



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 3137  
(51) A01H 1/04 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2017/0678.2

(22) 19.10.2017

(45) 24.09.2018, бюл. №36

(72) Абугалиева Сауле Изтелеуовна; Затыбеков Алибек Камзабекович; Энуарбек Шынар Нурланқызы; Туруспеков Ерлан Кенесбекович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Институт биологии и биотехнологии растений" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) CN 104357442 A, 18.02.2015

(54) **СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННЫХ ЛИНИЙ СОИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ KASP**

(57) Полезная модель относится к области сельского хозяйства, а именно к генетике и селекции скороспелости и продуктивности сои.

Задачей полезной модели является создание экспресс способа идентификации скороспелых и продуктивных линий сои на основе определения благоприятного аллеля ДНК-маркера, статистически достоверно связанного со скороспелостью и продуктивностью сои.

Результатом полезной модели является экономичность и ускорение отбора селекционно-ценных линий сои для селекции, а также достоверность и надежность данного метода. Результаты реализации данного исследования могут быть использованы в селекционных программах, направленных на повышение скороспелости сои.

Указанный результат достигается путем выделения ДНК из исследуемых линий, проведения ПЦР анализа с KASP маркером и последующим сканированием результатов амплификации на флуоресцентном приборе, который идентифицируют аллели в ДНК исследуемого генотипа. Экономичность данного анализа связана с устранением необходимости использования в анализе дорогостоящего метода электрофоретического разделения ДНК. Также, сканирование образцов и анализ полученных данных достигается в считанные минуты, что значительно ускоряет процесс отбора наиболее адаптивных и высокоурожайных образцов сои. Кроме того, эффективность данного анализа связана со специфичностью используемого ДНК-маркера, достоверно связанного со скороспелостью сои.

(19) KZ (13) U (11) 3137

Полезная модель относится к области селекции и семеноводства, в частности к молекулярной идентификации генотипов сои для маркер-вспомогательной селекции в целях повышения урожайности и скороспелости сои.

Целью полезной модели является повышение надежности и эффективности оценочных работ по выявлению и дифференциации высокопродуктивных сортов, коллекционных и селекционных номеров и линий сои.

Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) является перспективной бобовой культурой в Казахстане. Для скорейшего развития производства сои в нашей республике, необходимо выявлять наилучшие сорта, обладающие комплексом хозяйственно-ценных признаков, которые приспособлены к разным условиям экологических зон Казахстана [Закиева А.А. с сотр. 2015]. Для эффективного использования потенциала выращивания сои необходимо принятие мер по адаптации растениеводства, оптимизации видовой и сортовой структуры посевных площадей. В настоящее время селекция сои ведется в следующих направлениях: повышение продуктивности, скороспелости, стрессоустойчивости [Zhang et al. 2016, Cao et al. 2017, Zeng et al. 2017]. Своевременное цветение и созревание семян обеспечивает географическую адаптацию и успешное получение урожая сои; а такие признаки как количество семян на растение, урожайность на растение, масса 1000 семян являются важнейшими компонентами, определяющими продуктивность растений. Традиционная селекция, базирующаяся на классических методах и подходах отбора лучших генотипов по фенотипическим признакам, занимает много лет. В сочетании с методами классической селекции молекулярная селекция существенно сокращает время, необходимое для создания новых генотипов. Поэтому для ускорения и повышения эффективности отбора и создания новых конкурентноспособных сортов на современном этапе важно идентифицировать ценные генотипы-носители соответствующих генов (аллелей генов), отвечающих за проявление желаемых селекционно-ценных признаков сои для использования в

селекции, в т.ч. маркер-вспомогательной. В целях повышения эффективности селекционного процесса необходимо привлечение эффективных генетических маркеров, ассоциированных с селекционно-ценными признаками. Для оценки генетических ресурсов сои привлекают различные молекулярные маркеры, такие как RAPD, ISSR, AFLP, SSR, SNP и т.п., с помощью которых можно осуществлять ДНК-паспортизацию используемого материала для целенаправленной маркер-вспомогательной селекции [Jin et al. 2003; Абуғалиева и др.2012; Brown-Guedira et al. 2016].

Известен способ, в котором в качестве молекулярного маркера используется SSR (simple sequence repeats-прямые повторяющиеся последовательности) маркер для идентификации ЛКП (локус количественных признаков), ассоциированного с фазой цветения. Регион в области маркеров Sat\_128-Satt519-Sct\_026, представляет собой ЛКП, ассоциированный с фазой цветения сои. Данный способ состоит из следующих этапов: 1) выделение ДНК из исследуемых линий; 2) ПЦП анализ с использованием микросателлитного маркера Satt519; 3) проведение электрофореза и генетическое картирование с использованием программы MapQTL5.0. [Patent. CN 104357442. QTL mapping region for soybean flowering stage and obtaining methods as well as application. Kong F., Liu B., Lu S., Wang J., Cao D., Yuan X. /North-east Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences; apl.date 25.10.2014; pub.date 1.02.2015].

