

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091953** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.01.31**

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)  
*C12Q 1/686* (2006.01)  
*C12Q 1/6806* (2006.01)  
*C12Q 1/6895* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.07.27**

**(54) СПОСОБ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ ИЗ ГИБРИДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ НА ОСНОВЕ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СУММАРНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ГЕНОТИПИРОВАНИЕМ ПОТОМКОВ**

(96) **KZ2020/036 (KZ) 2020.07.27**

(71) Заявитель:  
**НЕКОММЕРЧЕСКОЕ  
АКЦИОНЕРНОЕ  
ОБЩЕСТВО "КАЗАХСКИЙ  
АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ САКЕНА  
СЕЙФУЛЛИНА" (KZ)**

(72) Изобретатель:

**Куришбаев Ахылбек Кажигулович,  
Турбекова Арысгуль Сапаралиевна  
(KZ), Шавруков Юрий Николаевич  
(AU), Джатаев Сатывалды Адиевич,  
Хасанова Гульмира Жумагалиевна,  
Байдюсен Акмарал Амантаевна (KZ),  
Кейфлин Соуле (AU), Зотова Людмила  
Петровна (KZ)**

(74) Представитель:

**Сауганбаев А.У. (KZ)**

(57) Изобретение относится к области геномной селекции и может быть использовано в сельском хозяйстве, а именно в растениеводстве и селекции сельскохозяйственных культур. Технической задачей изобретения является создание нового усовершенствованного способа селекции растений, который приводит к упрощению метода, ускорению отбора генотипов и получению более точных результатов. Предлагаемый способ ускоряет проведение селекции, уменьшает затраты труда и улучшает качество выделенных селекционных форм за счет их более точного анализа по генотипам, а не по фенотипам, как принято в традиционной селекции. Полученные результаты молекулярных исследований используют для отбора наиболее перспективных растений среди потомков из гибридных популяций. Технический результат достигается за счет полук количественного анализа суммарной экспрессии генов, который ранее никогда не применяли для отборов перспективных форм в селекции сельскохозяйственных культур, с последующим генотипированием растений с помощью удобного молекулярного маркера. При этом, только совместное и последовательное применение указанных методов приводит к достижению желаемого результата, который используют для отбора наиболее перспективных растений среди потомков из гибридных популяций.

**A1**

**202091953**

**202091953**

**A1**

**Способ селекции растений из гибридных популяций на основе усовершенствованного полуколичественного анализа суммарной экспрессии генов с последующим генотипированием потомков**

Изобретение относится к области геномной селекции и может быть использован в сельском хозяйстве, а именно, в растениеводстве и селекции сельскохозяйственных культур. Развитие современной науки и техники приводят к изменениям в методах селекции растений. Молекулярные технологии геномной селекции сельскохозяйственных культур развиваются особенно активно, что приводит к модернизации методов отбора, ускорению работы с получением более точных конечных результатов на основе генотипов растений. Анализ экспрессии генов с последующим генотипированием растений является примером такой геномной селекции сельскохозяйственных культур.

Известен метод полуколичественного анализа экспрессии выделенных ранее генов, описанный в опубликованной статье: Чен В.Р., Фен И., Чао И.Э., Ян С.Э. Геномный анализ и специфичность экспрессируемых генов *OsZIP1*, *OsZIP3* и *OsZIP4* у двух сортов риса с различной эффективностью усвоения цинка // Физиология Растений. - 2008. - Т.55, № 3.- С. 441-452. Однако, авторы выделяли РНК и синтезировали кДНК из отдельных растений и даже отдельных тканей растений, что является очень трудоемким, длительным и дорогостоящим этапом работы.

Авторы не готовили суммарную смесь всех образцов растений или выделенных образцов РНК, не синтезировали на ее основе общую кДНК и не применяли полуколичественный анализ экспрессии выделенных генов на основе суммарной смеси кДНК из всех изучаемых образцов растений. Дополнительно, авторы также не проводили генотипирование изучаемых растений.

Известен метод, описанный в заявке на изобретение № 2016130577, от 22.12.2014, под названием: «Улучшенные способы молекулярной селекции», который в том числе основан на «...генотипировании размножающихся индивидов по множеству маркеров» у различных видов растений. Сходная заявка на изобретение № 2014110321/10, от 18.03.2014, под названием: «Способ геномной селекции крупного рогатого скота», который среди других пунктов также основан на «...генотипировании особей референтной популяции» у сельскохозяйственных животных.

