



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 5061
(51) C12Q 1/6806 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0116.2

(22) 04.02.2020

(45) 09.10.2020, бюл.№40

(72) Энуарбек Шынар Нұрланқызы; Абугалиева Сауле Изтелеуовна; 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) US 20140377745 A1, 25.12.2014

(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЕЛЕКЦИОННО-ЦЕННЫХ ЛИНИЙ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ (T. DURUM DESF.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПО ТЕХНОЛОГИИ KASP

(57) Полезная модель относится к области сельского хозяйства, а именно к генетике и селекции на повышение урожайности и скороспелости твердой пшеницы (T. durum Desf.).

Задачей полезной модели является создание экспресс способа идентификации продуктивных линий пшеницы на основе определения благоприятных аллелей ДНК-маркеров, статистически достоверно связанных с урожайностью пшеницы.

Результатом полезной модели является экономичность и ускорение отбора селекционно-

ценных линий твердой пшеницы для селекции, а также достоверность и надежность данного метода. Результаты реализации данного исследования могут быть использованы в селекционных программах, направленных на повышение продуктивности пшеницы.

Указанный результат достигается путем выделения ДНК из исследуемых линий, проведения ПЦР-анализа с набором KASP-маркеров и последующим сканированием результатов амплификации на флуоресцентном приборе, который позволяет визуализировать дифференциацию по аллелям 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 твердой пшеницы. Кроме того, эффективность данного анализа связана со специфичностью используемого ДНК-маркера, достоверно связанного с урожайностью твердой пшеницы.

Результат полезной модели может быть успешно использован во всех селекционных учреждениях, связанных с селекцией твердой пшеницы в Казахстане.

(19) KZ (13) U (11) 5061

Полезная модель относится к области селекции и семеноводства, в частности к молекулярной идентификации генотипов твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) для маркер-вспомогательной селекции в целях повышения урожайности и скороспелости твердой пшеницы.

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

Твердая пшеница (*T. durum*) является важной тетраплоидной культурой, выращиваемой в Казахстане. Одними из основных направлений селекции твердой пшеницы являются повышение продуктивности, скороспелость и качество зерна [Цыганков с сотр. 2013]. Продуктивность является сложным количественным признаком, детерминируется кооперативным действием многих генетических систем и подвержена эффекту взаимодействия «генотип-среда» [Драгавцев В.А. 2012]. Идентификация генотипов по фенотипическим признакам остается одним из методов традиционной селекции. При этом создание новых сортов занимает много лет. Поэтому для ускорения и повышения эффективности отбора лучших генотипов, носителей генов (аллелей генов), отвечающих за проявление желаемых селекционно-ценных признаков, и создания новых конкурентноспособных сортов используются современные методологии маркер-опосредованной селекции [Collard et al. 2005]. В этой связи, актуальным является генотипирование сортового генотипа и генетического и селекционного материала (дигиплоидные линии, рекомбинантно-инбредные линии и т.п.) с целью выявления аллелей ДНК-маркеров, ассоциированных с показателями урожайности и качества, стрессоустойчивости и скороспелости [Sehgal et al. 2017]. Успешная реализация данного подхода невозможна без использования современных эффективных генетических маркеров, ассоциированных с селекционно-ценными признаками. К настоящему времени разработано множество типов молекулярных маркеров, таких как RAPD, ISSR, AFLP, SSR, SNP и т.п., с помощью которых осуществляется ДНК-паспортизация используемого материала, создание генетических и признаковых коллекций для целенаправленной MAS селекции [Ramya et al. 2010; Абугалиева и др. 2012; Wiśniewska et al. 2016]. Основной принцип MAS (маркер-вспомогательная селекция) заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер-признак (АМП) в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий. После того как АМП установлены, создание новых генотипов может продолжаться с привлечением традиционных методов селекции (скрещивание, беккроссирование, самоопыление и отбор) [Леонова И.Н. 2013]. В настоящее время, SNP маркеры являются наиболее перспективными и удобными маркерами, ввиду их

