



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15153 (13) U
(51) МПК (2006)
A01H 1/04
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 КРЕЙДЯНОЇ

1

(21) u200512328
(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

2

(57) Спосіб генетичного маркування і відбору де-
рев з великою кількістю гетерозиготного насіння у
природних популяціях сосни крейдяної, який
включає електрофоретичне розділення ізоферме-
нтів і визначення генотипів за даними ізофермен-
тних локусів, який **відрізняється** тим, що як гене-
тичні маркери дерев використовують ізоферментні
локуси малатдегідрогенази Mdh-2 та Mdh-3 і глу-
таматдегідрогенази Gdh.

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

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 якість (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 И.С., Сту-
па Л.Я. 1989], в якому використовують ізофермен-
тний спектр супероксиддисмутази (СОД) пилку.
Порівняльний аналіз отриманих електрофоретич-
ним шляхом ізоферментних спектрів СОД рослин,
що досліджуються, зі спектрами відомих ліній ку-
курудзи, дозволяє виявити чистоту або гібридиза-
цію досліджуваної лінії.

Загальними ознаками рішення, що заявляєть-
ся, 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 цілесп-
рямованих схрещуваннях, тому що запліднення
рослин, які запилюються перехресне у природних
популяціях і штучних насадженнях, є випадковою

(19) UA (11) 15153 (13) U

подією, що залежить від багатьох факторів. Тому при селекційному відборі рослин у деревостанах хвойних генетичні показники наслідкового 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 крейдянської дерев, що продукують насіння з великою кількістю гетерозигот.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев сосни крейдянської з великою кількістю гетерозиготного насіння, відповідно до корисної моделі, у якості генетичних маркерів використовують ізоферментні локуси малатдегідрогенази Mdh-2 та Mdh-3 і глутаматдегідрогенази Gdh.

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 крейдянської, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали використовуючи 9 поліморфних локусів, що кодують синтез ізоферментів 6 ген-ферментних систем (глутаматоксалоацетаттрансамінази (локуси Got-2, Got-3), глутаматдегідрогенази (Gdh), супероксиддисмутази (Sod-4), кислої фосфатази (Acp), лейцинамінопептидази (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 6-7 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 локусами Mdh-2, Mdh-3 і Gdh, дозволить мінімізувати частку гомозиготних проростків.

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

Приклад 1.

Вивчали 48 дерев сосни крейдянської з природної популяції, розташованої на території національного природного парку "Святі Гори" у Донбасі. Загальна вибірка зародків насіння з цих дерев склала 416.

На основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 42 генотипи материнських дерев за зародків насіння 9 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 крейдяної за даними ізоферментних локусів.

Локус	Генотипи материнських рослин	Кількість генотипів материнських рослин, шт.		Загальна кількість гетерозиготних зародків насіння, ніг.	Частка гетерозиготного насіння, %
		Загальна	що має гетерозиготні зародки насіння		
1	2	3	4	5	6
Gdh	AA	1	0	0	0
	AB	18	18	50	42,4
	BB	28	21	33	18,1
	BG	1	1	3	50
Got-2	AA	6	22	65	33,9
	AB	26	45	151	41,9
	BB	16	17	45	24,5
Got-3	AA	2	2	10	76,9
	AB	10	10	34	36,9
	BB	25	7	10	6,2
	АН	5	5	29	61,7
	ВН	5	5	17	42,5
Sod-4	HH	1	1	7	100
	AA	46	0	0	0
Acp	AB	2	2	4	30,8
	AA	2	1	6	50
	AB	5	5	17	42,5
	BB	14	3	8	9,0
	BC	20	17	52	38,2
	CC	2	0	0	0
	BE	2	9	5	38,5
	CE	2	2	8	57,1
Lap-1	AC	1	0	0	0
	AB	3	3	5	26,3
	BB	37	2	3	1,2
	BC	5	2	4	12,5
	EE	1	0	0	0
	CE	1	1	5	83,34
Lap-2	BG	1	1	4	28,57
	AB	2	2	10	52,63
	BB	32	2	4	1,87
	BC	4	3	8	30,77
	CC	7	1	4	8,69
	BE	1	1	3	42,86
Mdh-2	CE	2	1	1	7,69
	AB	10	10	73	82,95
	BB	36	14	40	15,21
	AC	1	1	7	100
Mdh-3	BC	1	1	6	100
	AA	27	17	37	18,88
	AB	17	15	62	48,06
	BB	2	1	5	38,46
	BI	1	1	12	100
	AI	1	1	6	42,85

