



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79444** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01G 23/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 11330	(72) Винахідник(и): Коршиков Іван Іванович (UA), Калафат Любов Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.10.2012	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ, пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8	

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

(57) Реферат:

Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни Коха включає електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів. Як генетичні маркери дерев використовують гетерозиготні генотипи ізоферментних локусів глутаматдегідрогенази (Gdh), глутаматоксалоацетаттрансамінази (Got-2) і діафрази (Dia-1).

UA 79444 U

Корисна модель належить до лісництва, зокрема до способів отримання насіння з покращеними генетичними показниками для створення лісонасінневих плантацій сосни Коха.

У зв'язку зі зростаючими потребами виробничого використання цінних деревних порід і необхідності їх збереження та штучного відновлення набуває актуальності ефективна організація селекційного процесу для створення життєздатних насаджень з високопродуктивних рослин. Традиційні методи лісової селекції, що базуються на груповому та індивідуальному відборі кращих за продуктивністю рослин на основі фенотипічних (морфологічних) ознак, не запобігають попаданню у загальну сукупність селективних рослин, які продукують генетично послаблене (інбредне, гомозиготне) потомство. Інбредність потомства рослин, зокрема хвойних, виражається у погіршенні показників росту та маси проростків, їх стійкості та в цілому життєздатності, і зумовлена підвищеним рівнем гомозиготності. Через це згодом гомозиготне потомство у насадженнях відстає у рості, а з часом гине. Найбільш пристосованими та життєздатними виявляються гетерозиготні рослини, які мають підвищений адаптивний потенціал. Оскільки генетична якість потомства багато в чому залежить від генетичних якостей материнських дерев, зокрема, їх гетерозиготності, постає питання пошуку генетичних маркерів рослин, які можуть продукувати насіння з покращеними генетичними якостями (гетерозиготне). Виділення таких дерев і їх наступне використання дозволить мінімізувати вирощування в розсадниках мало життєздатних гомозиготних сіянців та їх передчасної загибелі при створенні штучних насаджень.

Використання ізоферментних локусів як генетичних маркерів у селекції рослин відомо з багатьох робіт генетиків-селекціонерів. Отже, розроблено спосіб ідентифікації батьківських та гібридних форм кукурудзи [А. с. 1517859 СРСР МКИ А01Н 1/4. Способ идентификации родительских и гибридных форм кукурузы / Крестников И.С., Ступа Л.Я.-1989], в якому використовують ізоферментний спектр супероксиддисмутази (СОД) пилку. Порівняльний аналіз отриманих електрофоретичним шляхом ізоферментних спектрів СОД рослин, що досліджуються, зі спектрами відомих ліній кукурудзи, дозволяє виявити чистоту або гібридизацію досліджуваної лінії.

Загальними ознаками рішення, що заявляється, і аналога є: спосіб визначення батьківських генотипів рослин для селекційного процесу, використовуючи як генетичні маркери ізоферментні локуси.

Однак запропонований аналог дозволяє прискорити та скорегувати селекційний процес шляхом визначення чистоти матеріалу сільськогосподарських культур, зокрема, однорічників. Для селекції багаторічних рослин та тварин важливо досліджувати генетичні особливості організмів, що передають свої корисні генетичні якості у потомстві. При селекції деревних рослин, до яких належать хвойні, внесок чоловічих генів (пилку) у створення потомства можливо контролювати тільки за цілеспрямованих схрещуваннях, тому що запліднення рослин, які заплілюються перехресно у природних популяціях і штучних насадженнях, є випадковою подією, що залежить від багатьох факторів. Тому при селекційному відборі рослин у деревостанах хвойних генетичні показники насінневого 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 СРСР МКИ А01Н 1/4, А01G 23/00. 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 спектра, 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 як генетичні маркери ізоферментні локуси.

Однак в описаному прототипі 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 поставлена задача розробки способу генетичного маркування у природних популяціях сосни Коха з Гірського Криму дерев, що продукують насіння з великою кількістю гетерозигот.

5 Поставлена задача вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев сосни Коха з великою кількістю гетерозиготного насіння, відповідно до корисної моделі, як генетичні маркери використовують ізоферментні локуси глутаматдегідрогенази (Gdh), глутаматоксалоацетаттрансамінази (Got-2) і діафрази (Dia-1).

Зазначені ознаки складають суть корисної моделі.

10 Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у наступному.

Пошук генетичних маркерів дерев сосни Коха, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали, використовуючи 12 поліморфних локусів, що кодують синтез ізоферментів 7 ген-ферментних систем: глутаматоксалоацетаттрансамінази (локуси Got-1, Got-2, Got-3), діафрази (Dia-1, Dia-4), глутаматдегідрогенази (Gdh), форміатдегідрогенази (Fdh), лейцинамінопептидази (Lap-1, Lap-2), кислі фосфатази (Acp), малатдегідрогенази (Mdh-2, Mdh-3).

20 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 6-7 випадково вибраних 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.

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

30 Технічний результат способу генетичного маркування дерев полягає в тому, що при створенні лісонасінневих плантацій використання насіння з дерев сосни Коха, що продукують велику кількість гетерозиготних зародків насіння за локусами Gdh, Got-2 і Dia-1, дозволить мінімізувати частку гомозиготних проростків.

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

Приклад 1.

35 Вивчали 149 дерев з п'яти природних популяції сосни Коха Гірського Криму. Загальна вибірка зародків насіння з цих дерев склала 1014.

За досліджуваними локусами на основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 50 генотипів материнських дерев (табл. 1).