Недостатками обоих способов, использованных в указанных выше заявках, является то, что авторы не выделяли гены, которые могут контролировать признаки урожайности и другие важные агрономические признаки, а также не использовали анализ экспрессии выделенных генов.

Известен метод, описанный в заявках на изобретение № 001039 от 08.28.2000, под названием «Способ интеграции экзогенной ДНК в геном растительной клетки и способ получения фертильного трансгенного растения с интегрированной в геном экзогенной ДНК»; изобретение № 001150 от 10.30.2000, под названием «Способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур с использованием глифосата и его производных»; а также изобретение №002757 от 29.08.2002, под названием «Растительный промотор и содержащий его фрагмент ДНК и вектор экспрессии». В отмеченных выше изобретениях авторы использовали метод анализа экспрессии трансгенов, векторов и полезных генов, соответственно, в клетках растений после генетической трансформации.

Недостатком способов, указанных в данных заявках, является их ограниченное действие только у трансгенных растений, а также авторы не использовали полуколичественный метод анализа экспрессии, не проводили генотипирование растений и не применяли описанные методы для геномной селекции растений.

Наиболее близким аналогом (прототипом) является способ анализа экспрессии генов растений с последующим их генотипированием при помощи удобного молекулярного маркера, описанный в статье: Zotoval L., et al. The general transcription repressor *TaDr1* is co-expressed with *TaVrn1* and *TaFT1* in bread wheat under drought // Front. Genet. - 2019. - V. 10. -ArticleID: 63.DOI: 10.3389/fgene.2019.00063.

Однако, авторы использовали более сложный, трудоемкий, длительный и дорогостоящий метод количественной ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) и не проводили полуколичественный анализ суммарной экспрессии выделенных генов.

Технической задачей изобретения является создание нового усовершенствованного способа селекции растений, который приводит к упрощению метода, ускорению отбора генотипов и получению более точных результатов. Технический результат достигается за счет полуколичественного анализа суммарной экспрессии генов, без количественной ПЦР в режиме реального времени, но с последующим генотипированием растений с помощью удобного молекулярного маркера. При этом, только совместное и последовательное применение указанных методов приводит к достижению желаемого результата, который используют для отбора наиболее перспективных растений среди потомков из гибридных популяций.

Предлагаемый усовершенствованный способ сокращает селекционный процесс, уменьшает финансовые затраты и улучшает качество выделенных селекционных форм на основе способа с более точными результатами анализа по генотипам, а не по фенотипам, как принято в традиционной селекции. Предлагаемый способ селекции применим для любых видов сельскохозяйственных культур и на любом этапе селекции и отборов, т.к. наследование признака остается неизменным в ряду поколений. Однако, предлагаемый усовершенствованный способ никогда ранее не применяли для отборов перспективных форм в селекции растений.

В предлагаемом способе селекции растений проводят анализ отдельных генов, которые необходимо выделить заранее. В зависимости от природы выделенного гена (структурный или регуляторный), а также признака, который он контролирует (качественный или количественный), предлагаемый способ дает более или менее четкие результаты, т.е. частота ошибки может возникать с меньшей или большей степенью вероятности, соответственно. Например, многие важные признаки урожайности или устойчивости растений к абиотическим стрессам имеют полигенный контроль, т.е. много (или несколько) генов определяют выражение таких признаков. Для предлагаемого способа важно выделить и использовать гены, которые имеют максимальное или хотя бы значительное выражение в изучаемом признаке. Выделение такого важного гена является необходимым условием, а природа генетического контроля признака и его фенотипическое выражение являются особенностями предлагаемого способа.

Образец (пример) предлагаемого способа: Отбор высокоурожайных и устойчивых к абиотическим стрессам селекционных линий среди потомств гибрида ярового ячменя Гранал × Байшешек с помощью анализа суммарной экспрессии и генотипирования по гену *HvSAP12*, контролирующему транскрипционный фактор Цинковый палец с доменом A20/AN1. Предлагаемый способ состоит из следующих этапов, каждый из которых имеет свои особенности:

(1) Необходимо иметь нуклеотидную последовательность (сиквенс) выделенного гена для дальнейшей работы. Такие сиквенсы можно обнаружить и выделить из Баз данных, доступных для любого пользователя, а также исследователь может провести секвенирование выделенного гена самостоятельно.

(2) Необходимо получить полную информацию о наличии сходных генов – генных семейств или групп. С помощью биоинформатики провести BLAST-сравнение среди семейства генов (Фигура 1) и выделить наиболее различающиеся участки нуклеотидной

последовательности изучаемого гена. Для изучения роли уникального гена необходимо разработать праймеры только в специфических фрагментах гена.

