



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81558** (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 12909	(72) Винахідник(и): Коршиков Іван Іванович (UA), Калафат Любов Олександрівна (UA), Демкович Андрій Євгенович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2013	(73) Власник(и): ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАН УКРАЇНИ, пр. Ілліча, 110, м. Донецьк, 83059 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2013, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ГЕНЕТИЧНОГО МАРКУВАННЯ І ВІДБОРУ ДЕРЕВ З ПІДВИЩЕНОЮ ГЕТЕРОЗИГОТНІСТЮ НАСІННЯ У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ СОСНИ СТАНКЕВИЧА

(57) Реферат:

Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з підвищеним рівнем гетерозиготності їхнього насіння у природних популяціях сосни Станкевича включає електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів. Як генетичні маркери дерев використовують гетерозиготні генотипи ізоферментного локусу лейцинамінопептидази (Lap-1).

UA 81558 U

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

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, або вирубується при санітарних заходах. 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 СССР МКИ А 01 Н 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 аналогу є: спосіб визначення батьківських генотипів рослин для селекційного процесу, використовуючи в якості генетичних маркерів 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 насіннєвого потомства можливо прогнозувати лише у відношенні материнських рослин. Відомо, що генетичні особливості дорослих рослин обумовлюють генетичну якість насіння.

Як найближчий аналог 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 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 в якості генетичних маркерів ізоферментні локуси.

Однак, в описаному найближчому аналогу 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 Станкевича з Гірського Криму, дерев, що продукують насіння з підвищеною кількістю гетерозигот.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев сосни Станкевича з підвищеною кількістю гетерозиготного насіння, згідно з корисною моделлю, як генетичні маркери використовують ізоферментний локус лейцинамінопептидази (Lap-1).

Зазначені ознаки складають суть корисної моделі.

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

Пошук генетичних маркерів дерев сосни Станкевича, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали, використовуючи 12 поліморфних локусів, що кодують синтез ізоферментів 8 ген-ферментних систем: глутаматоксалоацетаттрансамінази (локуси Got-1, Got-2, Got-3), діафрази (Dia-1), глутаматдегідрогенази (Gdh), форміатдегідрогенази (Fdh), лейцинамінопептидази (Lap-1), кислої фосфатази (Asp), малатдегідрогенази (Mdh-2, Mdh-3) і супероксиддисмутази (Sod-1 і Sod-4).

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 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 (зародків).

Технічна задача корисної моделі - на основі порівняльного аналізу кількості гетерозиготних дерев сосни Станкевича і зародків їх насіння встановити маркерні ізоферментні локуси материнських рослин, які вказують на найвищий середній рівень гетерозиготності потомства, за 12 локусами, що досліджувались.

Технічний результат способу генетичного маркування дерев за локусом Lap-I полягає в тому, що при створенні лісонасіннєвих плантацій з використанням насіння дерев сосни Станкевича, що продукують підвищену кількість гетерозиготних зародків насіння в середньому за 12 локусами дозволить мінімізувати частку гомозиготних проростків.

Нижче наводиться описання способу генетичного маркування дерев за локусом Lap-I сосни Станкевича з підвищеною кількістю гетерозиготного насіння у природній популяції, і приклад його конкретної реалізації.

Приклад 1

Вивчали 51 дерево з трьох природних популяції сосни Станкевича в районі м. Новий Світ Гірського Криму. Загальна вибірка зародків насіння, що аналізувались, у цих дерев склала 300.

За досліджуваними 12 локусами на основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 32 генотипів материнських дерев (табл. 1).

Таблиця 1

Генотипи материнських рослин сосни Станкевича 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	4	2	6	22	27,3
	BB	47	1	1	278	0,4
Got-2	AA	7	7	20	42	47,6
	AB	32	31	93	187	49,7
	BB	12	10	26	71	36,6
Got-3	BB	51	3	3	300	1,0

