



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71574** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01G 23/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 08427	(72) Винахідник(и): Коршиков Іван Іванович (UA), Демкович Андрій Євгенович (UA)
(22) Дата подання заявки: 04.07.2011	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ, пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2012, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО ВІДБОРУ СЕРЕД ПЛЮСОВИХ ДЕРЕВ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ГЕНОТИПУ З ВЕЛИКОЮ КІЛЬКІСТЮ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО ПОТОМСТВА

(57) Реферат:

Спосіб генетичного відбору серед плюсових дерев сосни звичайної генотипу з великою кількістю гетерозиготного потомства включає добір в сімейних випробувальних культурах, виділення ДНК, ампліфікацію мікросателітних локусів Pttx2146 та Spac 11.8 і наступне електрофоретичне розділення ампліконів і визначення генотипів. Як генетичні маркери має алелі 9; 18 за локусом Spac 11.8 та 8; 11 за локусом Pttx2146.

UA 71574 U

Корисна модель належить до лісівництва, зокрема, до селекційного добору генотипів плюсових дерев сосни звичайної з покращеними генетичними показниками насінневого потомства для створення лісо-насінневих плантацій.

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 цю сукупність рослин, які продукують генетично послаблене (інбредне, гомозиготне) потомство. Виникнення такого насінневого потомства пов'язано з переважним самозапиленням окремої рослини. Інбредність потомства рослин, зокрема хвойних, виражається у погіршенні показників росту молодих рослин, та в цілому їх життєздатності, і зумовлена підвищеним рівнем гомозиготності, як наслідок самозапилення. Через це згодом гомозиготне потомство у насадженнях може значно відставати в рості. Добре відомо, що найбільш пристосованими та життєздатними виявляються гетерозиготні рослини, які мають підвищений адаптивний потенціал.

Запліднення яйцеклітини рослин, що запилюються своїм пилом або перехресно у природних популяціях і штучних насадженнях, є випадковою подією, що залежить від багатьох факторів, в тому числі і від генетичних особливостей конкретної рослини. Тому при селекційному доборі рослин у деревостанах хвойних генетичні показники насінневого потомства можна прогнозувати лише стосовно материнських рослин. Оскільки генетична якість потомства багато в чому залежить від генетичних якостей материнських дерев, постає питання пошуку генетичних маркерів тих рослин, що дають потомство з покращеними генетичними якостями (гетерозиготне). Застосування такого насіння дозволить мінімізувати появу маложиттєздатних сіянців вже на ранніх етапах онтогенезу рослин в практиці лісорозведення. Використання молекулярно-генетичних маркерів у селекції рослин відомо з багатьох робіт генетиків-селекціонерів. Для ряду видів хвойних винайдені ізоферментні маркерні локуси [1]. Застосування мікросателітних маркерів пропонується для селекції сосни ладанної [2]. Загальними ознаками рішення, що заявляється, і аналога є: спосіб визначення материнських генотипів плюсових дерев сосни звичайної для наступного селекційного процесу, з використанням певних молекулярно-генетичних маркерів.

Як прототип вибрано спосіб добору життєздатних, потенційно високопродуктивних рослин хвойних шляхом визначення їх генетичної різноманітності на прикладі сосни звичайної [3], 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 гомогенність даної ділянки.

Загальними ознаками рішення, що заявляється, і прототипу є: спосіб селекційного добору окремих рослин сосни звичайної, що характеризуються кращими генетичними показниками насінневого потомства, використовуючи при цьому молекулярно-генетичні маркери.

Однак, в описаному в прототипі способі аналізували тільки сіянці, з яких до створення штучних насаджень рекомендовано використовувати окремі з них, що мають найбільшу генетичну різноманітність на основі ізоферментних локусів, а інші сіянці вибраковували. Це не зовсім раціонально, так як призводить до втрати частки сіянців, на вирощування яких витрачено час і матеріальні ресурси. Значно ефективніше і надійніше для створення лісо-насінневих плантацій хвойних проводити пошук таких дерев та генетичних маркерів (наприклад мікросателітних локусів), за якими можливо відбирати рослини, що продукують насіння з покращеними генетичними якостями (гетерозиготне). При доборі таких дерев їхнє насіння і відповідно сіянці мають бути у повному обсязі використані для лісорозведення.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки способу добору за мікросателітними локусами ДНК серед плюсових рослин сосни звичайної тих дерев, що продукують високо-гетерозиготне потомство.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі генетичного добору серед плюсових дерев сосни звичайної тих, що продукують високо-гетерозиготне потомство, відповідно до корисної моделі, у якості генетичних маркерів використовують мікросателітні локуси Spac 11.8 та Pttx2146.