Недостатком данного способа является длительность и высокая стоимость процедур, использующих дорогостоящий этап электрофоретического разделения ДНК. KASP маркеры успешно заменяют другие типы маркеров в селекции и генетике растений как более надежные, поддающиеся автоматизации и экономичные типы маркеров [Shi et al. 2015, Patil et al. 2016].

В качестве настоящего изобретения предложен способ идентификации селекционноценных линий сои с использованием KASP маркера ipbb\_sd\_02 (Gm02, 51154756) (таблица 1).

Таблица 1

Информация по KASP-маркеру ipbb\_sd\_02

Название маркера	Название SNP маркера	Хромосома	Позиция на хромосоме	Аллели	Расположение SNP в геноме сои
Ipbb_sd_02	BARC_1.01_Gm02_51154756	2	51154756	С/Т	Генное

Данный ДНК-маркер статистически достоверно связан с признаками: время от всходов до созревания (дни), время от образования бобов до созревания (дни), время от цветения до созревания (дни), количество семян на растение (шт), урожайность на растение (г), масса 1000 семян (г). KASP (competitive allele specific PCR (polymerase chain reaction), Semagn et al. 2013) маркер был конвертирован из SNP маркера BARC\_1.01\_Gm02\_51154756, выявленного в результате секвенирования.

Отбор SNP маркеров предварительно осуществлялся с использованием полногеномного анализа ассоциаций (GWAS - Genome-Wide Association Studies) на основе данных генотипирования 120 сортов и линий коллекции сои - секвенирования с использованием 6 тысяч таких SNP маркеров на основе технологии Illumina. На основе использования полевых данных по двум годам (2015-2016 гг.) в трех регионах Казахстана (Алматинская, Восточно-Казахстанская и Костанайская области) и с помощью GWAS был

идентифицирован маркер BARC\_1.01\_Gm02\_51154756. Результаты t-теста позволили выявить статистически достоверную значимость по ряду признаков для коллекции сортов и линий сои в соответствии с двумя аллелями маркера BARC\_1.01\_Gm02\_51154756 (таблица 2).

Изобретение (полезная модель) относится к области сельского хозяйства, а именно к селекции и семеноводству, и может быть использовано научными учреждениями при оценке образцов генофонда, гибридизации (подбор пар для скрещивания), скрининге и выделении высокопродуктивных образцов сои.

Задачей изобретения является создание экспресс-способа идентификации скороспелых и продуктивных линий сои с помощью определения желаемого аллеля ДНК-маркера, достоверно связанного со скороспелостью и урожайностью сои.

Техническим результатом изобретения является экономичность, надежность, ускорение отбора селекционно-ценных линий сои для селекции, безопасность, достоверность данного метода. Результаты реализации данного исследования могут быть использованы в селекционных программах, направленных на повышение продуктивности и скороспелости сои.

Указанный результат достигается путем выделения ДНК из исследуемых образцов сои, проведения ПЦР анализа с флуоресцентным KASP маркером ipbb\_sd\_02 и последующим сканированием результатов амплификации на приборе Fluoroscanner Ascent (США), который идентифицирует тип аллеля исследуемого ДНК-маркера.

Способ осуществляется следующим образом.

Выделение ДНК из растительного материала сои проводится по методу Dellaporta et al. (1973).

Полимеразная цепная реакция проводится в соответствии с инструкциями производителя реактивов для амплификации (KBioscience LGC Group).

Для проведения ПЦР использовали набор праймеров следующего состава:

Прямой праймер 1-

CAAATAGCGAAAGTGCAATTGGAATGGATG  
AACSTTCTGAATTCATTTTGACC

Прямой праймер 2-

CAAATAGCGAAAGTGCAATTGGAATGGATG  
AACSTTCTGAATTCATTTTGACT

Обратный праймер-

TCTCCAATTATCTCGTCTTATAGGGGATG

Реакционная смесь для ПЦР объемом 5 мкл состоит из 2 мкл ДНК концентрацией 10 нг/мкл (предварительно высушенной); 2,4 мкл 2x KASP Master mix (включает FRET кассеты FAM, HEX, краситель ROX, Taq-полимеразу, свободные нуклеотиды, MgCl<sub>2</sub> в оптимизированном буферном растворе); 0,072 мкл KASP Assay mix (включает

аллель-специфические праймера), 2,4 мкл бидистиллированной воды.

Амплификация проводилась в термоамплификаторе Veriti (США). Условия термоциклирования включают активацию при 94°C в течение 15 мин. (1 цикл), денатурацию при 94°C в течение 20 сек., отжиг/ элонгацию при 61-55°C в течение 60 сек. (каждый цикл снижать температуру на 0,6°C) (10 циклов), денатурацию при 94°C в течение 20 сек., отжиг/ элонгацию при 55°C в течение 60 сек. (26 циклов).