плотного распределения по всему геному, эволюционной стабильности и возможности автоматизации анализа и генотипирования. Постоянно разрабатываются новые методы генотипирования SNP, реактивы для генотипирования, а также новые платформы. Поэтому трудно выделить лучшую технологию из доступных на сегодняшний день. Например, SNP чипы на основе гибридизации позволяют генотипировать большое количество локусов за один раз, но стоимость такого анализа высока. Кроме того, анализ генотипов различного генетического происхождения является затруднительным. Маркеры полиморфизма рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК (CAPS) могут быть также использованы для генотипирования SNP [Cheng et al. 2009], но трехэтапный процесс (ПЦР, гидролиз, электрофорез) затрудняет проведение высокопроизводительного генотипирования, а необходимость использования ферментов рестрикции повышает стоимость анализа [Шавруков Ю.Н. 2015]. Анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ, High Resolution Melting) позволяет производить скрининг образцов ДНК на однонуклеотидные полиморфизмы, однако типирование SNP аллелей зависит от мультиплексной ПЦР, которая может привести к ложноположительным результатам. Секвенирование является наиболее точным методом SNP идентификации, однако является дорогостоящей процедурой и требует профессионального биоинформатического анализа. Технология генотипирования KASP (Kompetitive Allele Specific PCR (polymerase chain reaction)), основанная на ПЦР и флуоресцентной детекции, удовлетворяет требованиям низко-, средне- и высокопроизводительного генотипирования, отличается высокой точностью, дешевизной, высокой гибкостью и конверсией, широким спектром применения.

Известен аналог, в котором для детекции и дискриминации уникального однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) используют 4 неспаренных нуклеотида на 3'-конце аллель-специфического праймера (-ов) в ПЦР реакции. Этот метод также включает флуоресцентно-меченный праймер (-ра) для детекции с использованием капиллярного электрофореза. Аллель-специфический праймер может иметь концевую последовательность на 5'-конце, что позволяет проводить точную дискриминацию между различными ампликонами. [Patent. US20140377745 (A1) USA, Method for enhanced SNP discrimination and detection / Kloet R.S., Kloet E., Kloet S.R., Kloet A.H., Walsh C.M.; US2014377745A1; apl. Date 19.06.2013; publ. date 25.12.2014]. Недостатком вышеуказанного способа является длительность и высокая стоимость процедур, использующих дорогостоящий этап электрофоретического разделения ДНК.

В качестве настоящей полезной модели предложен способ идентификации высокопродуктивных селекционно-ценных линий

твердой тетраплоидной пшеницы с использованием набора KASP-маркеров *ipbb_td_106* (5A), *ipbb_td_107* (6A), *ipbb_td_116* (2B), *ipbb_td_117* (2B), *ipbb_td_119* (1B) (таблица 1).

Таблица 1
– Информация по KASP-маркерам *ipbb_td_106*, *ipbb_td_107*, *ipbb_td_116*, *ipbb_td_117*, *ipbb_td_119*

Название KASP маркера	Название SNP маркера	Хромосома	Позиция на хромосоме, сМ	Аллели
<i>ipbb_td_106</i>	<i>wsnp_Ex_c22727_31934296</i>	5A	144,8	A/G
<i>ipbb_td_107</i>	<i>Excalibur_c22012_195</i>	6A	33,2	C/T
<i>ipbb_td_116</i>	<i>RAC875_c46661_184</i>	2B	87,7	G/T
<i>ipbb_td_117</i>	<i>wsnp_Ra_c4660_8405634</i>	2B	148,0	A/C
<i>ipbb_td_119</i>	<i>IACX906</i>	1B	106,0	G/T

Примечание сМ – сантиморганида

Данные ДНК-маркеры были статистически достоверно связаны с признаками продуктивности: длина колоса, время колошения, количество продуктивных (фертильных) колосьев, масса 1000 зерен.