Зазначені ознаки складають суть корисної моделі.

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

Пошук серед плюсових дерев сосни звичайної тих, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, і їх генетичне маркування здійснювали за двома мікросателітними локусами Spac 11.8 та Pttx2146.

Генотипи 25 плюсових дерев визначали таким шляхом: виділену з вегетативних тканин (хвоя) рослин ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції і отримані амплікони розділяли в поліакриламідному гелі. Електрофорез ампліконів за одним локусом проводили одночасно на сусідніх доріжках гелю. Отримані спектри двох мікросателітних локусів використовували у визначенні генотипів плюсових дерев. Такі ж самі дослідження було проведено стосовно дослідних культур кожного дерева (не менше 10 для кожного дерева). На основі отриманих даних розраховували гетерозиготність потомства кожного дерева.

Технічна задача корисної моделі - на основі порівняльного аналізу виділити генотипи плюсових дерев, що мають найбільшу гетерозиготність потомства.

Технічний результат способу генетичного добору плюсових дерев сосни звичайної з високою гетерозиготністю насінневого потомства полягає в тому, що при створенні лісо-насінневих плантацій плюсових дерев потрібно використовувати насіння дерев, що мають генотип 9; 18 за локусом Spac 11.8 та 8; 11 за локусом Pttx2146, що дозволить значно мінімізувати частку гомозиготних проростків.

Нижче наводиться опис способу генетичного добору за мікросателітними локусами ДНК плюсових дерев сосни звичайної з великою кількістю гетерозиготного потомства, і приклад його конкретної реалізації.

Приклад 1.

На основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено генотипи плюсових дерев та їх насінневого потомства в випробувальних культурах за двома мікросателітними локусами і розраховані показники гетерозиготності потомства (табл.).

Встановлено, що плюсові дерева з генотипом генотип 9; 18 за локусом Spac 11.8 та 8; 11 за локусом Pttx2146 продукують насіннєве потомство, гетерозиготність якого на 44% більша, ніж в середньому в проаналізованій вибірці плюсових дерев.

Таким чином, розроблений спосіб дозволяє використовувати вищенаведений генотип за мікросателітними локусами Spac 11.8 та Pttx2146 в якості генетичного маркера для добору серед плюсових дерев сосни звичайної таких генотипів, що продукують підвищену частку високо-гетерозиготного насінневого потомства. Саме генотипи 9; 18 за локусом Spac 11.8 та 8; 11 за локусом Pttx2146 плюсових дерев слід використовувати при створенні поліпшених лісо-насінневих плантацій сосни звичайної.

Таблиця

Генотипи материнських рослин і гетерозиготність їхнього насінневого потомства за двома мікросателітними локусами

Генотип материнської рослини		Гетерозиготність нащадків за локусом			Перевищення середньої гетерозиготності у нащадків, %
Pttx2146	Spac 11.8	Pttx2146	Spac 11.8	середня	
5;8	9;16	0,571	0,375	0,473	-20,6
3;8	21;21	0,667	0,667	0,667	11,8
5;8	18;18	0,659	0,452	0,556	-6,8
5;8	16;16	0,778	0,000	0,389	-34,8
3;8	16;23	0,625	0,500	0,563	-5,7
5;8	17;17	0,714	0,571	0,643	7,8
8;11	17;17	0,818	0,182	0,500	-16,1
8;11	9;18	0,833	0,889	0,861	44,4
8;8	17;22	0,875	0,556	0,715	20,0
В середньому		0,727	0,466	0,596	-

Примітка. Цифрами умовно позначено гени. Гомозиготні рослини позначено однаковими цифрами, гетерозиготні - різними.

Джерела інформації:

1. Пат. 15153 А UA, МПК А01Н 01/04, А01G 23/00. 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. - № 200512328; Заявл. 21.12.05; Опубл. 15.06.06. - Бюл. 6. - 8 с.

2. U. S. Patent 6,733,965. Microsatellite DNA markers and uses thereof. Echt C. S., Nelson C. D.

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10 Спосіб генетичного відбору серед плюсових дерев сосни звичайної генотипу з великою кількістю гетерозиготного потомства, що включає добір в сімейних випробувальних культурах, виділення ДНК, ампліфікацію мікросателітних локусів Pttx2146 та Spac 11.8 і наступне електрофоретичне розділення ампліконів і визначення генотипів, який **відрізняється** тим, що як генетичні маркери має алелі 9; 18 за локусом Spac 11.8 та 8; 11 за локусом Pttx2146.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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