

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042310**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.02

(21) Номер заявки
202000025

(22) Дата подачи заявки
2020.01.30

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

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

(31) **2019114004**

(32) **2019.05.06**

(33) **RU**

(43) **2020.11.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**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)**

(56) SU-A1-1702976
SU-A1-1597123
WO-A2-2014011859

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>.

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. 532-536.

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, т. 52, № 3, с. 526-534, [найдено 2020-08-06]. Найдено в <doi:10.15389/agrobiology.2017.3.526rus>.

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, №.1, p. 33-47 (реферат), [найдено 2020-08-06]. Найдено в <http://dx.doi.org/10.1007/s12041-012-0149-3>.

(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 F₁ самоопыляют до поколения F₂. Из поколения F₂ с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1b отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель нечувствительности к фотопериоду Ppd-D1a. Отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1b растения F₂ проверяют ПЦР-маркерами 2a, 3a, 3b, 4a, 4b 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.

B1**042310****042310 B1**

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 ч) 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). Основной принцип 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 удлинённым 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_1 самоопыляют до поколения F_2 . Из поколения F_2 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_2 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_1 самоопыляют до поколения F_2 . Из поколения F_2 с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1a и 1б (*Ppd1_F* / *Ppd1_R1* / *Ppd1_R2*) отбирают растения, содержащие аллель *Ppd-D1a* в гомозиготном состоянии. Отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1a и 1б растения F_2 с аллелем *Ppd-D1a* проверяют аллель-специфичным маркером 2a (*Vrn1AF/VRN1-INT1R*) для выявления аллеля *Vrn-Ala*; марке-

рами 3а ((Intr1/B/F/Intr1/B/R3) и 3б (Intr1/B/F/Intr1/B/R4) для выявления аллеля Vrn-B1c, маркерами 4а (FT-B-INS) и 4б (FT-B-NOINS) для выявления аллеля Vrn-B3a. Растения поколения F₂, отобранные с помощью ПЦР-маркеров 1а, 1б, 2а, 3а, 3б, 4а, 4б, самоопыляют до поколения F₃ 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-D1a, а также аллели Vrn-A1a, Vrn-B1c и Vrn-B3a, определяющие ранние сроки колошения;

из поколения F₂ с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1а и 1б отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель Ppd-D1a, определяющий нечувствительность к фотопериоду, что позволяет на ранних стадиях создания линий мягкой пшеницы быстро отбирать растения способные выколашиваться независимо от длины светового дня;

растения F₂, отобранные с помощью молекулярных маркеров 1а и 1б, анализируют с помощью аллель-специфичных маркеров 2а, 3а, 3б, 4а, 4б, для отбора растений, содержащих в гомозиготном состоянии аллели Vrn-A1a, Vrn-B1c и Vrn-B3a, 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 F₁ самоопыляли до поколения F₂ и в поколении F₂ с помощью ПЦР-маркеров 1а и 1б отбирали растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель Ppd-D1a. Структура использованных праймеров представлена в табл. 1.

Результаты анализа для ПЦР-маркеров 1а и 1б с геномной ДНК родительских сортов "Тулун 15", "Обская 2" и растений поколения F₂, 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 F₂, содержащие аллель Ppd-D1a в гомозиготном состоянии, проверяли с помощью аллель-специфичных праймеров (табл. 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 F₂ 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 F₂ приведены на фиг. 3, из которой видно, что сорта Тулун 15, Обская 2 и все растения F₂ амплифицируют фрагмент длиной 737 пар нуклеотидов, соответствующий аллелю Vrn-B1c.

Анализ сортов "Тулун 15", "Обская 2" и растений F₂ 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 F₂, 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 F₂, отобранные с помощью 1а, 1б, 2а, 3а, 3б, 4а, 4б самоопыляли до поколения F₃ и в полевых условиях проводили оценку сроков колошения. Результаты представлены в табл. 2.

Из табл. 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 F₃, 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-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.

Таблица 1

Наименование маркера	Метод диагностики	Размер п.н.	маркируемый аллель	Наименование и структура праймеров [Литературный источник]
Маркер 1a Маркер 1b	ПЦР + электрофорез	288 414	Ppd-D1a Ppd-D1b	Ppd1_F / Ppd1_R1 / Ppd1_R2 ACGCTCCCACTACACTG GTTGGTTCAAACAGAGAGC CACTGGTGGTAGCTGAGATT [7]
Маркер 2a	ПЦР + электрофорез	965 + 876 734	Vrn-A1a vrn-A1	VRN1AF / VRN1-INT1R GAAAGGAAAAATTCTGCTCG/ GCAGGAAATCGAAATCGAAG [8]
Маркер 3a	ПЦР + электрофорез	1124 737	Vrn-B1a Vrn-B1c	Intr1/B/F / Intr1/B/R3 CAAGTGGAACGGTTAGGACA CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA [9]
Маркер 3b	ПЦР + электрофорез	1149	vrn-B1	Intr1/B/F / Intr1BR4 CAAGTGGAACGGTTAGGACA/ CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA [9]
Маркер 4a	ПЦР + электрофорез	1200	Vrn-B3a	FT-B-INS CATAATGCCAAGCCGGTGAGTAC ATGTCTGCCAATTAGCTAGC [2]
Маркер 4b	ПЦР + электрофорез	1140	vrn-B3	FT-B-NOINS ATGCTTTCGCTTGCCATCC CTATCCCTACCGGCCATTAG [2]