KASP-маркеры, использованные в этой работе, были конвертированы из SNP маркеров. Отбор SNP маркеров осуществлялся по результатам полногеномного анализа ассоциаций (ПГАА) на основе данных генотипирования 225 образцов тетраплоидной пшеницы различного географического происхождения с использованием 16425 SNP маркеров на основе технологии Illumina

(Illumina® iSelect 90K wheat SNP assay, TraitGenetics GmbH.). На основе использования полевых данных тестирования по двум годам (2018 и 2019 гг.) в двух регионах Казахстана (Алматинская и Северо-Казахстанская области) и ПГАА были идентифицированы маркеры, ассоциированные с проявлением различных признаков адаптивности и продуктивности тетраплоидной пшеницы. Результаты ПГАА позволили выявить статистически достоверную значимость по ряду признаков для тетраплоидной пшеницы (таблица 2) и оценить генотипический эффект каждого маркера (таблица 3).

Таблица 2
– Оценка достоверности ассоциаций маркер-признак коллекции сортов тетраплоидной пшеницы по результатам ПГАА

Признак-маркер	Регион выращивания, год		
	Алматинская обл. 2018	Северо-Казахстанская обл.	
		2018	2019
Время колошения, количество фертильных колосьев (<i>ipbb_td_106</i>)	***		***
Количество фертильных колосьев (<i>ipbb_td_107</i>)	***		
Длина колоса (<i>ipbb_td_116</i>)			*
Длина колоса (<i>ipbb_td_117</i>)	*		*
Масса 1000 зерен (<i>ipbb_td_119</i>)	*	***	

Примечание: Значение * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Таблица 3
– Оценка генотипического эффекта KASP-маркеров

Название KASP маркера	Признак	Аллель	Генотипический эффект
<i>ipbb_td_106</i>	Время колошения	G	2.009
<i>ipbb_td_106</i>	Количество фертильных колосьев	G	0.449
<i>ipbb_td_107</i>	Количество фертильных колосьев	T	1.718
<i>ipbb_td_116</i>	Длина колоса	G	1.600
<i>ipbb_td_117</i>	Длина колоса	A	1.178
<i>ipbb_td_119</i>	Масса 1000 зерен	T	3.483

Полезная модель относится к области сельского хозяйства, а именно к селекции и семеноводству, и может быть использована селекционерами и научными учреждениями при оценке образцов генофонда, гибридизации (подбор пар для скрещивания), скрининге и выделении высокопродуктивных образцов твердой пшеницы.

Задачей изобретения является создание экспресс-способа идентификации скороспелых и продуктивных линий пшеницы с помощью определения благоприятных аллелей ДНК-маркеров, достоверно связанных с урожайностью твердой пшеницы.

Техническим результатом изобретения является экономичность и ускорение отбора селекционно-ценных линий твердой пшеницы для селекции, а также безопасность, достоверность и надежность данного метода. Результаты реализации данного исследования могут быть использованы в селекционных программах, направленных на повышение продуктивности твердой пшеницы в основных зерносеющих регионах Казахстана.

Указанный результат достигается путем выделения ДНК из исследуемых образцов твердой пшеницы, проведения ПЦР анализа с флуоресцентными KASP-маркерами и последующим сканированием результатов амплификации на приборе Fluoroscanner Ascent (США), который идентифицирует тип аллеля каждого из исследуемых ДНК-маркеров предложенного набора.

Способ осуществляется следующим образом.

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

Полимеразная цепная реакция проводится в соответствии с инструкциями производителя реактивов для амплификации (Kbioscience LGC Group). Синтез праймеров KASP проводится в компании LGC Genomics.

Реакционная смесь состоит из 2 мкл ДНК с концентрацией 10 нг/мкл (предварительно высушенной); 2,4 мкл 2x KASP Master mix (FRET-кассета, Таq-полимераза в оптимизированном буфере), 0,072 мкл KASP Assay mix, 2,4 мкл бидистиллированной воды.

Амплификация проводится в термоамплификаторе Veriti (США). Программа амплификации состоит из следующих этапов:

1. Активация: 94°C – 15 мин. – 1 цикл;
2. Денатурация: 94°C – 20 сек., Отжиг/Элонгация – 61- 55°C – 60 сек. (каждый цикл снижать температуру на 0,6°C) – 10 циклов;
3. Денатурация: 94°C – 20 сек, Отжиг/Элонгация – 55°C – 60 сек. – 26 циклов.

