

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202000025** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.11.30

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.01.30

---

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНИЙ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С УКОРОЧЕННЫМ СРОКОМ КОЛОШЕНИЯ**

---

(31) 2019114004

(32) 2019.05.06

(33) RU

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И  
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК" (ИЦиГ СО РАН)  
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Салина Елена Артемовна, Стасюк  
Анатолий Иванович, Киселева  
Антонина Андреевна (RU)**

(74) Представитель:

**Кучумова Л.Я. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к сельскому хозяйству и биотехнологии. Коммерческий сорт яровой мягкой пшеницы "Тулун 15", содержащий аллель нечувствительности к фотопериоду Ppd-D1a, а также аллели Vrn-A1a, Vrn-B1c и Vrn-B3a, определяющие ранние сроки колошения, скрещивают с коммерческим сортом мягкой пшеницы "Обская 2", растения поколения F<sub>1</sub> самоопыляют до поколения F<sub>2</sub>. Из поколения F<sub>2</sub> с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1б отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель нечувствительности к фотопериоду Ppd-D1a. Отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1б растения F<sub>2</sub> проверяют ПЦР-маркерами 2a, 3a, 3б, 4a, 4б для выявления растений, содержащих в гомозиготном состоянии аллели генов Vrn - Vrn-A1a, Vrn-B1c и Vrn-B3a, определяющие ранние сроки колошения. Технический результат: упрощение известного способа и расширение его функциональных возможностей.

**A1**

**202000025**

**202000025**

**A1**

## Способ получения линий яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком колошения

Изобретение относится к сельскому хозяйству и биотехнологии и может быть использовано в генетике и селекции зерновых культур.

Сроки наступления колошения у пшеницы являются важным фактором, определяющим адаптацию растений к условиям окружающей среды. У яровой мягкой пшеницы сроки колошения контролируются генами реакции на яровизацию (*Vrn*), основными из которых являются *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, а также генами *Ppd*, определяющими чувствительность к фотопериоду [1,2]. Различное сочетание аллелей этих генов приводит к различным срокам колошения [3]. При создании новых сортов яровой пшеницы необходимо учитывать сроки колошения для конкретной климатической зоны. Это позволит уменьшить влияние абиотических (засуха, холод) и биотических факторов (болезни, вредители) и тем самым предотвратить потери урожая, вызванные этими факторами. Проблемы классической селекции на сроки колошения связаны с трудностью подбора родительских пар для скрещивания, а также с длительностью самого селекционного процесса.

Известен, например, способ определения у длиннодневных злаковых растений форм различной скороспелости и фотопериодической чувствительности [4], заключающийся в том, что из гибридных популяций, выращиваемых в условиях короткого светового дня (12 часов) в фазе выхода в трубку у полностью сформировавшихся листьев 4-6 ярусов 10-15-дневного возраста измеряют оптический коэффициент поглощения падающего монохроматического излучения в диапазоне длин волн 730-740 нм и дифференцируют растения по величине этого коэффициента при длине волны 730 нм. Растения с наиболее высоким коэффициентом поглощения относят к скороспелым слабочувствительным к фотопериоду формам, а с наиболее низким – к более позднеспелым

сильночувствительным к фотопериоду формам. Однако данный способ является трудоемким, так как требует регулярного проведения фенотипической оценки индивидуальных растений и необходимости регуляции продолжительности светового дня.

Применение молекулярных маркеров позволяет сократить время и снизить трудозатраты по созданию форм яровой мягкой пшеницы, отличающихся сроками колошения.

Молекулярные или ДНК-маркеры, основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР-маркеры) оказались широко востребованными в генетических исследованиях и селекции пшеницы для решения практических задач. Применение молекулярных маркеров в практической селекции обозначается термином MAS (marker-assisted selection). Основным принципом MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий. В сочетании с методами классической селекции, MAS существенно сокращает время, необходимое для создания новых генотипов.

