



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69048** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A01H 1/00
A01G 23/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 09269	(72) Винахідник(и): Коршиков Іван Іванович (UA), Демкович Андрій Євгенович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.07.2011	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ, пр. Ілічча, 110, м. Донецьк, 83059, Україна, UA (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2012, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО ВІДБОРУ ЗА ІЗОФЕРМЕНТНИМИ ЛОКУСАМИ В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ ТА ШТУЧНИХ НАСАДЖЕННЯХ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ РОСЛИН З ПІДВИЩЕНОЮ СТІЙКІСТЮ ДО КОРЕНЕВОЇ ГУБКИ

(57) Реферат:

Спосіб генетичного маркування рослин сосни звичайної в природних та штучних насадженнях, що мають підвищену стійкість до кореневої губки, містить електрофорез ізоферментів і визначення за алозимними локусами частот генотипів, котрі суттєво частіше зустрічаються у дерев, стійких до патогену. Як генетичні маркери використовуються чотири генотипи - $Lap-1^{0.97/1.00}$, $Lap-2^{1.00/1.05}$, $Lap-2^{0.95/1.00}$ і $Asp^{0.97/1.00}$.

UA 69048 U

Корисна модель належить до галузі лісівництва, зокрема до селекційного добору генотипів дерев сосни звичайної з підвищеною стійкістю до кореневої губки, для створення лісонасінневих плантацій та штучних насаджень.

5 При інтенсивному виробничому використанні деревних порід і з огляду на необхідність їх збереження та штучного відтворення, набуває актуальності ефективна організація селекційного процесу на ранніх стадіях онтогенезу для створення продуктивних, життєздатних насаджень, стійких до патогенів. Традиційні методи лісової селекції, що базуються на груповому та індивідуальному відборі кращих фенотипів не дають можливості враховувати ознаки стійкості молодих рослин до патогенів. Через це згодом значна частина рослин в штучних насадженнях може вражатися шкідниками та пошкоджуватися різними патогенами. Для головної лісоутворюючої породи України - сосни звичайної - найбільш небезпечним патогеном є коренева губка (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref). Тому гостро стоїть питання пошуку генетичних маркерів для рослин сосни звичайної, що мають покращені генетичні якості, завдяки яким відзначаються підвищеною стійкістю до цього небезпечного патогену. Використання стійких рослин при закладанні лісонасінневих плантацій та штучних лісів дозволить зменшити втрати від загибелі при пошкодженні кореневою губкою іноді навіть цілих насаджень. Генетичне маркування стійких до кореневої губки рослин сосни звичайної не проводилось, хоча молекулярно-генетичні маркери використовуються в роботах багатьох генетиків-селекціонерів. Для ряду видів хвойних винайдені ізоферментні маркерні локуси [2, 3, 4]. Так, наприклад, з використанням ізоферментів встановлено відмінності в алельній та генотиповій структурі рослин *Pinus lawsonii* Rozel та *P. montezumae* Lamb із різною стійкістю до комах шкідників [1]. Аналогічні маркерні ізоферментні алелі та генотипи можуть бути знайдені і для дерев сосни звичайної, стійких до кореневої губки. Загальними ознаками рішення, що заявляється, і аналога є: спосіб визначення за допомогою алозимів материнських генотипів сосни звичайної, стійких до кореневої губки, для наступного використання певних молекулярно-генетичних маркерів в селекційному відборі.

Як прототип вибрано спосіб добору життєздатних, потенційно високопродуктивних рослин хвойних шляхом визначення їх генетичної різноманітності на прикладі сосни звичайної [5], в якому аналізують три ізоферментні локуси неспецифічних естераз хвої сіянців. Ці локуси використовують для визначення якісного вмісту білків, аналізуючи отриману електрофоретичним шляхом ділянку ізоферментного спектра, що кодує синтез естераз, і виділяють рослини, які мають максимальну або близьку до неї генетичну гомогенність даної ділянки.

35 Загальними ознаками рішення, що заявляється, і прототипу є: спосіб селекційного добору в природних або штучних деревостанах окремих рослин сосни звичайної, що мають генетичні показники, відповідні стійким до кореневої губки рослинам, з використанням при цьому молекулярно-генетичних маркерів.