Таблиця

Генотипи материнських рослин сосни Коха за 12 алозимними локусами, кількість гетерозиготних зародків насіння, що вони продукують, частка гетерозиготного насіння у популяціях

Локус	Генотипи материнських рослин	Кількість генотипів материнських рослин, шт.		Кількість гетерозиготних зародків насіння, шт.	Загальна кількість зародків насіння цього генотипу, шт.	Частка гетерозиготного насіння, %
		загальна	що має гетерозиготні зародки насіння			
1	2	3	4	5	6	7
Got-1	AB	1	1	3	7	42,86
	BB	148	13	31	1007	3,08
Got-2	AA	17	11	42	118	35,59
	AB	63	59	194	430	45,12
	BB	69	52	127	466	27,25
Got-3	AA	10	6	21	68	30,88
	AB	56	49	138	383	36,03
	BB	82	52	91	556	16,37

	BC	1	1	2	7	28,57
--	----	---	---	---	---	-------

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7
Gdh	AA	14	9	29	97	29,90
	AB	59	57	191	398	47,99
	BB	76	50	113	519	21,77
Fdh	AA	2	1	4	13	30,77
	AB	17	14	40	119	33,61
	BB	129	26	41	875	4,69
	BC	1	1	2	7	28,57
Lap-1	AB	7	6	12	48	25,00
	AC	1	1	3	7	42,86
	BB	93	23	50	631	7,92
	BC	41	35	79	280	28,21
	BD	3	3	15	20	75,00
	BH	1	1	2	7	28,57
Lap-2	CC	3	1	2	21	9,52
	AB	6	5	9	41	21,95
	BB	118	9	15	801	1,87
	BC	19	18	40	130	30,77
	BD	1	1	4	7	57,14
Dia-1	CC	5	1	2	35	5,71
	AA	71	46	94	485	19,38
	AB	63	55	181	430	42,09
	AF	3	3	7	20	35,00
	BB	10	7	21	65	32,31
Dia-4	BF	2	2	12	14	85,71
	AA	3	0	0	21	0,00
	AB	10	5	11	69	15,94
	BB	126	12	32	855	3,74
	BC	9	4	12	62	19,35
Mdh-2	CC	1	0	0	7	0,00
	AB	8	7	25	56	44,64
Mdh-3	BB	141	38	113	958	11,80
	AA	54	21	54	369	14,63
	AB	62	52	158	423	37,35
	AG	1	1	5	7	71,43
	BB	30	19	79	202	39,11
Acp	BG	2	1	3	13	23,08
	AB	11	8	14	76	18,42
	BB	70	24	58	477	12,16
	BC	62	45	106	421	25,18
	BD	1	1	1	7	14,29
	CC	5	2	6	33	18,18

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

Встановлено, що за більшістю досліджуваних нами 12 локусів переважна кількість генотипів дерев (48) формують гетерозиготне потомство.

- 5 Найбільшу кількість гетерозиготного насіння (85,71 %) дає дерево з генотипом Dia-1^{BF}, однак такі генотипи мають тільки два з 149 дерев, що досліджувались (табл.). Дуже мала кількість дерев з високим відсотком гетерозиготного насіння відмічено стосовно інших локусів: Lap-1 (3 дерева - 75 %), Mdh-3^{AG} (1 д.-71,43 %), Got-1^{AB} (1 д.-42,86 %), Lap-1^{AC} (1 д.-42,86 %), Lap-2^{BD} (1 д.-57,14 %). Більше дерев (8) знайдено для генотипу Mdh-2, що дають 44,64 % гетерозиготного насіння. Однак така кількість дерев - 5 % від загального їх числа з позицій популяційної генетики
- 10 замала для того, щоб цей генотип використовувати як маркерний. Практично такий же відсоток

гетерозиготного насіння, як по генотипу $Mdh-2^{AB}$, встановлено для генотипів $Dia-1^{AB}$ (42,09 % гетерозигот у насінні), $Got-2^A$ (45,12 %) і Gdh^{AB} (47,99 %). При цьому доля дерев з такими генотипами від загальної кількості дерев, що досліджувалась, становить: Gdh^{AB} -39,6 %, $Got-2^{AB}$ -42,3 % і $Dia-1^{AB}$ -42,3 %. Це найбільший відсоток дерев з такими генотипами в популяціях сосни Коха, що формують гетерозиготне насіння.

Таким чином, спосіб дозволяє використовувати ізоферментні локуси Gdh , $Got-2$ і $Dia-1$ і зокрема їх гетерозиготні генотипи Gdh^{AB} , $Got-2$ і $Dia-1$ у якості генетичних маркерів для відбору дерев у популяціях сосни Коха, що продукують велику кількість гетерозиготного насіння. Ці дерева потрібно маркувати в популяціях і в насадженнях, а їхнє насіння використовувати для створення лісонасінневих плантацій цього корисного лісогосподарського виду.

Джерела інформації:

1. А. с. 1517859 СРСР МКИ А01Н 1/4. Способ идентификации родительских и гибридных форм кукурузы / Крестников И.С., Ступа Л.Я.-1989.

2. А. с. 1281216 СРСР МКИ А01Н 1/4, А01G 23/00. Способ отбора сеянцев хвойных растений / Духарев В.А., Животовский Л.А.-1987 (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни Коха, що включає електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів, який **відрізняється** тим, що як генетичні маркери дерев використовують гетерозиготні генотипи ізоферментних локусів глутаматдегідрогенази (Gdh), глутаматоксалоацетаттрансамінази ($Got-2$) і діафрази ($Dia-1$).

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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