Продовження таблиці 1

Gdh	AA	1	1	3	6	50,0
	AB	20	19	47	118	39,8
	BB	30	18	33	176	18,8
Fdh	AB	7	6	20	41	48,8
	BB	44	15	27	259	10,4
Lap-1	BB	34	7	9	201	4,5
	BC	11	8	13	63	20,6
	AB	5	5	9	30	30,0
	CC	1	0	0	6	0,0
Dia-1	AA	46	5	7	270	2,6
	AB	2	2	2	12	16,7
	AD	2	2	2	12	16,7
Mdh-2	BB	2	1	1	12	8,3
	BC	23	21	72	136	52,9
	CC	26	12	43	152	28,3
Mdh-3	AA	2	2	2	12	16,7
	AB	23	22	46	134	34,3
	BB	26	16	34	154	22,1
Acp	AB	15	13	25	90	27,8
	BB	20	3	3	118	2,5
	BC	14	9	14	80	17,5
	CC	2	0	0	12	0,0
Sod-1	AA	16	10	27	93	29,0
	AB	27	26	64	159	40,3
	BB	8	8	26	48	54,2
Sod-4	AA	51	0	0	300	0,0

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

- Найбільшу кількість гетерозиготного насіння (54,2 %) за локусом Sod-1 дають вісім дерев з генотипом Sod-1^{BB} (табл. 1). Майже на цьому рівні (52,9 %) продукують гетерозиготне потомство за локусом Mdh-2 двадцять одне дерево, які мають генотип Mdh-2^{BC}. Підвищений рівень виходу гетерозиготного насіння відмічений і за іншими генотипами: Got-2^{AA} (47,6 %), Got-2^{AB} (49,7 %), Got-2^{BB} (36,6 %), Gdh^{AB} (39,8 %), Fdh^{AB} (48,8 %), Lap-1^{AB} (30,0 %), Mdh-2^{CC} (28,3 %), Mdh-3^{AB} (34,3 %), Acp^{AB} (27,8 %), Sod-1^{AB} (40,3 %). Однак підвищена гетерозиготність насіння відмічена за цими окремими локусами, а нам важливо, щоб була підвищеною середня гетерозиготність з врахуванням всіх 12 локусів, що досліджувались. Тому для вище визначених потенційно маркерних генотипів була розрахована середня наявна гетерозиготність за 12 локусами (табл. 2). Як свідчать розрахунки по шести потенційно маркерним генотипам (Got-2^{AA}, Mdh-3^{AB}, Sod-1^{AB}, Sod-1, Gdh^{AB}, Mdh-2^{CC}) гетерозиготність зародків за 12 локусами була меншою, ніж середня гетерозиготність по всій вибірці (300) зародків насіння. Тобто ці генотипи не можуть бути маркерними. Найбільший середній рівень гетерозиготності зародків за 12 локусами встановлений за маркерним генотипом Lap-1^{AB}. Середня гетерозиготність зародків насіння дерев з цим генотипом Lap-1^{AB} перевищувала середню гетерозиготність зародків насіння всіх дерев, що досліджувались, на 20,6 %. Тому саме генотип Lap-1^{AB} слід використовувати як маркерний для визначення в популяціях сосни Станкевича дерев, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю. Відсоток таких дерев в природних популяціях сосни Станкевича невисокий: всього 10 %.

Таблиця 2

Середня наявна гетерозиготність зародків насіння
селекційно-перспективних генотипів материнських дерев за 12 алозимними локусами

Середня гетерозиготність загальної вибірки зародків	Got- 2 ^{AA}	Got- 2 ^{AB}	Fdh ^{AB}	Mdh- 2 ^{BC}	Mdh- 3 ^{AB}	Sod- 1 ^{AB}	Sod- 1 ^{BB}	Gdh ^{AB}	Lap- 1 ^{AB}	Mdh- 2 ^{CC}	Acp ^{AB}
0,194	0,165	0,208	0,213	0,205	0,193	0,182	0,190	0,191	0,232	0,174	0,194
Кількість материнських рослин	7	32	7	23	23	27	8	20	5	26	15

Таким чином дерева з генотипом Lap-1^{AB} потрібно застосовувати в першу чергу для створення лісонасінневих плантацій сосни Станкевича, щоб отримувати генетично поліпшене насіння з підвищеною гетерозиготністю.

Джерела інформації:

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 (найближчий аналог).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з підвищеним рівнем гетерозиготності їхнього насіння у природних популяціях сосни Станкевича, що включає електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів, який **відрізняється** тим, що як генетичні маркери дерев використовують гетерозиготні генотипи ізоферментного локусу лейцинамінопептидази (Lap-1).

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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