УКРАЇНА

(19) UA (11) 65366 (13) U

(51) МПК (2011.01)
A01H 1/00
A01G 23/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

ОПИС
ДО 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 КЕДРОВОЇ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ

(21) u201103037
(22) 15.03.2011
(24) 12.12.2011
(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.
(73) ДОНЕЦЬКИЙ БОТАНІЧНИЙ САД НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
(57) Спосіб генетичного маркування і відбору дерев з великою кількістю гетерозиготного насіння у природних популяціях сосни кедрової європейської, який містить електрофоретичне розділення ізоферментів і визначення генотипів за даними ізоферментних локусів, який **відрізняється** тим, що як генетичні маркери дерев використовують ізоферментні локуси алкогольдегідрогенази Adh-1 і фосфоглюкомутази Pgm-1.

Корисна модель належить до лісництва, зокрема до способів отримання насіння з покращеними генетичними показниками для створення лісонасіннєвих плантацій сосни кедрової європейської.

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 генетично послаблене (інбредне, гомозиготне) потомство. Інбредність потомства рослин, зокрема хвойних, визначається у погіршенні показників росту та маси проростків, їх стійкості та в цілому життєздатності, і зумовлена підвищеним рівнем гомозиготності. Через це з часом 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 як генетичних маркерів у селекції рослин відомо з багатьох робіт генетиків-селекціонерів. Отже, розроблено спосіб ідентифікації батьківських та гібридних форм кукурудзи, в якому використовують ізоферментний спектр супероксиддисмутази (СОД) пилку [1]. 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 корисної моделі, що заявляється, і аналогу є: спосіб визначення батьківських генотипів рослин для селекційного процесу, використовуючи як генетичні маркери 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 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 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 ма-

(19) UA (11) 65366 (13) U

теринських 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, в якому аналізують 3 ізоферментні локуси неспецифічних естераз хвої сіянців [2]. 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 корисної моделі, що заявляється, і найближчого аналогу є спосіб селекційного відбору рослин хвойних, що характеризуються кращими генетичними показниками, використовуючи як генетичні маркери 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 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 поставлено задачу розробити спосіб генетичного маркування у природних популяціях сосни кедрової європейської дерев, що продукують насіння з великою кількістю гетерозигот.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі генетичного маркування дерев сосни кедрової європейської з великою кількістю гетерозиготного насіння, відповідно до корисної моделі, як генетичний маркер використовують ізоферментні локуси алкогольдегідрогенази Adh-1 і фосфоглюкомутази Pgm-1.

Пошук генетичних маркерів дерев сосни кедрової європейської, що продукують насіння з підвищеною гетерозиготністю, здійснювали використовуючи 6 поліморфних локусів, що кодують синтез ізоферментів 5 ген-ферментних систем: алкогольдегідрогенази (локус Adh-1), форміатдегідрогенази (Fdh), глутаматдегідрогенази (Gdh), малатдегідрогенази (Mdh-2, Mdh-4), фосфоглюкомутази (Pgm-1).

Генотипи материнських дерев визначають шляхом електрофоретичного розділення ізоферментів тканин гаплоїдних мегагаметофітів (ендоспермів) насіння, генотипи потомства - диплоїдних тканин зародків насіння. Для встановлення генотипу кожного дерева аналізували 8 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 крохмальному гелі. Отримані ізоферментні спектри використовували у визначенні генотипів дерев та їх потомства.

Вирішення технічної задачі корисної моделі полягає у тому, що на основі порівняльного аналізу кількості гетерозиготних дерев і зародків їх насіння встановлюють ізоферментні локуси материнських рослин, за якими визначають кількість гетерозиготного потомства.

Технічний результат способу генетичного маркування дерев полягає у тому, що при створенні лісонасіннєвих плантацій сосни кедрової європейської використовують насіння з дерев, що продукують велику кількість гетерозиготних зародків за локусами Adh-1 і Pgm-1, що дозволяє мінімізувати частку гомозиготних проростків.

Приклад реалізації запропонованого способу.

Приклад 1

Вивчали 51 дерево з двох природних популяції сосни кедрової європейської в Українських Карпатах: популяція Яйко (27 дерев) та популяція Горгани (24 дерева). Сукупна вибірка зародків насіння з цих дерев склала 411.