На первой стадии ПЦР к рабочей смеси добавляются смесь праймеров KASP, которая содержит два специфических для каждого аллеля прямых праймера и один общий обратный праймер. Каждый из аллель-специфических праймеров имеет заданную концевую последовательность на 5'-конце нуклеотидной цепи, что соответствует одной из FRET кассет: один меченый красителем FAM, другой – HEX. Аллель-специфичный праймер

связывается с матрицей и удлиняется, хвостовая последовательность праймера присоединяется к вновь синтезированной нити. Расщепление образцов по двум аллелям маркеров достигается за счет конкурентного связывания двух аллель-специфических прямых праймеров.

Во второй стадии ПЦР синтезируется комплементарная последовательность к аллель специфичной хвостовой части, являющейся сайтом связывания FRET-зонда, при участии общего обратного праймера.

Наконец, термоциклирование реакции ПЦР продолжается, начиная третью стадию KASP-реакции. Когда FRET-зонд связывается с матрицей ДНК, флуорофор и гаситель отходят друг от друга, что приводит к испусканию соответствующей флуоресценции. Если генотип по данному SNP является гомозиготным, то ожидается генерирование только одного из двух возможных флуоресцентных сигналов. Если генотип гетерозиготный, генерируется смешанный флуоресцентный сигнал [Semagn et al. 2013].

Сканирование продуктов амплификации осуществляется с использованием прибора Fluoroscanner Ascent (США), либо любого другого FRET-ридера микропланшетов. Визуализация результатов сканирования проводится с использованием программы KlusterCaller (LGC Group) (www.lgcgroup.com/software).

В результате анализа коллекции перспективных линий твердой пшеницы осуществляется генотипирование образцов с использованием двух альтернативных аллелей KASP-маркеров (фиг. 1-5).

В качестве статистического анализа используется статистический метод для оценки достоверности нулевой гипотезы. Статистически значимыми различия принимаются при $p < 0,05$.

Перечень фигур чертежей и иных материалов

Фиг.1 – Результаты амплификации 64 сортов твердой пшеницы по маркеру *ipbb_td_106* аллель G проявляет положительный генотипический эффект на признак NFS (количество фертильных колосьев) и негативный генотипический эффект на признак НТ (время колошения)

Фиг.2 – Результаты амплификации 64 сортов твердой пшеницы по маркеру *ipbb_td_107* аллель T проявляет положительный генотипический эффект на признак NFS (количество фертильных колосьев)

Фиг.3 – Результаты амплификации 64 сортов твердой пшеницы по маркеру *ipbb_td_116* аллель G проявляет положительный генотипический эффект на признак SL (длина колоса)

Фиг.4 – Результаты амплификации 64 сортов твердой пшеницы по маркеру *ipbb_td_117* аллель A проявляет положительный генотипический эффект на признак SL (длина колоса)

Фиг.5 – Результаты амплификации 64 сортов твердой пшеницы по маркеру *ipbb_td_119*

аллель Т проявляет положительный генотипический эффект на признак TKW (масса 1000 зерен)

Пример подтверждения результатов опытным путем

Для подтверждения полученных результатов дополнительно была изучена коллекция Т. durum, состоящая из 64 сортов и линий твердой пшеницы казахстанской, российской и зарубежной селекции, которую генотипировали с использованием набора

KASP-маркеров: ipbb_td_106, ipbb_td_107, ipbb_td_116, ipbb_td_117, ipbb_td_119. Данные полевых исследований и структурного анализа данной коллекции твердой пшеницы, выращенной в условиях двух регионов Казахстана в 2018 и 2019 году, были использованы для статистического анализа на подтверждение значимости данных маркеров для изученных компонентов урожайности пшеницы (таблицы 4-8).