(3) Провести опыт с растениями той культуры и того гибрида, которые ученый собирается изучать, собрать образцы листьев с растений в условиях стресса (или обработки), например, с признаками увядания или пожелтения листьев, болезней, наступления фазы развития и т.п.

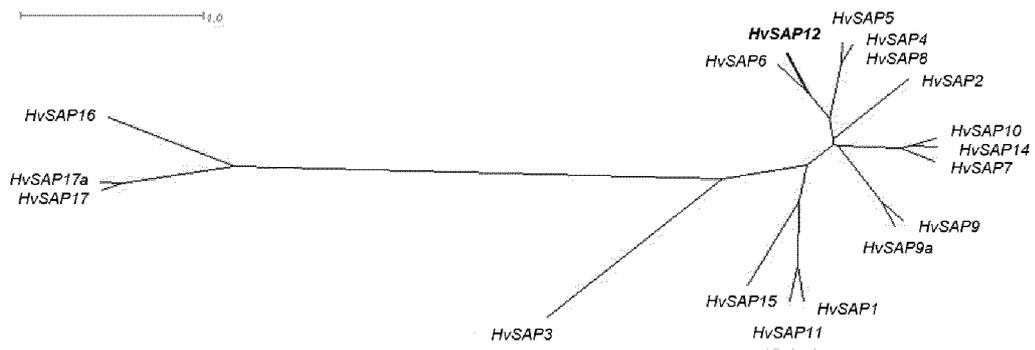
(4) Выделить РНК из смеси собранных образцов листьев и синтезировать одну общую к-ДНКовую библиотеку на основе суммарных выделенных образцов РНК любым доступным способом. Провести ПЦР на основе к-ДНК и любого протокола с доступными реагентами, со специфическими праймерами для каждого гена в изучаемом семействе. Интенсивность бэндов при разделении продуктов амплификации в электрофорезе указывает на степень полуколичественной экспрессии гена, что свидетельствует о существенном влиянии данного гена на изучаемый признак (Фигура 2). Данный этап представляет собой упрощение и ускорение метода полуколичественного анализа на основе суммарной экспрессии выделенного ранее гена.

(5) Для выделенного гена с подтвержденной экспрессией провести секвенирование у родительских форм изучаемого гибрида и выявить различия, хотя бы по одному нуклеотиду. Разработать аллель-специфические праймеры и провести генотипирование по выделенному гену среди потомков в расщепляющейся популяции при сравнении их с генотипами родителей.

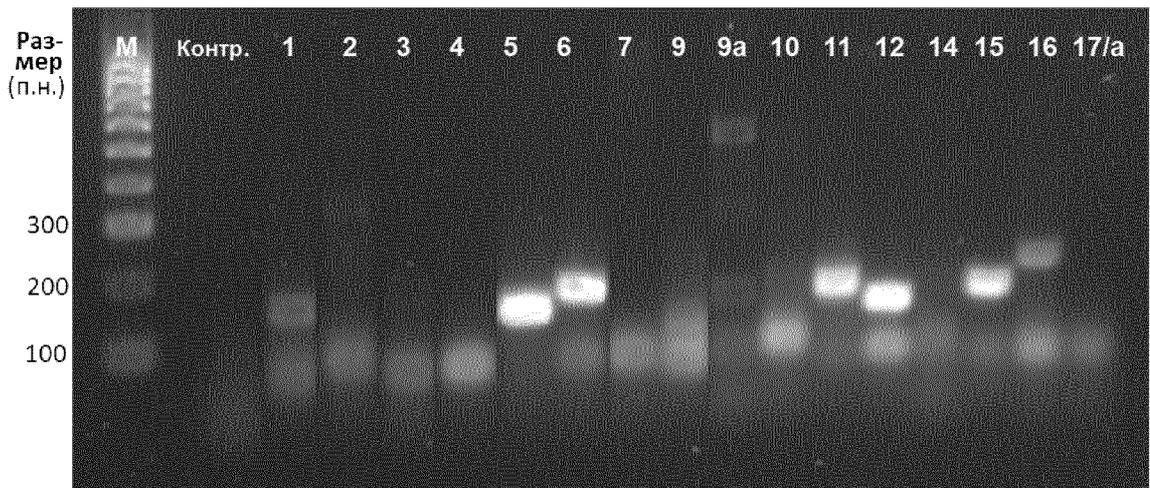
(6) Результаты генотипирования по выделенному гену дают возможность разделить потомков любого поколения по генотипам на три группы: гетерозиготы по материнскому или отцовскому аллелям, а также гомозиготы, и провести отборы желательных генотипов на ранних стадиях развития растений (Фигура 3).