Наиболее ближайшим к заявляемому способу - прототипом, является способ создания линий яровой мягкой пшеницы с удлиненным сроком колошения и с комплексной устойчивостью к грибным болезням, заключающийся в том, что гибридную линию яровой мягкой пшеницы, содержащую фрагмент хромосомы с двумя генами от *Aegilops speltoides*: ген, определяющий удлинение срока колошения (VRN-Asp1), и ген устойчивости к бурой ржавчине (LrAsp5), скрещивают с линией, содержащей ген устойчивости к мучнистой росе (Pm) из генома ржи *Secale cereale*, и растения поколения F<sub>1</sub> самоопыляют до поколения F<sub>2</sub>. Из поколения F<sub>2</sub> с помощью молекулярного ПЦР-маркера Pr1/Pr5 отбирают растения, содержащие гены VRN-Asp1 и LrAsp5 в гомозиготном состоянии. Отобранные с

помощью ПЦР-маркера Pr1/Pr5 растения F<sub>2</sub> с генами VRN-Asp1 и LrAsp5 проверяют ПЦР-маркером SCM009 для выявления растений с геном Pm устойчивости к мучнистой росе (6). Использование заявленного способа позволяет создать линии яровой мягкой пшеницы с удлинённым сроком колошения и с комплексной устойчивостью к грибным болезням. Недостатками данного способа являются:

1. Отсутствие возможности получать линии яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком колошения.
2. Ограниченные функциональные возможности способа, поскольку отбор на сроки колошения производится только по одному гену VRN-Asp1 и не учитывается влияние других аллелей генов Vrn и генов фотопериодической чувствительности Ppd.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка способа, позволяющего быстро отбирать растения яровой мягкой пшеницы, способные выколашиваться независимо от длины светового дня и содержащие комплекс генов для укороченного срока колошения.

Технический результат заключается в расширении функциональных возможностей известного способа.

Поставленная задача решается предлагаемым способом, заключающимся в следующем.

Коммерческий раннеспелый сорт яровой мягкой пшеницы «Тулун 15», несущий аллель нечувствительности к фотопериоду Ppd-D1a, а также аллели генов Vrn – Vrn-A1a, Vrn-B1c и Vrn-B3a, определяющие ранние сроки колошения, скрещивают с коммерческим сортом яровой мягкой пшеницы «Обская 2» и растения поколения F<sub>1</sub> самоопыляют до поколения F<sub>2</sub>. Из поколения F<sub>2</sub> с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1a и 1b (Ppd1\_F / Ppd1\_R1 / Ppd1\_R2) отбирают растения, содержащие аллель Ppd-D1a в гомозиготном состоянии. Отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1b растения F<sub>2</sub> с аллелем Ppd-D1a проверяют аллель-специфичным маркером 2a (Vrn1AF/VRN1-INT1R) для выявления аллеля Vrn-A1a;

маркерами 3а ((Intr1/B/F/Intr1/B/R3) и 3б (Intr1/B/F/Intr1/B/R4) для выявления аллеля Vrn-B1с, маркерами 4а (FT-B-INS) и 4б (FT-B-NOINS) для выявления аллеля Vrn-B3а. Растения поколения F<sub>2</sub>, отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1а, 1б, 2а, 3а, 3б, 4а, 4б, самоопыляют до поколения F<sub>3</sub> и в полевых условиях проводят оценку сроков колошения.

Основными определяющими отличиями предлагаемого способа от прототипа являются:

- в качестве исходного сорта для гибридизации используют коммерческий сорт яровой мягкой пшеницы «Тулун 15», содержащий аллель нечувствительности к фотопериоду Ppd-D1а, а также аллели Vrn-A1а, Vrn-B1с и Vrn-B3а, определяющие ранние сроки колошения;

- из поколения F<sub>2</sub> с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1а и 1б отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель Ppd-D1а, определяющий нечувствительность к фотопериоду, что позволяет на ранних стадиях создания линий мягкой пшеницы быстро отбирать растения способные выколашиваться независимо от длины светового дня;

- растения F<sub>2</sub>, отобранные с помощью молекулярных маркеров 1а и б, анализируют с помощью аллель-специфичных маркеров 2а, 3а, 3б, 4а, 4б, для отбора растений, содержащих в гомозиготном состоянии аллели Vrn-A1а, Vrn-B1с и Vrn-B3а, определяющие ранние сроки колошения, что позволяет получить растения с комплексом генов для укороченного срока колошения.

Изобретение иллюстрируется следующим примером.

#### **Пример.**

Коммерческий раннеспелый сорт яровой мягкой пшеницы «Тулун 15» был проанализирован с помощью молекулярных маркеров на аллельный состав генов Ppd и Vrn.