Таблица 4

– Статистический анализ (t-тест) значимости KASP-маркера ipbb_td_106 с использованием фенотипических данных 64 образцов твердой пшеницы, выращенных в двух регионах Казахстана

Признак	Алматинская область						Северо-Казахстанская область					
	2018			2019			2018			2019		
	t	df	p	t	df	p	t	df	p	t	df	P
PH	-	-	-	-	-	-	2.738	11.62	0.018	-	-	-
PL	-	-	-	-	-	-	2.685	6.28	0.035	-2.428	10.40	0.035
NKS	-2.577	5.80	0.043	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WKS	-7.246	11.92	1.056e-05	-4.699	6.93	0.002	-	-	-	-2.632	5.36	0.043
WKP	-	-	-	-5.109	11.54	0.000	-	-	-	-	-	-
TKW	-3.449	5.19	0.017	-5.565	7.68	0.0006	-	-	-	-3.214	5.79	0.019
WKPM2	-	-	-	-4.056	11.36	0.002	-	-	-	-4.184	6.81	0.004

Примечание: PH – высота растения (см), PL – длина верхнего междоузлия (см), NKS – количество зерен на колос (шт), WKS – масса зерен на колос (г), WKP – масса на растение (г), TKW – масса 1000

зерен (г), WKPM2 – урожайность с 1 м² (г/м²), t – t-критерий Стьюдента, df – степень свободы, p – P-значение (значимость на уровне не выше 0,05)

Таблица 5

– Статистический анализ (t-тест) значимости KASP-маркера ipbb_td_107 с использованием фенотипических данных 64 образцов твердой пшеницы, выращенных в двух регионах Казахстана

Признак	Алматинская область			Северо-Казахстанская область					
	2019			2018			2019		
	t	df	p	t	df	p	t	df	P
NFS	-	-	-	-	-	-	-2.594	18.80	0.020
SL	-	-	-	2.478	6.76	0.04	-	-	-
NKS	-	-	-	-	-	-	-2.218	14.85	0.040
NKP	-3.415	24.06	0.002	-	-	-	-	-	-
WKP	-	-	-	-	-	-	-3.502	16.14	0.003
WKPM2	-2.414	24.34	0.024	-	-	-	-	-	-

Примечание: NFS – количество фертильных колосьев (шт), SL – длина колоса (см), NKS – количество зерен на колос (шт), NKP – количество зерен на растение (шт), WKP – масса зерен на

растение (г), WKPM2 – урожайность с 1 м² (г/м²), t – t-критерий Стьюдента, df – степень свободы, p – P-значение (значимость на уровне не выше 0,05)

Таблица 6

– Статистический анализ (t-тест) значимости KASP-маркера ipbb_td_116 с использованием фенотипических данных 64 образцов твердой пшеницы, выращенных в двух регионах Казахстана

Признак	Алматинская область						Северо-Казахстанская область		
	2018			2019			2019		
	t	df	p	t	df	p	t	df	p
WKS	-	-	-	-	-	-	2.089	30.29	0.045
TKW	3.067	43.47	0.004	3.215	43.38	0.002	2.204	41.43	0.033
WKPM2	-	-	-	-	-	-	2.525	31.76	0.017

Примечание: WKS – масса зерен на колос (г), TKW – масса 1000 зерен (г), WKPM2 – урожайность с 1 м² (г/ м²), t – t-критерий Стьюдента, df – степень свободы, p – P-значение (значимость на уровне не выше 0,05)

Таблица 7

– Статистический анализ (t-тест) значимости KASP-маркера ipbb_td_117 с использованием фенотипических данных 64 образцов твердой пшеницы, выращенных в двух регионах Казахстана

Признак	Алматинская область			Северо-Казахстанская область		
	2018			2018		
	t	df	p	t	df	p
PH	-3.075	4.58	0.031	-4.823	12	0.0004
NFS	-5.901	1.59	0.046	-	-	-
SL	-	-	-	-6.635	8.42	0.0001
WKS	5.743	1.69	0.042	-	-	-

Примечание: PH – высота растения (см), NFS – количество фертильных колосьев (шт), SL – длина колоса (см), WKS – масса зерен на колос (г), t – t-критерий Стьюдента, df – степень свободы, p – P-значение (значимость на уровне не выше 0,05)

Таблица 8

– Статистический анализ (t-тест) значимости KASP-маркера ipbb_td_119 с использованием фенотипических данных 64 образцов твердой пшеницы, выращенных в двух регионах Казахстана

