



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **16545** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A01H 01/04
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 ЯЛИЦІ БІЛОЇ

1

2

(21) u200601489

(22) 13.02.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Коршиков Іван Іванович, Пірко Надія Миколаївна

(73) ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння

у природних популяціях ялиці білої, який включає електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів, який **відрізняється** тим, що як генетичний маркер дерев використовують ізоферментні локуси глутаматоксалоацетаттрансамінази Got-3, алкогольдегідрогенази Adh-1 і кислій фосфатази Asp-1.

Корисна модель відноситься до лісництва, зокрема, до способів отримання насіння з покращеними генетичними показниками для створення лісонасінневих плантацій ялиці білої.

У зв'язку зі зростаючими потребами виробничого використання цінних деревних порід і необхідності їх збереження та штучного відтворення, набуває актуальності ефективна організація селекційного процесу створення насаджень потенційно життєздатних і продуктивних 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 сукупність селективних рослин дерев, які продукують генетичне 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 з згодом гомозиготне потомство у насадженнях гине, а найбільш пристосованими та життєздатними виявляються гетерозиготні рослини, які мають підвищений адаптивний потенціал. Оскільки генетична якість потомства залежить від генетичних якостей материнських дерев, зокрема, їх гетерозиготності, постає питання пошуку генетичних маркерів рослин, які продукують насіння з покращеними генетичними якостями

(гетерозиготне), що дозволить мінімізувати загибель нежиттєздатних сіянців при створенні штучних насаджень.

Використання ізоферментних локусів у якості генетичних маркерів у селекції рослин відомо з багатьох робіт генетиків-селекціонерів. Отже, розроблено спосіб ідентифікації батьківських та гібридних форм кукурудзи [А. с. 1517859 СССР МКИ А 01 Н 1/4. Спосіб ідентифікації родительських і гібридних форм кукурудзи / Крестинков І.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 аналогу є: спосіб визначення батьківських генотипів рослин для селекційного процесу, використовуючи в якості генетичних маркерів ізоферментні локуси.

Однак, запропонований спосіб 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

(19) **UA** (11) **16545** (13) **U**

деревних рослин, до яких належать хвойні, внесок чоловічих генів (пилку) у створення потомства можливо контролювати тільки за цілеспрямованих 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 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 А 01 Н 1/4, А 01 G 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 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 аналізувалися лише сіянці, з яких до створення штучних насаджень рекомендовано використовувати окремі, що мають найбільшу генетичну різноманітність. Але для створення лісонасіннєвих 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 ялиці білої дерев, що продукують насіння з великою кількістю гетерозигот.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев ялиці білої з великою кількістю гетерозиготного насіння, відповідно до корисної моделі, у якості генетичних маркерів використовують ізоферментні локуси

глутаматоксалоацетаттрансамінази Got-3, алкогольдегідрогенази Adh-1 і кислій фосфатази Asp-1.

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 ялиці білої, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали використовуючи 10 ізоферментних локусів, що кодує синтез ізоферментів 4 ген-ферментних систем (глутаматоксалоацетаттрансамінази (локуси Got-1, Got-2, Got-3), алкогольдегідрогенази (Adh-1, Adh-2), естерази (Est-1, Est-2, Est-4), кислій фосфатази (Asp-1, Asp-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 5 випадково обраних насінин із різних шишок. Електрофорез ізоферментів ендоспермів та зародків насіння проводили одночасно на сусідніх доріжках у поліакріламідному 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 ялиці білої, за якими кількість гетерозиготного потомства найбільша.

Технічний результат способу генетичного маркування дерев полягає в тому, що при створенні лісонасіннєвих плантацій ялиці білої використання насіння з дерев, що продукують велику кількість гетерозиготних зародків насіння за локусами Got-3, Adh-1 і Asp-1 дозволить мінімізувати частку гомозиготних проростків.

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

Приклад 1.

Вивчали 146 дерев ялиці білої з 4 природних популяцій в Українських Карпатах (Самбірська, Бредулецька, Говерляньська, Делятинська). Загальна вибірка зародків насіння з цих дерев склала 725.

На основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 51 генотип материнських дерев та зародків насіння 10 ізоферментних локусів (Табл.1).