Таблица 2

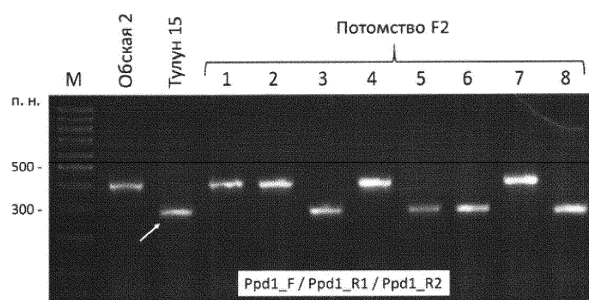
Образец	Время колошения (дни)	Наличие ПЦР-маркеров к аллелю <i>Ppd-D1a</i>	Наличие ПЦР-маркеров к аллелю <i>Vrn-A1a</i>	Наличие ПЦР-маркеров к аллелю <i>Vrn-B1c</i>	Наличие ПЦР-маркеров к аллелю <i>Vrn-B3</i>
«Тулун 15»	38	присутствует	присутствует	присутствует	присутствует
«Обская 2»	43	отсутствует	присутствует	присутствует	отсутствует
Растение 1	40	отсутствует	присутствует	присутствует	отсутствует
Растение 2	40	отсутствует	присутствует	присутствует	отсутствует
Растение 3	35	присутствует	присутствует	присутствует	присутствует
Растение 4	40	отсутствует	присутствует	присутствует	отсутствует
Растение 5	35	присутствует	присутствует	присутствует	присутствует
Растение 6	35	присутствует	присутствует	присутствует	присутствует
Растение 7	40	отсутствует	присутствует	присутствует	отсутствует
Растение 8	35	присутствует	присутствует	присутствует	присутствует

Источники информации

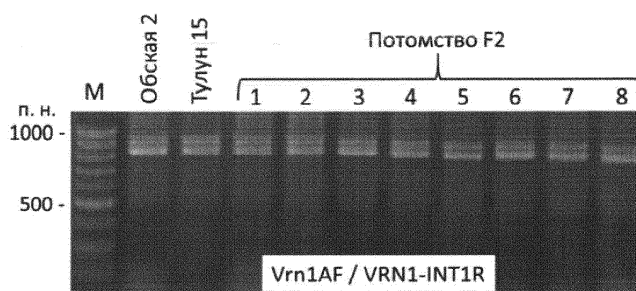
1. Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats//Euphytica. 1996. V. 89. P. 49-57.
2. Yan L., Fu D., Li C. et al.: The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT//Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19581-19586.
3. Потокина 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, стр. 77-86.
4. Способ определения у длиннодневных злаковых растений форм различной скороспелости и фотопериодической чувствительности. Патент РФ № 2300193, опублик. 10.06.2007.
5. Способ отбора форм пшеницы различной скороспелости и фотопериодической чувствительности. Патент РФ № 2065697, опублик. 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, стр. 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 polyploid wheat//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

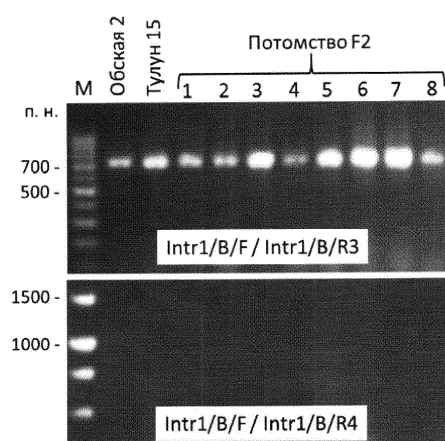
Способ отбора растений яровой мягкой пшеницы с укороченным сроком колошения, включающий скрещивание родительских образцов мягкой пшеницы, самоопыление гибридов первого поколения F_1 для получения гибридов второго поколения F_2 , среди которых с помощью молекулярных ПЦР-маркеров отбирают растения с генами, 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", из поколения F_2 с помощью молекулярных ПЦР-маркеров 1a и 1б, представленных в табл. 1, отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллель *Ppd-D1a*, анализируют растения F_2 , отобранные с помощью молекулярных маркеров 1a и 1б, с помощью аллель-специфичных маркеров 2a, 3a, 3б, 4a, 4б, представленных в табл. 1, отбирают растения, содержащие в гомозиготном состоянии аллели *Vrn-A1a*, *Vrn-B1c* и *Vrn-B3a*, определяющие ранние сроки колошения.



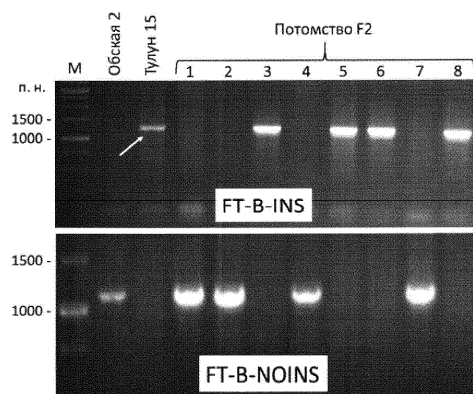
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