Однак, в описаному у прототипі способі аналізують сіянці, з яких до створення штучних насаджень рекомендують використовувати окремі з них, що мають найбільшу генетичну різноманітність на основі ізоферментних локусів, а інші сіянці вибраковують, не зважаючи на те, що сіянцям з різними генотипами може бути властива різна стійкість до патогенів. Це не є раціональним, оскільки використання сіянців з підвищеною стійкістю до патогенів (кореневої губки) дозволить зменшити частку відмираючих внаслідок ураження патогеном рослин, а отже - мінімізувати втрати від кореневої губки в насадженнях. Таким чином, для створення ефективних лісонасінневих плантацій та штучних насаджень хвойних доцільно проводити пошук таких дерев, а насамперед генетичних маркерів (наприклад ізоферментних локусів), за якими стійкі до кореневої губки рослини відрізняються від інших. При доборі таких дерев їхнє вегетативне потомство може бути у повному обсязі використано для створення клонових насінневих плантацій та наступного лісорозведення.

50 В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу добору стійких до кореневої губки рослин сосни звичайної в природних популяціях та штучних насадженнях за допомогою маркерних поліморфних ізоферментних локусів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі генетичного добору серед рослин сосни звичайної тих, які характеризуються підвищеною стійкістю до кореневої губки, відповідно до корисної моделі, як генетичні маркери використовують окремі, характерні для стійких дерев ізоферментні локуси.

Зазначені ознаки складають суть корисної моделі.

Причинно-наслідковий зв'язок істотних ознак корисної моделі з результатом, що досягається, полягає у наступному.

Пошук серед стійких до кореневої губки дерев сосни звичайної генетичних маркерів здійснювали за ізоферментними локусами алкогольдегідрогенази (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), діафори (DIA, К.Ф. 1.6.4.3), глутаматоксалоацетаттрансамінази (GOT, К.Ф. 2.6.1.1), глутаматдегідрогенази (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), форміатдегідрогенази (FDH, К.Ф. 1.2.1.2), кислотофосфатази (ACP, К.Ф. 3.1.3.2), лейцинамінопептидази (LAP, К.Ф. 3.4.11.1), малатдегідрогенази (MDH, К.Ф. 1.1.1.37), супероксиддисмутази (SOD, К.Ф. 1.15.1.1). Всього було задіяно 19 локусів.

Генотипи 36 дорослих дерев сосни звичайної, що вижили в осередках ураження кореневою губкою (У) в насадженнях на півночі Донецької області, визначали шляхом електрофорезу ізоферментів з ендоспермів насіння в поліакриламідному гелі з наступним гістохімічним забарвленням. Отримані спектри ізоферментних локусів використовували у визначенні генотипів дерев. Такі ж самі дослідження було проведено стосовно природних деревостанів сосни звичайної Харківської та Луганської областей (П1-54 дерева, П2-25 дерев, П3-46 дерев). На основі отриманих даних визначали генотипові особливості кожного дерева з чотирьох деревостанів.

Технічне завдання корисної моделі - на основі порівняльного аналізу генетичної мінливості за 19 алозимними локусами чотирьох деревостанів виділити генотипи, що характерні для дерев, які вижили в осередках ураження кореневою губкою, та, очевидно, відзначаються більшою стійкістю до цього патогену.

Технічний результат способу генетичного добору дерев сосни звичайної з високою стійкістю до кореневої губки полягає в тому, що при створенні лісонасінневих плантацій або штучних насаджень потрібно використовувати саме такі рослини, які мають відповідні маркерні генотипи, що і дозволить підвищити стійкість створюваних насаджень до кореневої губки.

Нижче наводиться опис способу генетичного добору за ізоферментними локусами дерев сосни звичайної, що характеризуються підвищеною стійкістю до кореневої губки і приклад його конкретної реалізації.

Приклад 1

На основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено генотипи дерев, що вижили в осередках ураження кореневою губкою за ізоферментними локусами, та дерев з природних популяцій, які не зазнавали впливу патогену (табл.).