Таблиця 1

Кількість гомо- та гетерозиготних материнських рослин та кількість гетерозиготних зародків насіння, що вони продукують, частка гетерозиготного насіння у популяції ялиці білої 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		
Got-1	BB	143	7	10	28,57
	AB	2	2	8	80
	BC	1	1	2	40
Got-2	BB	135	1	2	40
	BE	10	8	20	50
	BC	1	0	0	-
Got-3	BB	105	38	70	36,84
	AB	33	28	57	40,71
	BC	5	5	15	60
	BH	1	1	3	60
	CH	1	1	5	100
	AA	1	1	5	100
Adh-1	BB	95	29	50	34,48
	AB	46	46	127	55,22
	AA	5	4	11	27,50
Adh-2	AA	60	37	71	38,88
	AB	51	45	100	44,44
	BB	12	11	30	54,55
	AD	15	15	41	54,67
	DD	3	3	8	53,33
	AG	2	2	7	70
	DB	3	3	9	60
Est-1	BB	146	2	2	20
Est-2	CC	82	32	72	45
	AC	45	39	89	45,64
	BC	8	8	25	62,50
	AB	1	1	2	40
	CF	3	3	9	60
	BB	5	2	4	40
	FF	1	1	4	80
	AA	1	1	1	20
Est-4	BB	77	30	45	30
	AA	5	2	2	20
	BC	5	4	6	30
	CC	3	0	0	0
	BE	12	11	18	32,73
	AB	41	37	68	36,76
	EE	1	1	3	60
	AC	1	1	2	40
	BD	1	1	2	40
Acp-1	BB	115	28	49	35
	BE	11	11	24	43,64
	AB	17	17	41	48,24
	AA	3	1	3	60
Acp-3	BB	43	26	52	40
	AA	13	12	27	45
	CC	8	5	4	16
	AB	40	36	76	42,22
	BC	26	24	45	37,5
	AK	1	1	3	60
	AC	15	14	39	55,71

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

Встановлено, за всіма досліджуваними локусами, крім Acp-3, більшість генотипів материнських дерев гомозиготні, і частка гетерозиготного насіння, що вони продукують,

нижча, ніж у менших за кількістю вибірок дерев, гетерозиготних за цими локусами (див. Табл.1).

За виключенням локусів Got-1, Got-2 і Est-1, за всіма іншими ізоферментними локусами материнські дерева продукували велику кількість гетерозиготного насіння (Табл.2). Показник, що виражає співвідношення кількості гетерозиготних

зародків насіння до кількості гетерозиготних материнських дерев, за локусом Got-1 також був великий, але з загальної кількості досліджуваних дерев 146 лише гетерозиготними були лише 3 (див. Табл.2).

За локусом Est-4 кількість сформованого гетерозиготного насіння більша, ніж за локусами

Got-1, Got-2 і Est-1, але в цілому показник, що виражає співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до кількості гетерозиготних материнських дерев, за локусом Est-4 невеликий порівняно з іншими (див. Табл.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		
Got-1	3	0	20	6,67
Got-2	11	0	22	2
Got-3	40	1	155	3,88
Adh-1	46	5	188	4,09
Adh-2	71	12/3	266	3,75
Est-1	0	0	2	0
Est-2	57	5/1/1	206	3,61
Est-4	60	3/1/5	146	2,43
Acp-1	28	3	117	4,18
Acp-3	82	8/13	246	3,0

Примітка. Через дріб наведена кількість альтернативних гомозиготних материнських рослин.

Найбільшу кількість гетерозиготних материнських дерев та гетерозиготних зародків насіння, що вони продукують, встановлено за локусами Adh-2, Acp-3, а також Est-2 (див. Табл.2). Однак за цими локусами, окрім переважної кількості найбільш розповсюджених гомозиготних генотипів, також у достатній кількості зустрічаються альтернативні, що змогло обумовити наявність великої кількості гетерозиготного насіння у

досліджуваних популяціях (за рахунок перехресного запилення альтернативних гомозигот). Тому гетерозиготне насіння ялиці білої за цими локусами могло утворитися не неопосередковано від гетерозиготних материнських дерев, і локуси Adh-2, Acp-3 і Est-2 недоцільно розглядати як маркерні для дерев, що утворюють велику кількість гетерозиготного насіння досліджуваного виду.

За ізоферментними локусами Got-3, Adh-1 і Acp-1 гетерозиготні дерева ялиці білої продукують

велику кількість гетерозиготного насіння, і показник, що виражає співвідношення кількості гетерозиготних зародків насіння до кількості гетерозиготних материнських дерев, великий. До того ж альтернативні гомозиготні за цими локусами дерева у досліджуваних популяціях ялиці білої зустрічаються у незначній кількості (див. Табл.2).

Таким чином, спосіб дозволяє використовувати ізоферментні локуси Got-3, Adh-1 і Acp-1 в якості генетичних маркерів для відбору гетерозиготних за цими локусами дерев у популяціях ялиці білої. Ці дерева, що продукують велику кількість гетерозиготного насіння, необхідно використовувати при створенні лісонасінневих плантацій ялиці білої.

Джерела інформації, які використані при складанні заявки

1. А. с. 1517859 СССР МКИ А 01 Н 1/4. Способ идентификации родительских и гибридных форм кукурузы / Крестников И.С., Ступа Л.Я. - 1989.

2. А. с. 1281216 СССР МКИ А 01 Н 1/4, А 01 G 23/00. Способ отбора сеянцев хвойных растений / Духарев В.А., Животовский Л.А. - 1987 (прототип).