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

Встановлено, що за локусами Sod-4, Eap-1 і Lap-2 більшість дерев гомозиготні, причому переважають генотипи одного типу (Sod-4^{AA}, Lap-1^{BB}

і Lap-2). Лише окремі з цих дерев продукують гетерозиготне потомство, а гетерозиготних рослин за цими локусами відмічено не більше чоти-

рьох за кожним генотипом, а в цілому - 9-10 (таблиця 2) з 48, що вивчали.

За локусом Acp майже половина досліджуваних дерев були гетерозиготними за генотипом Acp^{BC} (див. таблиця 1) і більше половини - за сукупністю гетерозиготних генотипів (див. таблиця 2), але було встановлено низьку продуктив-

ність гетерозиготного насіння за всіма гетерозиготними генотипами цього локусу, на що вказує значення показника, який виражає співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до кількості гетерозиготних материнських дерев (див. таблиця 2).

Таблиця 2

Кількість гетерозиготних зародків насіння та їх співвідношення з гетерозиготними материнськими рослинами у популяції сосни крейдяної 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	19	1	86	4,5
Got-2	26	6/16	133	5,1
Got-3	20	2/1	107	5,4
Sod-4	2	0	4	2
Acp	30	2/2	96	3,2
Lap-1	10	1	21	2,1
Lap-2	9	7	30	3,3
Mdh-2	12	0	126	10,5
Mdh-3	19	2	122	6,4

Примітка. Через дріб наведена кількість альтернативних гомозиготних материнських рослин.

За локусами глутаматоксалоацетаттрансамінази Got-2 і Got-3 за сукупністю гетерозиготних материнських рослин встановлено велику кількість гетерозиготного насіння (див. таблиця 2), але за локусом Got-2 окрім домінуючого гетерозиготного генотипу Got-2^{AB} встановлено наявність значної кількості альтернативних гомозиготних рослин (6 і 16 дерев) (див. таблиця 1, 2). Ці дерева гомозиготні за різними алелями одного локусу, і можуть утворювати гетерозиготне потомство від перехресного запилення між собою. Тому локус Got-2 не можна розцінювати як маркерний для гетерозиготних дерев, що утворюють велику кількість гетерозиготного насіння.

За локусом Gdh показник, що виражає співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до кількості сукупної вибірки гетерозиготних материнських дерев, порівняно невеликий (див. таблиця 2), але за окремим гетерозиготним генотипом Gdh частка гетерозиготного насіння перевищує 40 % (див. таблиця 1). Тому цей локус можна використовувати для генетичного маркування гетерозиготних дерев з великою продуктивністю гетерозиготного насіння.

Не зважаючи на те, що за локусами малатдегідрогенази Mdh-2 і Mdh-3 у популяції сосни крей-

дяної за кількістю дерев переважали гомозиготні генотипи (див. табл. 1), невелика кількість гетерозиготних дерев продукували найбільшу з усіх генотипів рослин кількість гетерозиготного насіння (див. таблиця 2). При цьому найбільш продуктивними є гетерозиготні генотипи Mdh-3^{AB} (частка гетерозиготного насіння 48,06 %), і особливо - Mdh-2^{AB} (82,95 %) (див. таблиця 1).

Таким чином, спосіб дозволяє використовувати ізоферментні локуси Mdh-2, Mdh-3 і Gdh в якості генетичних маркерів для відбору гетерозиготних за цими локусами дерев у популяціях сосни крейдяної. Ці дерева, що продукують велику кількість гетерозиготного насіння, необхідно використовувати при створенні лісонасінневих плантацій сосни крейдяної.

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).