Признак	Алматинская область						Северо-Казахстанская область					
	2018			2019			2018			2019		
	t	df	p	t	df	p	t	df	p	t	df	p
HT	-	-	-	-2.210	11.17	0.049	-	-	-	-	-	-
PH	-3.038	5.93	0.023	-3.124	6.69	0.018	-2.271	12.30	0.042	-	-	-
PL	-3.198	6.20	0.018	-3.282	7.78	0.011	-2.826	11.75	0.015	-3.456	4.86	0.019
SL	-2.522	7.58	0.037	-	-	-	-2.714	13.20	0.017	-	-	-
WKS	-	-	-	2.357	9.00	0.043	-	-	-	-	-	-

Примечание: HT – время колошения (дни), PH – высота растения (см), PL – длина верхнего междоузлия (см), SL – длина колоса (см), WKS – масса зерен на колос (г), t – t-критерий Стьюдента, df – степень свободы, p – P-значение (значимость на уровне не выше 0,05)

Таким образом, в качестве полезной модели выступает набор из 5 эффективных KASP-маркеров, ассоциированных с различными признаками урожайности твердой пшеницы, которые могут быть использованы в молекулярной селекции. Идентифицированы благоприятные аллели для каждого KASP-маркера и оценен их фенотипический вклад.

Использование полезной модели позволит:

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

Библиография

1. Цыганков В.И., Цыганкова М.Ю., Цыганков И.Г., Уразалиев Р.А., Аширбаева С.А. Районированные и новые конкурентоспособные сорта твердой пшеницы отечественной селекции для степных и сухостепных зон Казахстана // Известия Оренбургского Государственного Аграрного Университета. – 2013. – т.6(44). – С.37-41.

2. Драгавцев В.И. Уроки эволюции генетики растений // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2012. – т.4(3). – С.251-262.

3. Collard B.C., Jahufer M.Z., Brower J.B., Pang E.C. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts // Euphytica. – 2005. – Vol.142. – P. 169-196.

4. Sehgal D., Autrique E., Singh R., Ellis M., Singh S., Dreisigacker S. Identification of genomic regions for grain yield and yield stability and their epistatic interactions // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 41578; doi: 10.1038/srep41578.

5. Ramya P.,Chaubal A.,Kulkarni K.,Gupta L.,Kadoo N.,Dhaliwal H.S.,Chhuneja P.,Lagu M.,Gupta V. QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width inbreadwheat(*Triticum aestivum* L.) // Journal of Applied Genetics. –2010. – Vol.51(4). – P.421-429.

6. Абугалиева С.И., Волкова Л.А., Ермекбаев К.А., Турусбеков Е.К. Генотипирование коммерческих сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана с использованием микросателлитных ДНК-маркеров // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №2. – С.35-45.

7. Wiśniewska H., Surma M., Krystkowiak K., Adamski T., Kuczyńska A., Ogrodowicz P., Mikołajczak K., Belter J., Majka M., Kaczmarek Z., Krajewski P., Sawikowska A., Lenc L., Batur-

Cieśniewska A., Łukanowski A., Góral T., Sadowski C. Simultaneous selection for yield-related traits and susceptibility to Fusarium head blight in spring wheat RIL population // *Breeding Science*. – 2016. – Vol. 66(2). – P. 281-92. doi: 10.1270/jsbbs.66.281.

8. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2013. – т.17(2). – С.314-325.

9. Cheng C.M., Stolt P. Basic and applied research on *Boehmeria* (ramie) utilising CAPS marker technology. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) Markers in Plant Biology // NOVA Publisher: N.Y. – 2014. – Vol. 11. – P. 167-181.

