селекціонерів. Отже, роз-
роблено спосіб ідентифікації батьківських та гіб-
ридних форм кукурудзи [А.с. 1517859 СССР МКИ
A01H1/4. Спосіб ідентифікації батьківських і
гібридних форм кукурудзи / Крестинков І.С., Сту-
па Л.Я. – 1989], в якому використовують ізофер-
ментний спектр супероксиддисмутази (СОД) пил-
ку. Порівняльний аналіз отриманих
електрофоретичним шляхом ізоферментних спек-
трів СОД рослин, що досліджуються, зі спектрами
відомих ліній кукурудзи, дозволяє виявити чистоту
або гібридизацію досліджуваної лінії.

Загальними ознаками рішення, що заявляється,
і аналогу є: спосіб визначення батьківських
генотипів рослин для селекційного процесу, вико-
ристовуючи в якості генетичних маркерів ізофер-
ментні локуси.

Однак, запропонований спосіб дозволяє прис-
корити та скорегувати селекційний процес шляхом
визначення чистоти матеріалу сільськогосподар-
ських культур, зокрема, однорічників. Для селекції
багаторічних рослин та тварин важливо досліджу-
вати генетичні особливості організмів, що переда-
ють свої корисні генетичні якості у потомстві. При
селекції деревних рослин, до яких належать хвой-
ні, внесок чоловічих генів (пилку) у створення по-
томства можливо контролювати тільки за цілеспр-
ямованих схрещуваннях, тому що запліднення
рослин, які запилюються перехресне у природних
популяціях і штучних насадженнях, є випадковою
подією, що залежить від багатьох факторів. Тому
при селекційному відборі рослин у деревостанах

(19) UA (11) 15154 (13) U

хвойних генетичні показники насіннєвого потомства можливо прогнозувати лише у відношенні материнських рослин. Відомо, що генетичні особливості дорослих рослин обумовлюють генетичну якість насіння.

Як прототип вибрано спосіб відбору життєздатних, потенційно високопродуктивних рослин хвойних за рахунок визначення їх генетичної різноманітності на прикладі сосни звичайної [А.с. 1281216 СССР МКИ А01Н1/4, А01G23/00. Способ отбора сеянцев хвойных растений / Духарев В.А., Животовский Л.А. – 1987], в якому аналізують 3 ізоферментні локуси неспецифічних естераз хвої сіянців. Ці локуси використовують для визначення якісного вмісту білків, аналізуючи отриману електрофоретичним шляхом ділянку ізоферментного спектру, що кодує синтез естераз, і виділяють рослини, які мають максимальну або близьку до неї генетичну гетерогенність даної ділянки.

Загальними ознаками рішення, що заявляється, і прототипу є: спосіб селекційного відбору рослин хвойних, що характеризуються кращими генетичними показниками, використовуючи в якості генетичних маркерів ізоферментні локуси.

Однак, в описаному способі аналізувались лише сіянці, з яких до створення штучних насаджень рекомендовано використовувати окремі, що мають найбільшу генетичну різноманітність. Але для створення лісонасінневих плантацій хвойних необхідно проводити пошук таких дерев та генетичних маркерів (ізоферментних локусів), за якими можливо відбирати рослини, що продукують насіння з покращеними генетичними якостями (гетерозиготне). При цьому слід мати на увазі, що ізоферментні локуси як генетичні маркери материнського дерева мають видову специфіку.

В основу корисної моделі поставлене завдання розробки способу генетичного маркування у природних популяціях сосни кримської дерев, що продукують насіння з великою кількістю гетерозигот.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев сосни кримської з великою кількістю гетерозиготного насіння, відповідно до корисної моделі, у якості генетичного маркеру використовують ізоферментний локус малатдегідрогенази Mdh-3.

Зазначені ознаки складають сутність корисної моделі.

Причинно-наслідковий зв'язок істотних ознак

корисної моделі з результатом, що досягається, полягає у наступному.

Пошук генетичних маркерів дерев сосни кримської, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали використовуючи 10 поліморфних локусів, що кодуєть синтез ізоферментів 6 ген-ферментних систем (глутаматоксалоацетаттрансамінази (локуси Got-1, Got-2, Got-3), глутаматдегідрогенази (Gdh), супероксиддісмутази (Sod-4), кислоти фосфатази (Acp), лейцинамінотрипсидази (Lap-1, Lap-2), малатдегідрогенази (Mdh-2, Mdh-3)).

