



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81279** (13) **U**
(51) МПК
A01H 1/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 00120	(72) Винахідник(и): Китайова Світлана Сергіївна (UA), Кириченко Віктор Васильович (UA), Чернобай Лариса Миколаївна (UA), Попов Віталій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.01.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.06.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2013, Бюл.№ 12	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА ІМ. В.Я. ЮР'ЄВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, пр. Московський, 142, м. Харків, 61128 (UA)

(54) ЕКСПРЕС-ОЦІНКА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СТВОРЕННЯ СТЕРИЛЬНИХ АНАЛОГІВ М-ТИПУ ТА АНАЛОГІВ-ВІДНОВНИКІВ ФЕРТИЛЬНОСТІ ПИЛКУ КУКУРУДЗИ

(57) Реферат:

Експрес-оцінка контролю якості створення ліній стерильних аналогів М-типу та аналогів-відновників фертильності пилку кукурудзи включає аналіз на типовість, порівняно з вихідною оригінальною лінією. Використовують біотехнологічний метод молекулярно-генетичних маркерів - аналіз поліморфізму мікросателітних локусів (Simple Sequence Repeats), який проводиться за визначеними SSR-праймерами для суттєвого скорочення часу на оцінку ліній і виключення залежності від періоду вегетації рослин та надання об'єктивної картини мінливості геному кукурудзи.

UA 81279 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства і може застосовуватися в селекції при створенні стерильних аналогів ліній М-типу та аналогів-відновників фертильності пилку інбредних ліній кукурудзи.

Основою промислового насінництва кукурудзи (*Zea mays* L.) є використання явища цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС), яка застосовується для отримання гібридного насіння кукурудзи. Методом гібридизації створюються стерильні аналоги М-типу, що виключає необхідність видалення волоті материнських рослин на ділянках гібридизації, зниження затрат і собівартості при вирощуванні гібридного насіння. Другим головним питанням є створення ліній-відновників фертильності пилку [1].

Використання біотехнологічного методу молекулярно-генетичних маркерів дозволяє виявити рівень генетичної подібності між лініями (в тому числі і між оригінальною лінією та її стерильним аналогом М-типу або аналогом відновником фертильності пилку) в кількісному вимірі генетичних дистанцій між зразками, або порівнюючи електрофоретичні спектри (генетичні паспорти) між собою [2, 3, 4].

Один із способів оцінки генетичної подібності ліній є аналіз поліморфізму мікросателітних локусів (Simple Sequence Repeats - SSR), які мають високу розподільчу здатність і є зручними в селекції та насінництві сільськогосподарських культур [3]. Недоліком цього способу є те, що він не використовується при створенні стерильних аналогів М-типу та аналогів-відновників фертильності пилку порівняно з оригінальною лінією через відсутність відповідної методики.

Загальновідомий спосіб оцінки стерильних аналогів та ліній відновників фертильності пилку, коли аналіз на типовість, порівняно з вихідною фертильною лінією, проводять виключно за фенотиповими характеристиками в польових умовах [1]. Недоліками цього способу є розтягнутість і обмеженість у часі проведення, суттєвий вплив факторів навколишнього середовища на прояв фенотипових ознак (модифікаційна мінливість), що підвищує рівень суб'єктивної оцінки інбредних ліній кукурудзи. Також фенотиповий опис ліній не враховує молекулярної мінливості геному.

В основу корисної моделі поставлено задачу підвищити ефективність насінництва батьківських компонентів гібридів кукурудзи, яка вирішується шляхом контролю якості створення стерильних аналогів М-типу і ліній відновників фертильності пилку з використанням аналізу поліморфізму мікросателітних локусів на всіх етапах селекційно-насінницького процесу.