10. Шавруков Ю.Н. CAPS-маркеры в биологии растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2015. – т.19(2). – С.205-213. doi: 10.18699/VJ15.026

11. Patent. US 20140377745 (A1) USA, Method for enhanced SNP discrimination and detection / Kloet R.S., Kloet E., Kloet S.R., Kloet A.H., Walsh C.M.; US2014377745A1; apl. date 19.06.2013; publ. date 25.12.2014

Ссылки на источник:

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/052111227/publication/US2014377745A1?q=pn%3DUS2014377745A1;>

<http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=ne&tahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&d=PG01&s1=20140377745.PGNR.;>

<https://patents.google.com/patent/US20140377745>

9. Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement // *Molecular Breeding*. – 2013. – V.33(1). – P.1-14.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ идентификации селекционно-ценных линий пшеницы твердой пшеницы с использованием технологии KASP, на основе проведения полимеразной цепной реакции, включающий набор праймеров:

1. ipbb_td_106

прямой праймер ipbb_td_106-1

5'-

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGGCACGCTCTCSACA;

прямой праймер ipbb_td_106-2

5'-

GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTCGGCACGCTCTCSACG;

обратный праймер ipbb_td_106-3

3'-

AAAGTATTTAAGCTGTAGAATTAGGTACAA;

2. ipbb_td_107

прямой праймер ipbb_td_107-1

5'-

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTCTGATGTCCATA

TAAATACGGGT;

прямой праймер ipbb_td_107-2

5'-

GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTGTCTGATGTCCAT

ATAAATACGGGC;

обратный праймер ipbb_td_107-3

3'- CTCTGGGAGCTCTGCATTGC,

3. ipbb_td_116

прямой праймер ipbb_td_116-1

5'-

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCCACAATGTC

CGCCAGTA;

прямой праймер ipbb_td_116-2

5'-

GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTATCCACAATGTC

CGCCAGTC;

обратный праймер ipbb_td_116-3

3'- CGGGGTCGTCATCACCTATG;

4. ipbb_td_117

прямой праймер ipbb_td_117-1

5'-

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTGACAAGCG

AGGAGATCATGT;

прямой праймер ipbb_td_117-2

5'-

GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTATTGACAAGCG

AGGAGATCATGG;

обратный праймер ipbb_td_117-3

3'- GCGGTAGTGGATGTTGAAGCTT;

5. ipbb_td_119

прямой праймер ipbb_td_119-1

5'-

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGATTAGCTACC

ACAGCGCAC;

прямой праймер ipbb_td_119-2

5'-

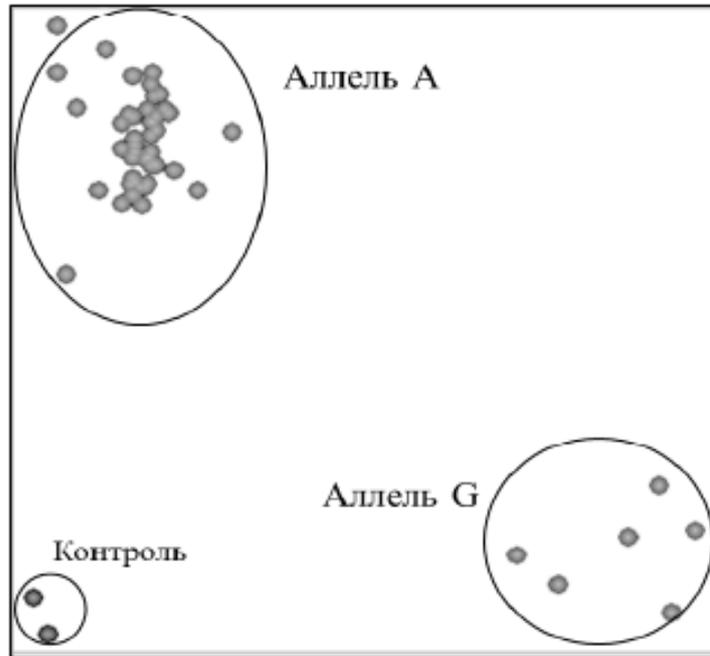
GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTTGATTAGCTACC

ACAGCGCAA;