Таблиця

Частоти генотипів рослин сосни звичайної, що вижили в осередках ураження кореневою губкою (У) та дерев з природних популяцій, що не зазнавали ураження кореневою губкою (П1 – П3)

Генотип	Частоти генотипів у вибірці				Генотип	Частоти генотипів у вибірці			
	У	П1	П2	П3		У	П1	П2	П3
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Got-1 ^{1.00/0.90}	0,028	0,037	0,000	0,022	Adh-1 ^{1.00/1.05}	0,000	0,000	0,000	0,178
Got-1 ^{1.00/1.00}	0,972	0,944	0,960	0,978	Adh-1 ^{1.00/1.08}	0,028	0,063	0,000	0,044
Got-1 ^{1.00/1.10}	0,000	0,019	0,040	0,000	Adh-2 ^{0.00/1.00}	0,000	0,000	0,000	0,022
Got-2 ^{0.00/1.00}	0,000	0,019	0,040	0,000	Adh-2 ^{0.90/0.90}	0,000	0,063	0,000	0,022
Got-2 ^{0.00/1.12}	0,000	0,000	0,120	0,000	Adh-2 ^{0.90/1.00}	0,111	0,167	0,080	0,133
Got-2 ^{1.00/1.00}	0,472	0,407	0,120	0,413	Adh-2 ^{1.00/1.00}	0,889	0,771	0,920	0,822
Got-2 ^{1.00/1.12}	0,444	0,444	0,520	0,457	Sod-1 ^{1.00/1.00}	1,000	1,000	1,000	1,000
Got-2 ^{1.00/1.20}	0,000	0,000	0,000	0,022	Sod-2 ^{1.00/1.00}	1,000	1,000	1,000	1,000
Got-2 ^{1.12/1.12}	0,083	0,111	0,200	0,109	Sod-3 ^{1.00/1.00}	1,000	1,000	1,000	1,000
Got-2 ^{1.12/1.20}	0,000	0,019	0,000	0,000	Sod-4 ^{0.90/1.00}	0,000	0,074	0,120	0,065
Got-3 ^{1.00/1.00}	0,556	0,556	0,320	0,435	Sod-4 ^{1.00/1.00}	1,000	0,926	0,880	0,935
Got-3 ^{1.00/1.50}	0,361	0,333	0,600	0,500	Mdh-2 ^{1.00/1.00}	0,889	0,960	0,960	0,889
Got-3 ^{1.50/1.50}	0,083	0,111	0,080	0,065	Mdh-2 ^{1.00/1.08}	0,111	0,040	0,040	0,111
Gdh ^{1.00/1.00}	0,361	0,352	0,320	0,500	Mdh-3 ^{0.00/0.85}	0,000	0,000	0,040	0,000
Gdh ^{1.00/1.12}	0,583	0,500	0,440	0,413	Mdh-3 ^{0.00/1.00}	0,000	0,060	0,040	0,022
Gdh ^{1.12/1.12}	0,056	0,148	0,240	0,087	Mdh-3 ^{0.85/0.85}	0,000	0,040	0,080	0,067
Dia-1 ^{0.00/0.90}	0,000	0,000	0,000	0,022	Mdh-3 ^{0.85/1.00}	0,500	0,400	0,680	0,467
Dia-1 ^{0.00/1.15}	0,000	0,000	0,000	0,022	Mdh-3 ^{1.00/1.00}	0,500	0,500	0,160	0,378
Dia-1 ^{0.85/0.85}	0,000	0,000	0,040	0,000	Mdh-3 ^{1.00/1.12}	0,000	0,000	0,000	0,044
Dia-1 ^{0.85/0.90}	0,000	0,000	0,040	0,000	Mdh-3 ^{1.00/1.15}	0,000	0,000	0,000	0,022