Генотипи материнських дерев визначали шляхом електрофоретичного розділення ізоферментів тканин гаплоїдних мегагаметофітів (ендоспермів) насіння, генотипи потомства - диплоїдних тканин зародків насіння. Для встановлення генотипу кожного дерева аналізували 8 випадково обраних насінин із різних шишок, оскільки вірогідність помилкового віднесення гетерозиготних дерев до гомозиготних розраховують із співвідношення $P=0,5^{n-1}$ (де n - кількість ендоспермів). Електрофорез ізоферментів ендоспермів та зародків насіння проводили одночасно на сусідніх доріжках у поліакриламідному гелі. Отримані ізоферментні спектри використовували у визначенні генотипів дерев та їх потомства.

Технічна задача корисної моделі - на основі порівняльного аналізу кількості гетерозиготних дерев і зародків їх насіння встановити ізоферментні локуси материнських рослин, за якими кількість гетерозиготного потомства найбільша.

Технічний результат способу генетичного маркування дерев полягає в тому, що при створенні лісонасінневих плантацій використання насіння з дерев, що продукують велику кількість гетерозиготних зародків насіння за локусом Mdh-3, дозволить мінімізувати частку гомозиготних проростків.

Нижче наводиться описання способу генетичного маркування дерев сосни кримської з великою кількістю гетерозиготного насіння у природній популяції, і приклад його конкретної реалізації.

Приклад 1.

Вивчали 92 дерева з природної популяції сосни кримської у Гірському Криму. Загальна вибірка зародків насіння з цих дерев склала 736.

На основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 34 генотипи материнських дерев та зародків насіння 10 ізоферментних локусів (таблиця 1).

Таблиця 1

Кількість гомо- та гетерозиготних материнських рослин та кількість гетерозиготних зародків насіння, що вони продукують, частка гетерозиготного насіння у популяції сосни кримської за даними ізоферментних локусів

| Локус | Генотипи материнських рослин | Кількість генотипів материнських рослин, шт. | | Загальна кількість гетерозиготних зародків насіння, шт. | Частка гетерозиготного насіння, % |
|-------|------------------------------|--|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| | | загальна | що має гетерозиготні зародки насіння | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Gdh | AB | 3 | 3 | 9 | 37,5 |
| | BB | 85 | 23 | 23 | 3,4 |
| | AC | 1 | 1 | 8 | 100 |
| | BC | 3 | 3 | 7 | 29,2 |
| Got-1 | BC | 1 | 1 | 4 | 50 |
| | BB | 91 | 0 | 0 | 0 |
| Got-2 | AA | 24 | 22 | 65 | 33,9 |
| | AB | 45 | 45 | 151 | 41,9 |
| | BB | 23 | 17 | 45 | 24,5 |
| Got-3 | AA | 1 | 1 | 3 | 37,5 |
| | AB | 13 | 13 | 35 | 33,6 |
| | BB | 75 | 8 | 11 | 1,8 |
| | BC | 3 | 3 | 11 | 45,8 |
| Sod-4 | AF | 2 | 2 | 2 | 12,5 |
| | AA | 90 | 0 | 0 | 0 |
| Acp | AB | 8 | 6 | 15 | 23,4 |
| | BB | 50 | 16 | 40 | 10 |
| | BC | 30 | 25 | 61 | 25,4 |
| | BE | 4 | 4 | 9 | 28,1 |
| Lap-1 | AB | 5 | 5 | 14 | 35 |
| | BB | 81 | 17 | 40 | 6,2 |
| | BC | 5 | 5 | 10 | 25 |
| | ee | 1 | 1 | 1 | 12,5 |
| Lap-2 | AB | 12 | 11 | 29 | 30,21 |
| | BB | 77 | 24 | 45 | 7,30 |
| | BC | 1 | 1 | 3 | 37,5 |
| | BG | 2 | 2 | 4 | 25 |
| Mdh-2 | AB | 2 | 2 | 6 | 37,5 |
| | BB | 90 | 0 | 0 | 0 |
| Mdh-3 | AA | 9 | 5 | 18 | 25 |
| | AB | 43 | 43 | 198 | 57,56 |
| | BB | 37 | 24 | 58 | 19,59 |
| | BC | 1 | 1 | 7 | 87,5 |
| | BD | 2 | 2 | 12 | 75 |

Примітка. Латинськими літерами умовно позначені гени. Гомозиготні рослини позначені однаковими літерами, гетерозиготні - різними.