Сорт «Тулун 15» скрещивали со среднеспелым сортом яровой мягкой пшеницы «Обская 2». Полученные от скрещивания гибридные растения поколения F<sub>1</sub> самоопыляли до поколения F<sub>2</sub> и в поколении F<sub>2</sub> с помощью

ПЦР-маркеров 1а и 1б отбирали растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель *Ppd-D1a*. Структура использованных праймеров представлена в таблице 1.

Результаты анализа для ПЦР-маркеров 1а и 1б с геномной ДНК родительских сортов «Тулун 15», «Обская 2» и растений поколения  $F_2$ , содержащих (сорт «Тулун 15» и растения 3, 5, 6, 8) и не содержащих (сорт «Обская» 2 и растения 1, 2, 4, 7) аллель *Ppd-D1a*, приведены на фиг. 1. Фрагмент ДНК длиной 288 п.н., свидетельствующий о наличии аллеля *Ppd-D1a*, указан стрелкой.

Отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1а и 1б растения поколения  $F_2$ , содержащие аллель *Ppd-D1a* в гомозиготном состоянии, проверяли с помощью аллель-специфичных праймеров (таблица 1) к генам *Vrn*, определяющим сроки колошения. ПЦР-маркер 2а использовался для выявления растений, содержащих аллель *Vrn-A1a*. Результаты анализа ПЦР-маркером 2а представлены на фиг. 2, из которой видно, что сорта «Тулун 15», «Обская 2» и все растения  $F_2$  амплифицируют фрагменты длиной 965 и 876 пар нуклеотидов, что соответствует аллелю *Vrn-A1a*.

Для отбора растений, несущих в гомозиготном состоянии аллель *Vrn-B1c*, использовали два ПЦР-маркера 3а и 3б. Результаты амплификации фрагментов ПЦР у сортов «Тулун 15», «Обская 2» и растений  $F_2$  приведены на фиг. 3, из которой видно, что сорта Тулун 15, Обская 2 и все растения  $F_2$  амплифицируют фрагмент длиной 737 пар нуклеотидов, соответствующий аллелю *Vrn-B1c*.

Анализ сортов «Тулун 15», «Обская 2» и растений  $F_2$  на наличие доминантного аллеля *Vrn-B3a* в гомозиготном состоянии, проводили с помощью двух ПЦР-маркеров 4а и 4б. На фиг. 4 представлены результаты анализа ПЦР-маркерами 4а и 4б сортов «Тулун 15», «Обская 2» и растений популяции  $F_2$ , содержащих (сорт «Тулун 15» и растения 3, 5, 6, 8) и не содержащих (сорт «Обская 2» и растения 1, 2, 4, 7) аллель *Vrn-B3a*.

Фрагмент ДНК длиной 1200 п.н., свидетельствующий о наличии аллеля *Vrn-B3a*, указан стрелкой.

Растения поколения  $F_2$ , отобранные с помощью 1а, 1б, 2а, 3а, 3б, 4а, 4б самоопыляли до поколения  $F_3$  и в полевых условиях проводили оценку сроков колошения. Результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что у коммерческого сорта мягкой пшеницы «Тулун 15» период от всходов до колошения составил 38 дней. Коммерческий сорт «Обская 2» выколосился на 5 дней позже, сорта Тулун 15 и, соответственно, продолжительность периода от всходов до колошения у него составила 43 дня. Растения популяции  $F_3$ , содержащие комплекс аллелей *Ppd-D1a*, *Vrn-A1a*, *Vrn-B1c* и *Vrn-B3a* (растения 3, 5, 6, 8), показали самые ранние сроки колошения – 35 дней.

Таким образом, показано, что сорт Тулун 15 несет доминантный аллель нечувствительности к фотопериоду *Ppd-D1a*, а также аллели генов *Vrn* – *Vrn-A1a*, *Vrn-B1c* и *Vrn-B3a*, определяющие ранние сроки колошения (3).

Предлагаемый способ позволяет создавать линии яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком колошения, которые могут быть использованы для расширения генетического разнообразия яровой пшеницы, а также в селекции на скороспелость. Использование молекулярных маркеров 1а, 1б, 2а, 3а, 3б, 4а, 4б позволит отбирать линии с ранним сроком колошения без проведения полевых испытаний и, соответственно, сократить срок создания новых форм мягкой пшеницы.