Продовження таблиці

Dia-1 ^{0.90/0.90}	0,083	0,060	0,040	0,111	Lap-1 ^{0.95/0.95}	0,000	0,020	0,000	0,000
Dia-1 ^{0.90/1.00}	0,528	0,180	0,400	0,422	Lap-1 ^{0.95/1.00}	0,000	0,360	0,080	0,154
Dia-1 ^{1.00/1.00}	0,389	0,480	0,480	0,400	Lap-1 ^{0.97/1.00}	0,083	0,000	0,000	0,026
Dia-1 ^{1.00/1.15}	0,000	0,160	0,000	0,022	Lap-1 ^{1.00/1.00}	0,889	0,620	0,920	0,821
Dia-1 ^{1.15/1.15}	0,000	0,120	0,000	0,000	Lap-1 ^{1.00/1.05}	0,028	0,000	0,000	0,000
Dia-2 ^{0.90/0.90}	0,000	0,020	0,000	0,000	Lap-2 ^{0.00/1.00}	0,000	0,000	0,040	0,000
Dia-2 ^{0.90/1.00}	0,083	0,040	0,040	0,022	Lap-2 ^{0.95/0.95}	0,028	0,000	0,040	0,000
Dia-2 ^{1.00/1.00}	0,917	0,760	0,880	0,933	Lap-2 ^{0.95/1.001}	0,167	0,040	0,040	0,026
Dia-2 ^{1.00/1.10}	0,000	0,180	0,080	0,044	Lap-2 ^{1.00/1.00}	0,806	0,860	0,800	0,821
Dia-4 ^{0.89/0.89}	0,000	0,000	0,040	0,000	Lap-2 ^{1.00/1.05}	0,000	0,100	0,080	0,154
Dia-4 ^{0.89/1.00}	0,083	0,000	0,120	0,067	Асп ^{0.94/0.94}	0,056	0,125	0,160	0,143
Dia-4 ^{1.00/1.00}	0,722	0,900	0,840	0,933	Асп ^{0.97/0.97}	0,000	0,000	0,000	0,071
Dia-4 ^{1.00/1.10}	0,194	0,100	0,000	0,000	Асп ^{0.97/1.00}	0,028	0,000	0,000	0,000
Adh-1 ^{0.89/1.00}	0,000	0,083	0,000	0,022	Асп ^{0.94/1.00}	0,472	0,271	0,040	0,333
Adh-1 ^{1.00/1.00}	0,778	0,667	0,920	0,733	Асп ^{1.00/1.00}	0,417	0,583	0,520	0,214
Adh-1 ^{1.00/1.02}	0,194	0,188	0,080	0,022	Асп ^{1.00/1.02}	0,028	0,021	0,280	0,238

Примітка. Цифрами умовно позначено генотипи за конкретним локусом. Жирним шрифтом виділено випадки надлишку генотипів у рослин, які вижили в осередках ураження кореневою губкою, курсивом - випадки дефіциту генотипів.

Встановлено, що у рослин, які вижили в осередках ураження кореневою губкою порівняно із рослинами природних популяцій найбільші відмінності в частотах генотипів відмічено за п'ятьма з 19 локусів, а саме Dia-2, Mdh-3, Lap-1, Lap-2, і Асп. У стійких до кореневої губки дерев відсутні окремі генотипи за локусами Dia-2 і Mdh-3, а тому їх важко застосовувати у практиці генетичного маркування рослин у деревостанах. Для цього більше підходять генотипи, які з підвищеною частотою зустрічаються у стійких до патогену дерев, а саме Lap-1^{0.97/1.00}, Lap-2^{0.95/1.00}, а також менш поширені генотипи - Lap-1^{1.00/1.05} і Асп^{0.97/1.00}. Таким чином, розроблений спосіб дозволяє використовувати саме ці чотири генотипи трьох поліморфних локусів - Lap-1, Lap-2 і Асп як генетичні маркери для добору рослин в природних або штучних деревостанах, що відрізняються підвищеною стійкістю до кореневої губки.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки

1. Allozyme analysis of host selection by bark beetles in central Mexico / C.F. Vargas, A. López, H. Sánchez, B. Rodríguez // Can. J. For. Res.-2002. -Vol. 32.-P. 24-30.
2. Пат. 15153 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G23/00. Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни крейдяної: Деклараційний патент на корисну модель. - І.І. Коршиков, О.А. Мудрик. - № 2005 12328; Заявл. 21.12.05; Опубл. 15.06.06. - Бюл. 6. - 8 с.
3. Пат. 15153 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G23/00. Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни крейдяної: Деклараційний патент на корисну модель. - Коршиков І.І., Мудрик О.А. - № 2005 12328; Заявл. 21.12.05; Опубл. 15.06.06. - Бюл. 6. - 8 с.
4. А. с. 1517859 СССР МКИ А 01 Н 1/4. Способ идентификации родительских и гибридных форм кукурузы / Крестников И.С., Ступа Л.Я. - 1989.
5. А. с. 1281216 СССР МКИ А 01 Н 1/4, А 01 G 23/00. Способ отбора семян хвойных растений / Духарев В.А., Животовский Л.А. - 1987 (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб генетичного маркування рослин сосни звичайної в природних та штучних насадженнях, що мають підвищену стійкість до кореневої губки, що містить електрофорез ізoferментів і визначення за алозимними локусами частот генотипів, котрі суттєво частіше зустрічаються у дерев, стійких до патогену, який **відрізняється** тим, що як генетичні маркери використовуються чотири генотипи - Lap-1^{0.97/1.00}, Lap-2^{1.00/1.05}, Lap-2^{0.95/1.00} і Асп^{0.97/1.00}.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601