Встановлено, що за більшістю локусів (Gdh, Got-1, Got-3, Sod-4, Acp, Lap-1, Lap-2 і Mdh-2) переважна кількість генотипів дерев гомозиготні, і як-правило, меншість з цих дерев формує гетерозиготне потомство. Цим зумовлена в цілому невелика частка гетерозиготного насіння, що продукують гомозиготні дерева у досліджуваній популяції. Гетерозиготні дерева майже усі продукують гетерозиготне потомство, тому його частка у гетерозиготних дерев більша, ніж у гомозиготних. Слід зазначити, що серед гетерозиготних генотипів за окремими локусами зустрічаються

такі, що продукують переважну частку гетерозиготного потомства - генотипи Got-2^{AB}, Mdh-3^{AB} (див.таблиця 1).

Найбільша кількість гетерозиготних дерев у популяції сосни кримської встановлена за 3 локусами: Got-2 (44 дерева з загальної кількості 92), Acp (42) і Mdh-3 (46) (див. таблиця 1, таблиця 2).

Найбільшу кількість гетерозиготних зародків насіння (293) продукували дерева, гетерозиготні за локусом Mdh-3. За локусом Acp у гетерозиготних дерев кількість гетерозиготних зародків (125) була більш ніж у два рази менша, ніж у дерев,

гетерозиготних за локусом Mdh-3. Материнські рослини, гетерозиготні за локусом Got-2, також продукували велику кількість гетерозиготних зародків насіння (261), але у досліджуваній популяції, окрім гетерозиготних генотипів дерев, за цим локусом встановлено значну кількість альтернативних гомозиготних рослин (25 і 23 дерева) (див. таблиця 1, 2), тобто дерев, гомозиготних за різ-

ними алелями цього локусу. Тому гетерозиготне потомство за локусом Got-2 могло утворитися не неопосередковано від гетерозиготних материнських дерев, а від перехресного запилення альтернативних гомозиготних рослин. Через це ізоферментний локус Got-2 не доцільно використовувати в якості маркерного.

Таблиця 2

Кількість гетерозиготних зародків насіння та їх співвідношення з гетерозиготними материнськими рослинами у популяції сосни кримської за даними ізоферментних локусів

| Локус | Кількість материнських рослин, шт. | | Кількість гетерозиготних зародків насіння, шт. | Співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до гетерозиготних материнських рослин |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| | Гетерозиготних | альтернативних гомозиготних | | |
| Gdh | 7 | 0 | 47 | 6,7 |
| Got-1 | 1 | 0 | 4 | 4,0 |
| Got-2 | 44 | 24/23 | 261 | 5,9 |
| Got-3 | 15 | 1 | 60 | 4,0 |
| Sod-4 | 2 | 0 | 2 | 1,0 |
| Acp | 42 | 0 | 125 | 3,0 |
| Lap-1 | 10 | 1 | 65 | 6,5 |
| Lap-2 | 15 | 0 | 81 | 5,4 |
| Mdh-2 | 2 | 0 | 6 | 3,0 |
| Mdh-3 | 46 | 9 | 293 | 6,4 |

Примітка. Через дріб наведена кількість альтернативних гомозиготних материнських рослин.

За усіма ізоферментними локусами нами було розраховано показник, що виражає співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до кількості гетерозиготних материнських дерев. За локусами Got-2 і Mdh-3 цей показник мав великі значення, але також він був високий за локусом Gdh. Однак це обумовлено невеликою кількістю гетерозиготних за локусом Gdh материнських рослин (4), тому цей локус не слід роздивлятися як потенційно маркерний.

Таким чином, спосіб дозволяє використовувати ізоферментний локус Mdh-3 в якості генетичного маркеру для відбору гетерозиготним за ним

дерев у популяціях сосни кримської. Ці дерева, що продукують велику кількість гетерозиготного насіння, необхідно використовувати при створенні лісонасінневих плантацій сосни кримської.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки:

1. А.с. 1517859 СССР МКИ А01Н1/4. Способ идентификации родительских и гибридных форм кукурузы / Крестинков И.С., Ступа Л.Я. - 1989.

2. А.с. 1281216 СССР МКИ А01Н1/4, А01G23/00. Способ отбора сеянцев хвойных растений / Духарев В.А., Животовский Л.А. - 1987 (прототип).