### Источники информации

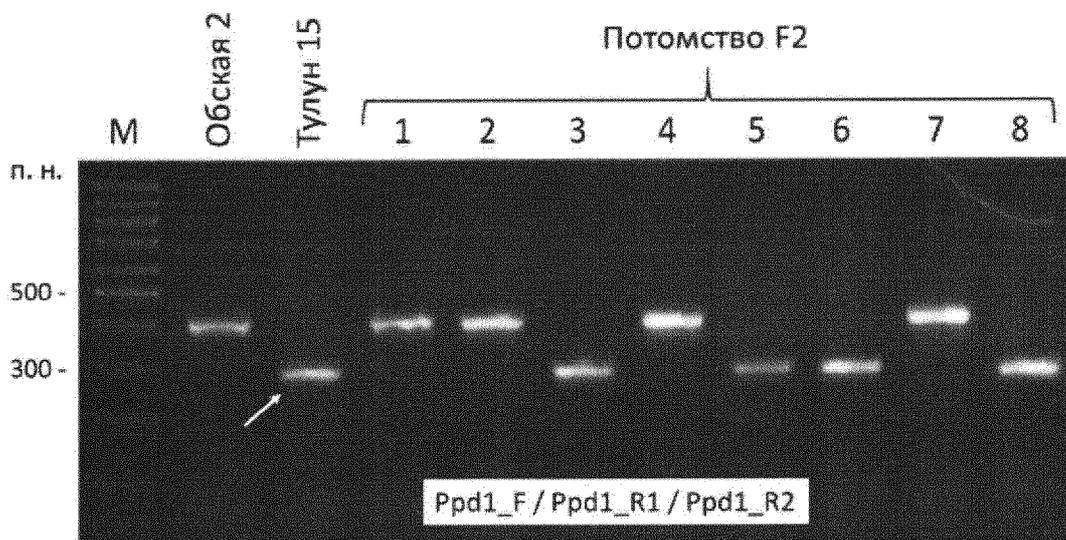
1. Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats // *Euphytica*. 1996. V. 89. P. 49–57.
2. Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 19581–19586.
3. Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А., Матвиенко И.И., Филобок В.А., Беспалова Л.А. Комбинация аллелей генов *Ppd* и *Vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2012. Т. 16. P. 77–86.
4. Способ определения у длиннодневных злаковых растений форм различной скороспелости и фотопериодической чувствительности. Патент РФ № 2300193, оп. 10.06.2007.
5. Способ отбора форм пшеницы различной скороспелости и фотопериодической чувствительности. Патент РФ № 2065697, оп. 27.08.1996.
6. Лихенко И.Е., Стасюк А.И., Щербань А.Б., Зырянова А.Ф., Лихенко Н.И., Салина Е.А. Изучение аллельного состава генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы Сибири // *Вавилов. журн. генет. и селекции*. 2014. Т.18. №4/1. С. 691–703.
7. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115. N. 5. P. 721–733.
8. Yan L.D., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in poliploid weat // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1677–1686.
9. Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner S., Zitzewits J.V., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // *Mol. Genet. Genomics*. 2005. V. 273. P. 54–65.