Суть корисної моделі полягає в тому, що використання визначених SSR праймерів UMC1703 (A), UMC2047 (B), Phi090 (C), Phi053 (D), Phi10228 (E), Phi072 (F), Phi093 (G), Phi113 (H), Phi048 (I), Phi452693 (J), Phi078 (K), UMC1545 (L), Phi114 (M), UMC1304 (N), Phi015 (O), Phi022 (P), Phi032 (Q), Phi041 (R), UMC1344 (S) при молекулярно-генетичному аналізі для контролю якості процесу створення стерильних аналогів М-типу та аналогів-відновників фертильності пилку значно скорочує час на проведення аналізу генетичної подібності, дозволяє контролювати процес як на проміжних етапах роботи, так і оцінювати кінцевий результат, підвищує об'єктивність оцінки та не залежить від періоду вегетації рослин. Відображення результатів аналізу в певній послідовності (A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S) формує генетичний паспорт ліній кукурудзи та їх аналогів, що дозволяє робити висновок про якість аналогу методом порівняння кожного локусу з оригінальною лінією.

Спосіб експериментально перевірений в лабораторії селекції та насінництва кукурудзи Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва. Матеріалом для досліджень були використані 16 інбредних ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), з них 4 пари: природний закріплювач стерильності (3М) - стерильний аналог (MC) і 4 пари: природний закріплювач стерильності (3М) - відновник фертильності (MB) (табл. 1). Були проведені польові спостереження за фенотиповим проявом ознак за методикою UPOV та молекулярно-генетичний аналіз зазначених ліній.

Для досліджень було використано 19 пар відібраних за літературними даними [5, 6] праймерів до таких SSR локусів: UMC1703 (A), UMC2047 (B), Phi090 (C), Phi053 (D), Phi10228 (E), Phi072 (F), Phi093 (G), Phi113 (H), Phi048 (I), Phi452693 (J), Phi078 (K), UMC1545 (L), Phi114 (M), UMC1304 (N), Phi015 (O), Phi022 (P), Phi032 (Q), Phi041 (R), UMC1344 (S). Основним критерієм добору праймерів була наявність їх поліморфізму при використанні на іншому вихідному матеріалі кукурудзи.

Таблиця 1

Список зразків оригінальних ліній та їх аналогів, використаних у дослідженні.

№	Лінія	Аналог лінії
1	Харківська 215 3М	Харківська 215 МС
2	Харківська 174 3М	Харківська 174 МС
3	Харківська 212 3М	Харківська 212 МС
4	ГК 26 3М	ГК 26 МС
5	Харківська 125 3М	Харківська 125 МВ
6	Харківська 523 3М	Харківська 523 МВ
7	Харківська 126 3М	Харківська 126 МВ
8	Харківська 164 3М	Харківська 164 МВ

Була проведена реєстрація генотипів інбредних ліній кукурудзи, їх стерильних аналогів та аналогів-відновників фертильності пилку. Генетичні паспорти декількох оригінальних ліній та їх стерильних аналогів представлені у таблиці 2. Жирним шрифтом відмічені генотипи, що відрізняються один від одного.

При порівнянні електрофоретичних спектрів оригінальних ліній та їх аналогів можна відмітити відмінність оригінальної лінії Харківська 212 3М та її стерильного аналогу Харківська 212 МС за чотирма локусами, що вивчалися. Узагальнені дані польової оцінки 2011-2012 рр. показали, що оригінальні лінії та їх стерильні аналоги М-типу та аналоги-відновники фертильності не відрізнялися за усіма ознаками, що вивчалися, окрім пари Харківська 212 3М / Харківська 212 МС. Аналог лінії відставав у цвітінні та був меншим за висотою рослин.

Таблиця 2

Генетичні паспорти деяких ліній кукурудзи та їх стерильних аналогів М-типу.

№	Лінія	Генетичні паспорти
1	Харківська 215 3М	A ₁₃₁ B ₁₁₉ C ₁₂₂ D ₁₇₁ E ₁₃₈ F ₁₃₉ G ₂₈₀ H ₁₀₇ I ₁₆₉ J ₁₃₁ K ₁₁₆ L ₆₈ M ₁₃₈ N ₁₂₇ O ₁₂₃ P ₁₃₇ Q ₂₃₈ R ₂₀₂ S ₁₀₀
2	Харківська 215 МС	A ₁₃₁ B ₁₁₉ C ₁₂₂ D ₁₇₁ E ₁₃₈ F ₁₃₉ G ₂₈₀ H ₁₀₇ I ₁₆₉ J ₁₃₁ K ₁₁₆ L ₆₈ M ₁₃₈ N ₁₂₇ O ₁₂₃ P ₁₃₇ Q ₂₃₈ R ₂₀₂ S ₁₀₀
5	Харківська 212 3М	A₁₃₁ B₁₁₉ C ₁₅₁ D ₁₈₉ E ₁₃₁ F ₁₄₇ G ₂₈₀ H ₁₀₇ I₁₆₀ J ₁₄₂ K ₁₁₆ L₆₈ M₁₃₈ N ₁₃₅ O ₁₃₇ P ₁₃₇ Q ₂₈₀ R₂₀₇ S ₉₁
6	Харківська 212 МС	A₁₂₂ B₁₃₂ C ₁₅₁ D ₁₈₉ E ₁₃₁ F ₁₄₇ G ₂₈₀ H ₁₀₇ I₁₇₃ J ₁₄₂ K ₁₁₆ L ₆₈ M ₁₃₈ N ₁₃₅ O ₁₃₇ P ₁₃₇ Q ₂₈₀ R₁₈₈ S ₉₁

Таким чином, можна зробити висновок, що корисну модель доцільно використовувати для оцінки якості переведення ліній на стерильну основу М-типу та при створенні ліній відновників фертильності пилку на всіх етапах селекційно-насінницького процесу, що скорочує час на оцінку ліній, не залежить від періоду вегетації рослин та надає об'єктивну картину мінливості геному кукурудзи з складанням генетичного паспорту як ліній, так і їх аналогів.

Джерела інформації:

1. Кривошеев Г.Я. Классификация новых самоопыленных линий кукурузы по генам-восстановителям фертильности "С" типа ЦМС / Г.Я. Кривошеев // Зерновое хозяйство России. - 2010. - № 1, - С. 3-6.

2. Кожухова Н.Э. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы / Н.Э. Кожухова, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. - 2006. - № 5, - С. 82-93.

3. Сиволап Ю.М. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів / Ю.М. Сиволап, В.В. Волкодав, М.С. Бальвінська, Н.Е. Кожухова та ін. // Методичні рекомендації. - 2004. - Одеса: Астропринт. - 14 с.

4. Сиволап Ю.М. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів / Ю.М. Сиволап, В.В. Волкодав, Н.Е. Кожухова [та ін.] // Методичні рекомендації. - Одеса, 2004. - 14 с.

5. Smith, J.S.C. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree / J.S.C. Smith, E.C.L. Chin, H. Shu, et, al. // Theor. Appl. Genet. - 1997. - 95, - p. 163-173.

- 5 6. Qilun Yao Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data / Qilun Yao, Kecheng Yang, Guangtang Pan, Tingzhao Rong // Journal of Genetics and Genomics. - 2007. - 34., - p. 851-860.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 1. Експрес-оцінка контролю якості створення ліній стерильних аналогів М-типу та аналогів-відновників фертильності пилку кукурудзи, що включає аналіз на типовість, порівняно з вихідною оригінальною лінією, яка **відрізняється** тим, що використовується біотехнологічний метод молекулярно-генетичних маркерів - аналіз поліморфізму мікросателітних локусів (Simple Sequence Repeats), який проводиться за визначеними SSR-праймерами для суттєвого
- 15 скорочення часу на оцінку ліній і виключення залежності від періоду вегетації рослин та надання об'єктивної картини мінливості геному кукурудзи.
2. Експрес-оцінка за п. 1, яка **відрізняється** тим, що аналіз поліморфізму мікросателітних локусів (Simple Sequence Repeats) проводиться за визначеними SSR-праймерами UMC1703, UMC2047, Phi090, Phi053, Phi10228, Phi072, Phi093, Phi113, Phi048, Phi452693, Phi078,
- 20 UMC1545, Phi114, UMC1304, Phi015, Phi022, Phi032, Phi041, UMC1344, за якими наявний поліморфізм вихідного матеріалу кукурудзи.
3. Експрес-оцінка за п. 1, яка **відрізняється** тим, що робиться висновок про якість аналогу методом порівняння кожного локусу з локусом оригінальної лінії.

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