**Формула изобретения**

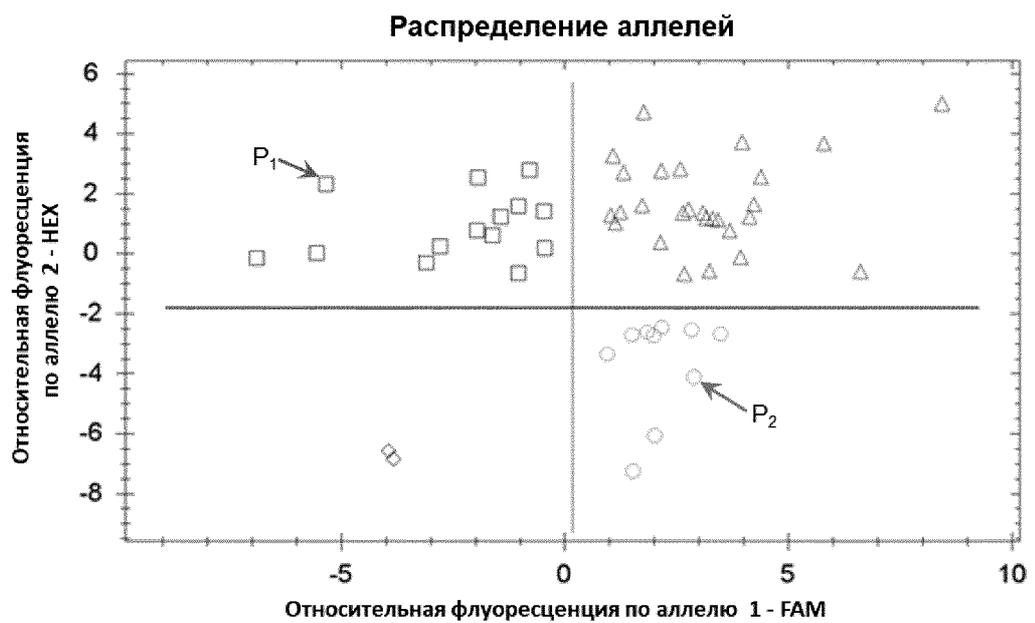
Способ селекции растений из гибридных популяций на основе усовершенствованного полуколичественного анализа суммарной экспрессии генов с последующим генотипированием потомков, включающий анализ экспрессии генов и генотипирование растений, и отличающийся тем, что собирают образцы растений и выделяют суммарную РНК, синтезируют общую кДНК, проводят ПЦР на основе общей кДНК со специфическими праймерами для выделенного гена-кандидата, разделяют ПЦР продукты в агарозном геле и проводят полуколичественный анализ суммарной экспрессии генов по интенсивности бэндов ПЦР, и не проводят количественную ПЦР в режиме реального времени.



Фигура 1.



Фигура 2.



Фигура 3.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202091953****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

**A01H 1/04** (2006.01)  
**C12Q 1/686** (2006.01)  
**C12Q 1/6806** (2006.01)  
**C12Q 1/6895** (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
 A01H 1/04, C12Q 1/686, 1/6806, 1/6895

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ZOTOVA Lyudmila et.al. The General Transcription Repressor TaDr1 Is Coexpressed With TaVrn1 and TaFT1 in Bread Wheat Under Drought. Front Genet. 2019, Feb 8;10:63 pp.1-11 doi: 10.3389/fgene.2019.00063	1
Y	ХРИСТЕНКО Валерия Сергеевна. Роль генов кальций-зависимых протеинкиназ VaCDPK13, VaCDPK20, VaCDPK21, VaCDPK26 и VaCDPK29 в устойчивости винограда VITIS AMURENSIS RUPR. К абиотическим стрессам. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владивосток, 2018	1
Y	ЮРЬЕВА Наталия Олеговна и др. Экспресс-метод скрининга трансгенных растений картофеля по интенсивности флуоресценции репортерного белка GFP Вестник Московского Университета, Серия 16: Биология, 2018. Том 73, № 2, с. 85-92	1

 последующие документы указаны в продолжении

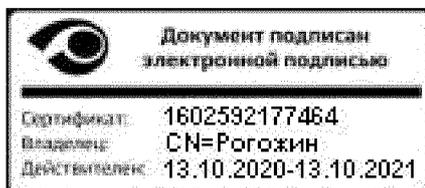
\* Особые категории ссылочных документов:

«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: **25/05/2021**

Уполномоченное лицо:  
 Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин