



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108011** (13) **U**
(51) МПК
A01H 1/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 00423	(72) Винахідник(и): Шарипіна Ярослава Юріївна (UA), Попов Віталій Миколайович (UA), Кириченко Віктор Васильович (UA), Пов'якало Віктор Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.01.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 24.06.2016	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА ІМ. В.Я. ЮР'ЄВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, пр. Московський, 142, м. Харків, 61060 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 24.06.2016, Бюл.№ 12	(74) Представник: Гребенюк Ірина Валеріївна

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОРФОЛОГІЧНО ТА БІОХІМІЧНО МАРКОВАНИХ ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ

(57) Реферат:

Спосіб отримання інбредних ліній соняшнику носіїв морфологічних та біохімічних маркерів, що включає вплив на прояв якісних ознак соняшнику. Вихідний матеріал для селекції за маркерними ознаками отримано шляхом хімічного мутагенезу, а саме обробкою насіння водним розчином N-нітрозоетилсечовини у концентрації 0,05 %, при цьому у інбредних ліній соняшнику відбувається зміна прояву морфологічних ознак; отриманий вихідний матеріал досліджено за ізоферментним складом та сформовано колекцію інбредних ліній соняшнику, відмінних за проявом морфологічних ознак та наявністю певного ізоферментного алелю, здатністю до відновлення пилку (відновники, закріплювачі, стерильні аналоги), цитоплазмою (стерильна, фертильна), яка дозволяє шляхом схрещувань, селекції та добору привнести морфологічні та біохімічні маркери в кращі існуючі селекційні лінії соняшнику.

UA 108011 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, зокрема рослинництва, а саме до маркерної селекції (MAS-marker-assisted selection) рослин.

Ефективність реалізації програми забезпечення сировиною олійно-жирової галузі АПК залежить від створення та швидкого впровадження у виробництво нових високоврожайних, пластичних, стійких до біотичних та абіотичних факторів середовища гібридів соняшнику [1].

Але отримання гібридного насіння й насінництво батьківських форм принципово відрізняється від насінництва сортових популяцій. Ентомофільний характер запилення робить досить складним, трудомістким створення і підтримування 100 %-го рівня генетичної чистоти батьківських ліній та 100 % гібридності насіння першого покоління [2].

Підвищення ефективності контролю за насінництвом та процесом гібридизації можливе за умови наявності у батьківських ліній маркерних ознак (морфологічних, біохімічних). Маркування дозволяє чітко ідентифікувати генотипи вихідного матеріалу, що є необхідним в селекції та насінництві будь-якої культури, контролювати генетичну чистоту та однорідність ліній, визначати гібридність, проводити паспортизацію перспективних ліній та гібридів, а також забезпечує необхідні умови для захисту авторських прав [3, 4].

Морфологічне та біохімічне маркування досить успішно використовується в селекції багатьох культур [5,6]. Однак використання моногенних рецесивних маркерів в селекції соняшнику дуже обмежене. Серед гібридів оригінальної української селекції морфологічно замарковані батьківські форми гібридів Запорізький 26, Запорізький 28 (ген лимонного забарвлення крайових квіток), Одор (ген оранжевого забарвлення) та материнська форма гібрида Смак (ген оранжевого забарвлення), лінії ОД 973, ОД 2080 (ген блідо-жовтого забарвлення) [7].

Створення маркованих ліній і гібридів потребує формування інформаційної бази щодо різноманіття за морфологічними, біохімічними, ДНК-маркерами, їх стабільності, ступеня прояву та успадкування [8]. Це дозволить селекціонеру свідомо підійти до підбору маркера і прогнозувати результат здійсненої роботи по маркуванню, якщо маркер привноситься в існуючу лінію, або вести направлений добір, якщо лінія тільки створюється, тобто цілеспрямовано вести селекцію та насінництво.

Одним із напрямків, який дозволяє в короткі терміни отримувати різноманітний за проявом багатьох ознак вихідний лінійний матеріал, є використання хімічного мутагенезу.

Як потенційну морфологічну маркерну ознаку ми розглядали забарвлення крайових квіток соняшнику, як найбільш зручне та інформативне для ідентифікації зразка.

Існуючий спосіб отримання мутантних за забарвленням крайових квіток форм соняшнику з використанням хімічного мутагенезу проводять шляхом обробки зрілого насіння етилметансульфонатом [9]. Недоліком цього аналогу є незначне різноманіття спектру забарвлень квіток (лимонне, блідо-жовте), отримане з його використанням. Також він є більш складним у виконанні: кожен варіант забарвлення було отримано обробкою насіння хімічним мутагеном у різній концентрації.

Найближчим за технічною суттю є спосіб [10], однак автором не повідомляється про можливість отримання мутантних за забарвленням крайових квіток форм соняшнику.

В основу корисної моделі поставлено задачу отримання максимально різноманітного за забарвленням крайових квіток соняшнику вихідного лінійного матеріалу, вивчення успадкування морфологічних та біохімічних ознак та введення якісних ознак (морфологічних, біохімічних) як маркерів в різних варіантах поєднання до кращих існуючих батьківських ліній соняшнику.

Поставлена задача вирішується способом отримання інбредних ліній соняшнику носіїв морфологічних та біохімічних маркерів, при якому різноманітний за проявом забарвлення крайових квіток соняшнику вихідний рослинний матеріал отримується шляхом обробки насіння соняшнику водним розчином хімічного мутагену N-нітросо-N-етилсечовина (НЕС) при температурі 18-20 °C у концентрації 0,05 % при експозиції 18 годин.

В посівах М1 протягом вегетаційного періоду визначаються морфологічні зміни, форми, відмінні за проявом забарвлення крайових квіток, штучно ізолюються та самозапильються. В наступних поколіннях визначається мінливість та константність забарвлення, а також різноманіття за поліморфними ізоферментними системами.

Надалі, перш ніж безпосередньо використовувати ознаки як маркерні, вивчається їх успадкування. Потенційна морфологічна маркерна ознака повинна мати рецесивний контроль, що дозволяє у польових умовах легко визначати засмічення насінневого матеріалу. Наявність поліморфізму за ізоферментними системами забезпечує можливість біохімічно маркувати батьківський та материнський компоненти майбутнього гібрида і безпомилково визначати гібридність та типівість гібридного насіння.

Пересвідчившись у відповідності оцінених ознак вимогам до маркера, мутантні лінії надалі розглядаються як носії маркерних ознак. В залежності від запланованого реципієнта маркерної ознаки лінії-носії морфологічних та біохімічних маркерів схрещуються з материнськими лініями або відновниками фертильності пилку. Шляхом беккросування та добору формуються морфологічно та біохімічно марковані селекційні лінії, генетично подібні до ліній реципієнтів. У генотипі створених ліній маркерні ознаки поєднано у різних варіантах.

Спосіб був експериментально проведений у лабораторіях селекції і генетики соняшнику та генетики і біотехнології Інституту рослинництва ім. В.Я.Юр'єва НААН впродовж 1992-2015 років. Матеріалом для досліджень була колекція інбредних ліній соняшнику.

В ході проведених досліджень було отримано зразки з абрикосовим, лимонним, блідо-жовтим та оранжевим забарвленням крайових квіток. Абрикосове забарвлення крайових квіток соняшнику шляхом хімічного мутагенезу отримано вперше.

Отримані мутантні за забарвленням крайових квіток лінії соняшнику було зареєстровано [11], та включено до реципрокних схем схрещування.

Протягом 6 років (2002-2008) здійснено дослідження успадкування забарвлення крайових квіток соняшнику та 4 поліморфних ізоферментних систем (НАДФ - залежної малатдегідрогенази (ME, К.Ф. 1.1.1.40), анодної естерази (EST, К.Ф.3.1.1.1), 6 фосфоглюконатдегідрогенази (6-PGD, К.Ф. 1.1.1.44), лейцинамінопептидази (LAP, К.Ф.3.4.11.1)). Успадкування двох систем (НАДФ - залежної малатдегідрогенази, лейцинамінопептидази) було досліджено вперше в світовій практиці. Для кожної ізоферментної системи було ідентифіковано поліморфні зони з двома ізоформами, відмінними за електрофоретичною рухомістю компонентів. Алельні варіанти було позначено як F (fast) (швидкомігруючий) та S (slow) (повільномігруючий).

Було визначено моногенний рецесивний характер успадкування для морфологічних ознак та кодомінантний тип успадкування для ізоферментних систем. Також встановлено, що розглянуті морфологічні та біохімічні ознаки успадковуються незалежно. Крім того, не виявлено впливу алелей розглянутих генів на прояв основних агрономічних ознак, що дозволяє їх вводити до батьківських ліній соняшнику не змінюючи їх кількісні характеристики.

Враховуючи одержану інформацію щодо успадкування, було створено колекцію мутантних інбредних ліній соняшнику, відмінних за проявом морфологічних ознак, наявністю певного ізоферментного алелю, здатністю до відновлення пилку (відновники, закріплювачі, стерильні аналоги), цитоплазмою (стерильна, фертильна). Колекцію передано до Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Лінії-відновники з абрикосовим та лимонним забарвленням крайових квіток з колекції було залучено у схрещування з кращими відновниками пилку лабораторії селекції та генетики соняшнику Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва X 782 В, X 201 В, X 1223 В, X 720 В. Водночас враховувались материнські лінії гібридів, до створення яких залучають X 782 В, X 201 В, X 1223 В, X 720 В. Було підібрано морфологічно марковані лінії колекції носії таких алелей ізоферментних генів, які б відрізнялися від алелей відповідної материнської форми. Це дозволить у подальшому визначати типовість та гібридність насіння.

Шляхом беккросування та добору отримано та сформовано колекцію ліній-відновників фертильності пилку соняшнику, в генотипі яких поєднано у різних варіантах морфологічні та біохімічні маркерні ознаки.

В таблиці представлено дані щодо врожайності та олійності низки створених з залученням маркованих відновників фертильності пилку гібридів соняшнику. Представлені дані свідчать про можливість отримання різноманітних як високобілкових, так і високоолійних гібридів.

Унікальність представленої колекції полягає в морфологічній маркованості кожної лінії-відновника фертильності пилку соняшнику та можливості підбору в залежності від материнської форми відмінної від неї за ізоферментними алелями батьківської, що дозволяє легко визначати гібридність створеного гібрида. Наявність морфологічного рецесивного маркера робить неможливим засмічення насіннєвого матеріалу іншою формою, бо будь-які домішки будуть мати інший прояв цієї ознаки.

Також було отримано морфологічно марковану лимонним забарвленням крайових квіток материнську лінію Mx 845 А, яку на цей час внесено до національного каталогу ліній та гібридів соняшнику.

Олійність та врожайність гібридів F₁ соняшнику, отриманих з залученням маркованих відновників фертильності пилку, 2008-2009 рр.

Номер зразка	Гібрид	Урожайність, т/га	Олійність, %
2583	Cx 1006 A/МШ 70/4	2,98	22,90
2527	Cx 1006 A/МШ 14/1	3,70	24,77
2485	Cx 1006 A/МШ 3/6	2,56	25,56
2417	Cx 1006 A/МШ 32/6	3,69	26,76
2533	Cx 1006 A/МШ 35/1	3,25	27,37
2539	Cx 1006 A/МШ 62/6	3,66	28,21
2408	Cx 1006 A/МШ 1/3	3,96	28,88
2424	Cx 1006 A/МШ 45/6	4,20	29,91
2420	Cx 2552 A/МШ 49/6	3,88	50,84
2538	Cx 2552 A/МШ 76/2	3,70	51,06
2418	Cx 2552 A/МШ 46/3	3,31	51,75
2470	Cx 908 A/МШ 56/1	2,77	51,79
2537	Cx 908 A/МШ 56/2	2,28	52,19
2474	Cx 2552 A/МШ 76/4	3,27	52,37
2471	Cx 908 A/МШ 65/3	3,09	53,19
2475	Cx 2552/МШ 76/5	3,71	54,2
2419	Cx 2552/МШ 46/4	3,43	55,08
2473	Cx 2552 A/МШ 76/3	3,61	55,97
	St. "Кий»	3,47	
	St. "Оскіл»	4,04	

Таким чином, використовуючи хімічний мутагенез, схрещування, беккросування та добір, можливо отримувати різноманітно маркований селекційний матеріал соняшнику.

5 Джерела інформації:

1. Кириченко В.В. Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuum* L.). - Харьков, 2005. - 385 с.

2. Попов В.Н., Кириченко В.В. Мужская стерильность подсолнечника. - Харьков, 2010. - 156 с.

10 3. Бочкарев¹ Н.И., Толмачев В.В., Цухло Л.Г. Маркерные признаки растений и семян / вкн: Биология, селекция и возделывание подсолнечника. - Агропромиздат, 1991. - С. 39-44.

4. Ведмедева К.В. Створення колекції джерел морфологічних маркерних ознак соняшнику і вивчення їх генетичного контролю: Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.15/СГП - націон. Центр насіннєзнавства та сортівивчення УААН. - Одеса, 2004. - 16 с

15 5. Даулетбаева СБ., Шулембаева К.К Создание изогенных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 126. Морфология и продуктивность //Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2007 г. № 3, - С. 33-38.

20 6. Беков Р.Х. Создание исходного материала томата с использованием генетических маркеров и эффективные пути его применения в практической селекции: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 /Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства Всерос. акад. с.-х. наук. - Москва, 2012. - 44 с.

7. Ведмедева К. В., Толмачев В. В., Солоденко А. Е. Использование рецессивных генов морфологических признаков и ДНК-маркеров в семеноводстве подсолнечника // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. - 2014. - № 1. - С. 7-13.

25 8. Анащенко А.В., Гаврилова В.А., Анисимова И.Н., Рожкова В.Т., Смирнова Н.Г. Самоопыленные маркированные линии подсолнечника // Каталог мировой коллекции ВИР. 1992. - 26 с.

9. Лях В. А., Полякова И. А., Сорока А. И. Индуцированный мутагенез масличных культур: монография / Запорож. нац. ун-т МОН Украины. - Запорожье, 2009. - 266 с.

30 10. Калайджан А.А. Химический мутагенез в селекции подсолнечника: диссертация ... доктора сельскохозяйственных наук: 06.01.05. - Краснодар, 1998. - 285 с.

11. Каталог рабочей коллекции самоопыленных линий подсолнечника Института растениеводства им. В.Я. Юрьева /ИР им. В.Я. Юрьева; В.В. Кириченко, З.К. Аладына, А.Д. Гуменюк, В.П. Петренкова, В.И. Повякало, Е.Н. Макляк, В.И. Сивенко. - Харьков, 1996. - 83 с.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання інбредних ліній соняшнику носіїв морфологічних та біохімічних маркерів, що включає вплив на прояв якісних ознак соняшнику, який **відрізняється** тим, що вихідний матеріал для селекції за маркерними ознаками отримують шляхом хімічного мутагенезу, а саме обробляють насіння водним розчином N-нітрозоетилсечовини у концентрації 0,05 %, при цьому у інбредних ліній соняшнику відбувається зміна прояву морфологічних ознак; отриманий вихідний матеріал досліджують за ізоферментним складом та формують колекцію інбредних ліній соняшнику, відмінних за проявом морфологічних ознак та наявністю певного ізоферментного алелю, здатністю до відновлення пилку (відновники, закріплювачі, стерильні аналоги), цитоплазмою (стерильна, фертильна), шляхом схрещувань, селекції та добору привносять морфологічні та біохімічні маркери в кращі існуючі селекційні лінії соняшнику.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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