### Формула изобретения

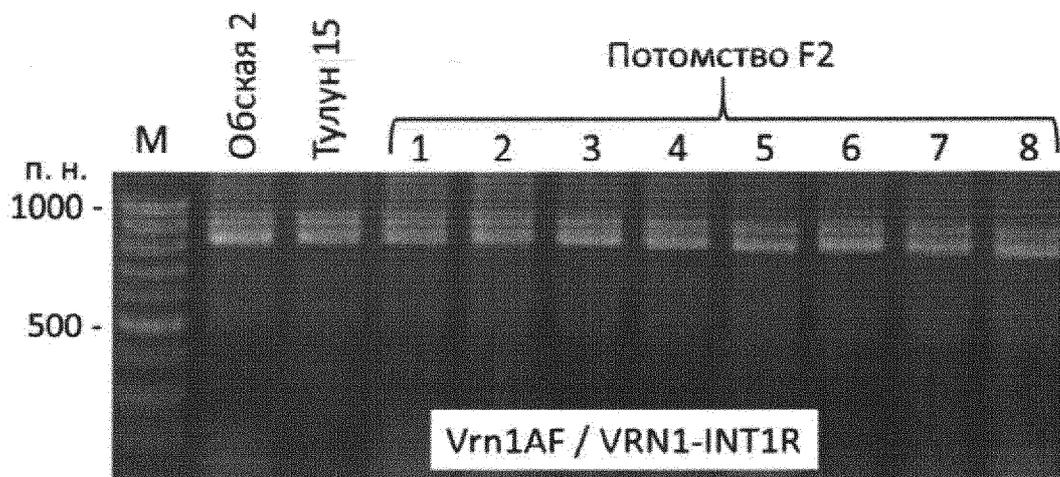
Способ отбора растений яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком колошения, включающий скрещивание родительских образцов мягкой пшеницы, самоопыление гибридов первого поколения  $F_1$  для получения гибридов второго поколения  $F_2$ , среди которых с помощью молекулярных ПЦР-маркеров отбирают растения с генами, определяющими сроки колошения, повторное самоопыление отобранных растений для получения поколения  $F_3$  и тестирование последних в полевых условиях на оценку сроков колошения, отличающийся тем, что сорт яровой мягкой пшеницы «Тулун 15», содержащий аллель нечувствительности к фотопериоду  $Ppd-D1a$ , а также аллели  $Vrn-A1a$ ,  $Vrn-B1c$  и  $Vrn-B3a$ , определяющие ранние сроки колошения, скрещивают с коммерческим сортом мягкой пшеницы «Обская 2», отбирают из поколения  $F_2$  с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1а и 1б растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель  $Ppd-D1a$ , анализируют растения  $F_2$ , отобранные с помощью молекулярных маркеров 1а и 1б, с помощью аллель-специфичных маркеров 2а, 3а, 3б, 4а, 4б, отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллели  $Vrn-A1a$ ,  $Vrn-B1c$  и  $Vrn-B3a$ , определяющие ранние сроки колошения.

Способ отбора растений яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком  
колошения

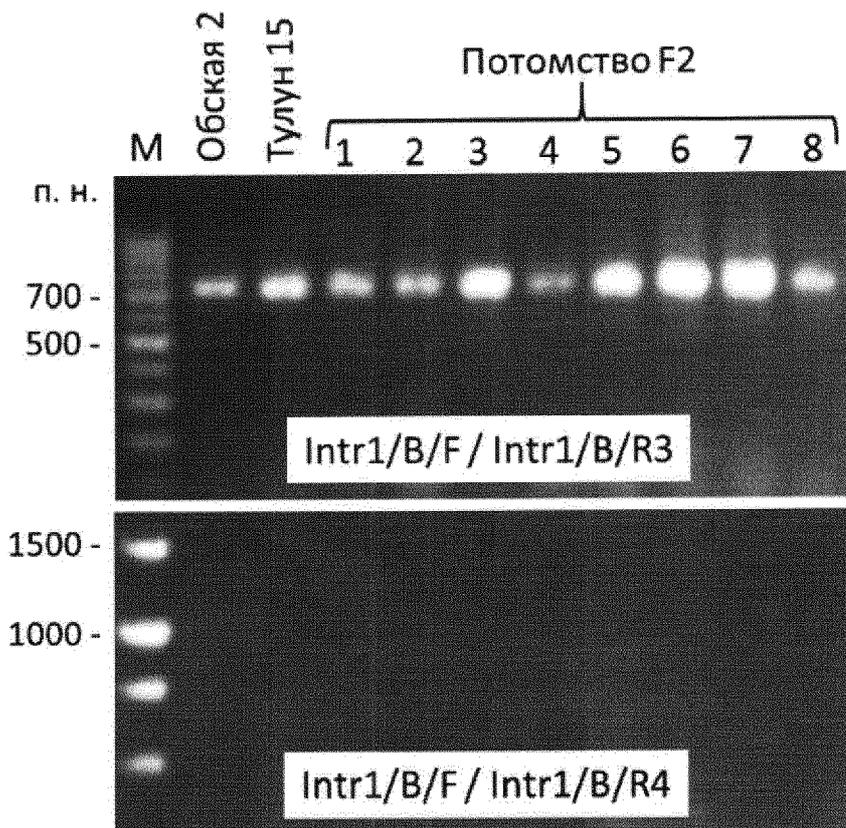
колошения



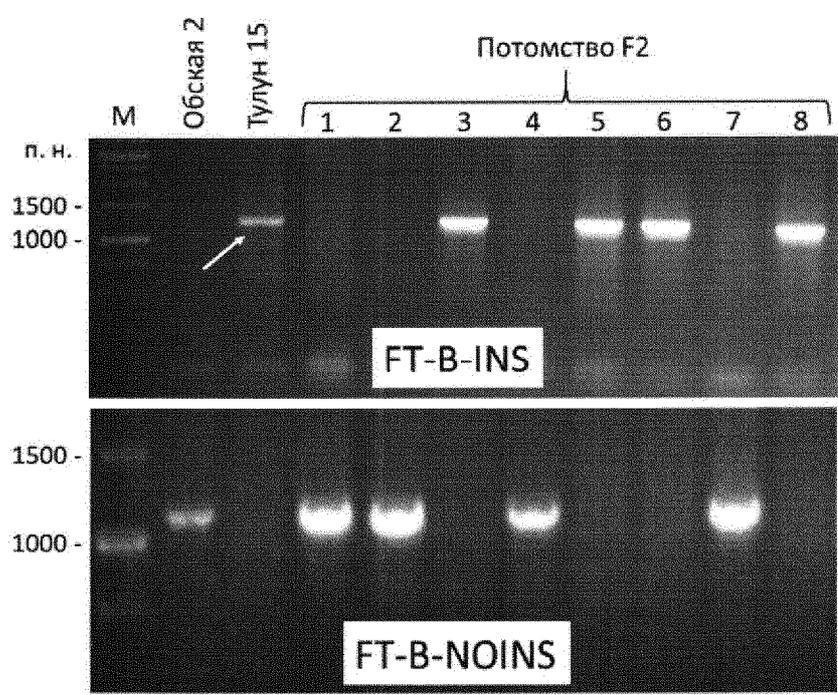
Фиг. 1.



Фиг. 2.



Фиг. 3.



Фиг. 4

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202000025**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*A01H 1/04 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A01H 1/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) ЕАПАТИС, ESPACENET, GOOGLE; elibrary; пшеница, селекция, скороспелость, колошение, ген Vrn, Ppd, MAS-технология

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория *	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	SU 1702976 A1 (НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «ЭЛИТА ПОВОЛЖЬЯ» ВСЕРОССИЙСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ ВСЕСОЮЗНОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК ИМ.В.И.ЛЕНИНА), 1992.01.07, реферат.	1
A	SU 1597123 A1 (КРАСНОЯРСКИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ), 1990.10.07, реферат.	1
A	WO 2014011859 A2 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC., E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY), реферат, п.1, формулы.	1
A	РИГИН Б.В. и др. Селекционно-генетические аспекты создания продуктивных форм мягкой яровой пшеницы с высокой скоростью развития. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 2018, т.179, вып.3, с.194-202, [найдено 2020-08-06]. Найдено в <doi:10.30901/2227-8834-2018-3-194-202>.	1
A	ЯНКОВСКАЯ А.А. и др. Генетическое разнообразие сортов яровой мягкой пшеницы европейской части России по генам VRN и PPD, определяющим сроки колошения. Генетика, 2018, т.54, приложение, с. S32-S36.	1
A	СТАСЮК А.И. и др. Проявление хозяйственно важных признаков у яровых гибридов мягкой пшеницы, отобранных с помощью mas-технологии при скрещивании озимых сортов с яровыми донорами устойчивости к бурой ржавчине. Сельскохозяйственная биология, 2017, том 52, №3, с.526-534, [найдено 2020-08-06]. Найдено в <doi: 10.15389/agrobiology.2017.3.526rus>.	1
A	KUMAR S. et al. Genetics of flowering time in bread wheat Triticum aestivum: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. J. Genet., 2012, v.91. No.1, p. 33-47 (реферат), [найдено 2020-08-06]. Найдено в <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-012-0149-3>.	1

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

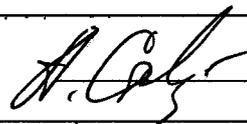
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **07/08/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальник Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В.Чебан