В первой стадии ПЦР к рабочей смеси добавляют смесь праймеров KASP, которая содержит два специфичных для каждого аллеля прямых праймеров (с уникальной концевой последовательностью) и один обратный праймер. Специфичность прямых праймеров позволяет им связываться с соответствующим SNP, общий обратный праймер присоединяется к 3'-концу. Завершается первый раунд ПЦР, в результате которого аллель-специфический праймер включается в ДНК-матрицу. В течение этой стадии, флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды остаются связанными с комплементарными олигонуклеотидами-гасителями и флуоресцентный сигнал не образуется. Во второй стадии ПЦР один из флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов, соответствующий амплифицированному аллелю также включается в матрицу, и соответственно, больше не связан с олигонуклеотидом-гасителем. Флуорохром высвобождается и генерируется флуоресцентный сигнал. Эти стадии повторяются несколько раз, тем самым флуоресцентный сигнал постепенно усиливается, по мере того, как больше флуоресцентных праймеров используется в процессе амплификации. Если генотип гомозиготен, генерируется только один из двух возможных флуоресцентных сигналов. Если генотип гетерозиготен, образуется смешанный флуоресцентный сигнал [Semagn et al. 2013].

Сканирование продуктов амплификации проводилось с использованием прибора Fluoroscanner Ascent (США). Визуализация результатов сканирования осуществлялась с использованием программы Kluster Caller (LGC Group) ([www.lgcgroup.com/software](http://www.lgcgroup.com/software)).

Пример подтверждения результатов опытным путем

В результате анализа 94 сортов и линий коллекции сои произошло расщепление на аллели С и Т (фиг.1).

На основе результатов генотипирования с использованием KASP SNP маркера и данных фенотипических признаков, полученных из трех регионов Казахстана был проведен статистический анализ t-test в программе STATISTIKA 13.2 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)) (таблица 2). Статистически значимыми различия принимаются при  $p < 0,05$ .

Результаты t-теста коллекции сортов и линий сои по аллелям маркера *ipbb\_sd\_02*

Признак (фаза роста)/Регион	Юго-восток 2015	Восток 2015	Север 2015	Юго-восток 2016	Восток 2016	Север 2016
Время от всходов до созревания (дни)				***	*	
Время от образования бобов до созревания (дни)	**	*	*	**		
Время от цветения до созревания (дни)	**	*	**	**		
Количество семян на растении (шт)			*			*
Урожайность на растении (г)						*
Масса 1000 зерен (г)		*			*	

Примечание: Значения \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

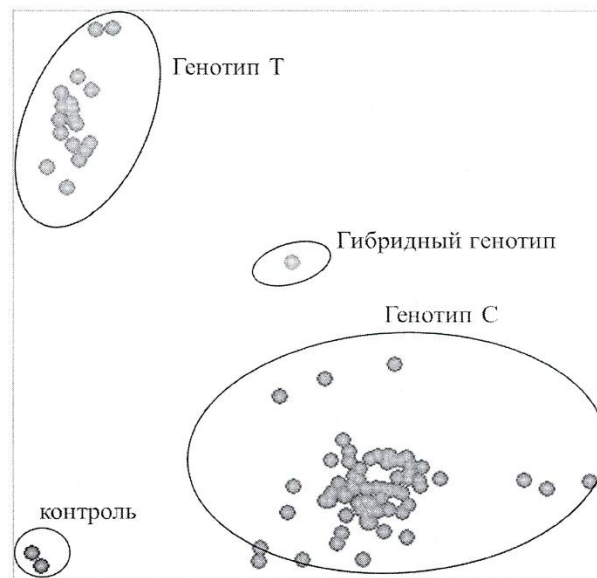
Использование изобретения позволит:

- ускорить идентификацию высокопродуктивных и скороспелых линий сои;
- уменьшить затраты на идентификацию хозяйственно-ценных линий сои;
- осуществить экспресс характеристику коллекции, используемой для селекции новых сортов сои.

#### **ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ идентификации селекционно-ценных линий сои с использованием технологии KASP на основе проведения полимеразной цепной реакции,

включающий набор праймеров *ipbb\_sd\_02* – прямые: праймер *ipbb\_sd\_02-1* – 5'-CAAATAGCGAAAGTGCAATTGGAATGGATGAA CCTTCTGAATTCATTTTGACC, праймер *ipbb\_sd\_02-2* – 5'-CAAATAGCGAAAGTGCAATTGGAATGGATGAA CCTTCTGAATTCATTTTGACT; обратный праймер *ipbb\_sd\_02-3* – 3'-TCTCCAATTATCTCGTCTTATAGGGGATG, при этом сканирование продуктов амплификации проводят с помощью флуоресцентного анализатора на наличие специфического аллеля ДНК-маркера, связанного с селекционно-ценными признаками сои.



Фиг. 1 – Результаты амплификации 94 сортов и линий коллекции сои по маркеру *ipbb\_sd\_02*