За досліджуваними локусами на основі аналізу електрофоретичних спектрів встановлено 17 генотипів материнських дерев (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість гомо- та гетерозиготних материнських рослин та кількість гетерозиготних зародків насіння, що вони продукують, частка гетерозиготного насіння у популяції сосни кедрової європейської 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		
Adh-1	AB	9	9	37	51,4
	BB	30	24	52	24,8
	BC	2	2	6	37,5
	BD	9	9	39	54,2
	CD	1	1	3	37,5

Продовження таблиці 1

Локус	Генотипи материнських рослин	Кількість генотипів материнських рослин, шт.		Загальна кількість гетерозиготних зародків насіння, шт.	Частка гетерозиготного насіння, %
		Загальна	що має гетерозиготні зародки насіння		
Fdh	AA	49	13	16	4,1
	AB	2	2	8	50,0
Gdh	AA	49	3	3	0,8
	AB	2	2	9	56,3
Mdh-2	AB	5	5	14	35,0
	BB	46	5	11	2,9
Mdh-4	AA	7	7	24	42,9
	AB	22	22	89	50,6
	BB	22	22	51	28,9
Pgm-1	AB	10	10	37	46,3
	BB	38	17	20	6,6
	BC	3	3	11	45,8

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

Встановлено, що за більшістю досліджуваних нами локусів (Adh-1, Fdh, Gdh, Mdh-2 і Pgm-1) переважна кількість генотипів дерев гомозиготні, і не всі вони формують гетерозиготне потомство. Цим зумовлена в цілому невелика частка гетерозиготного насіння, що продукують гомозиготні дерева в популяціях сосни кедрової європейської. Усі гетерозиготні рослини продукують гетерозиготне потомство, тому його частка у гетерозиготних дерев більша, ніж у гомозиготних. Слід зазначити, що серед усіх гетерозиготних рослин дерева з генотипом Mdh-4^{AB} продукують переважну частку гетерозиготного потомства (див. табл. 1). Крім того, дерева з цим генотипом були найбільш чисельними (22 дерево з загальної кількості 51) у порівнянні з гетерозиготними рослинами за іншими локусами (див. табл. 1, табл. 2). Але окрім гетерозиготних генотипів дерев за локусом Mdh-4 у популяціях сосни кедрової європейської встановлено наявність у значній кількості альтернативних гомозиготних рослин (22 і 7 дерев відповідно з генотипами Mdh-4^{BB} і Mdh-4^{AA}) (див. табл. 1, 2), тобто дерев, гомозиготних за різними алелями цього локусу. Тому гетерозиготне потомство за локусом Mdh-4 могло утворитися не безпосередньо від гетерозиготних материнських дерев, а від перехресного запилення альтернативних гомозиготних рослин. Через це ізоферментний локус Mdh-4 не доцільно використовувати в якості маркерного для відбору дерев при створенні лісонасіннєвих плантацій сосни кедрової європейської.

Таблиця 2

Кількість гетерозиготних зародків насіння та їх співвідношення з гетерозиготними материнськими рослинами у популяції сосни кедрової європейської 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		
Adh-1	21	0	137	6,5
Fdh	2	0	24	12
Gdh	2	0	12	6
Mdh-2	5	0	25	5
Mdh-4	22	22/7	164	7
Pgm-1	13	0	68	5,2

Примітка. Через дріб наведено кількість альтернативних гомозиготних материнських рослин.

Велику кількість гетерозиготних дерев (21) встановлено також за локусом Adh-1 (див. табл. 2). Але на відміну від локусу Mdh-4, вони представлені не одним генотипом, а чотирма: Adh-1^{AB}, Adh-1^{BC}, Adh-1^{BD} і Adh-1^{CD} (див. табл. 1). Серед них дерева з генотипами Adh-1^{AB} і Adh-1^{BD} присутні у більшості та частка гетерозиготного насіння, що вони продукують, перевищувала 50 %. Подібну картину відмічено і для локусу Pgm-1. Гетерозиготних дерев з генотипом Pgm-1^{AB} достатня кількість і вони формують 46,3 % гетерозиготного насіння (див. табл. 1, 2). Локуси Adh-1 і Pgm-1 можна використовувати як маркери при відборі дерев сосни кедрової європейської, що продукують гетерозиготне потомство. Насіння гетерозиготних дерев з генотипами Adh-1^{AB}, Adh-1^{BD} і Pgm-1^{AB} дозволить

мінімізувати частку гомозиготних проростків у штучних насадженнях.

Таким чином, спосіб дозволяє використовувати ізоферментні локуси Adh-1 і Pgm-1 як генетичний маркер для відбору гетерозиготних за ними дерев у популяціях сосни кедрової європейської. Ці дерева, що продукують велику кількість гетерозиготного насіння, необхідно використовувати при створенні лісонасіннєвих плантацій цього корисного лісогосподарського виду.

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).

Комп'ютерна верстка М. Ломалова Підписне Тираж 23 прим.

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