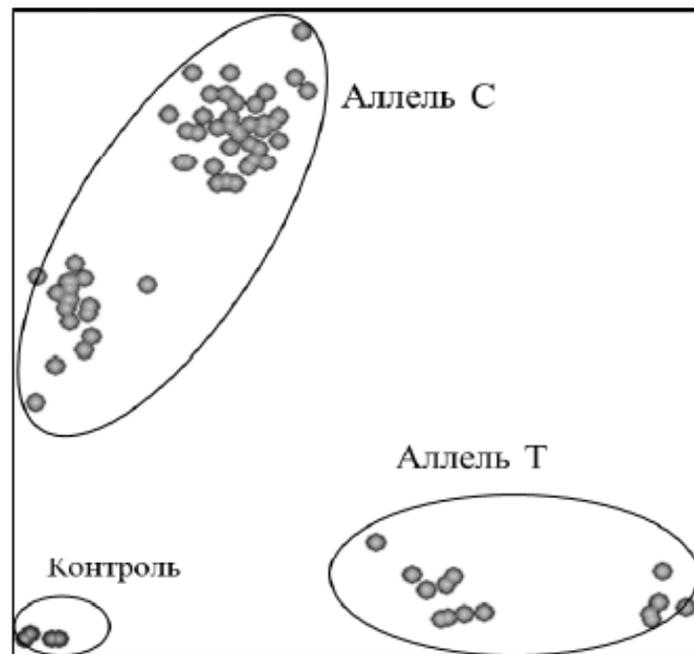
обратный праймер ipbb_td_119-3

3'-GTCTATGCAGTTTGAGAATTTACTG,

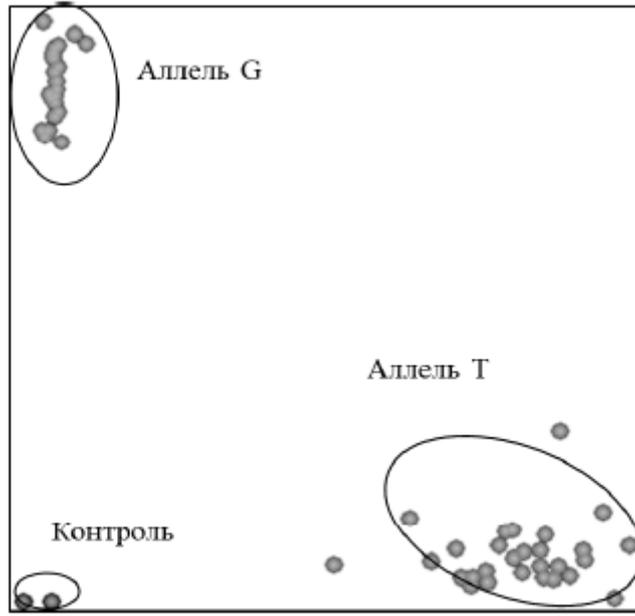
при этом сканирование продуктов амплификации проводят с помощью флуоресцентного анализатора на наличие специфических аллелей ДНК-маркеров, связанных с селекционно-ценными признаками твердой пшеницы.



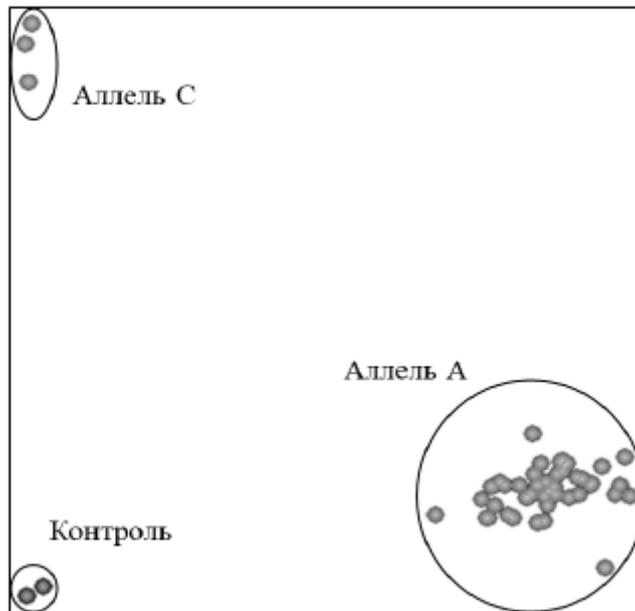
Фиг.1



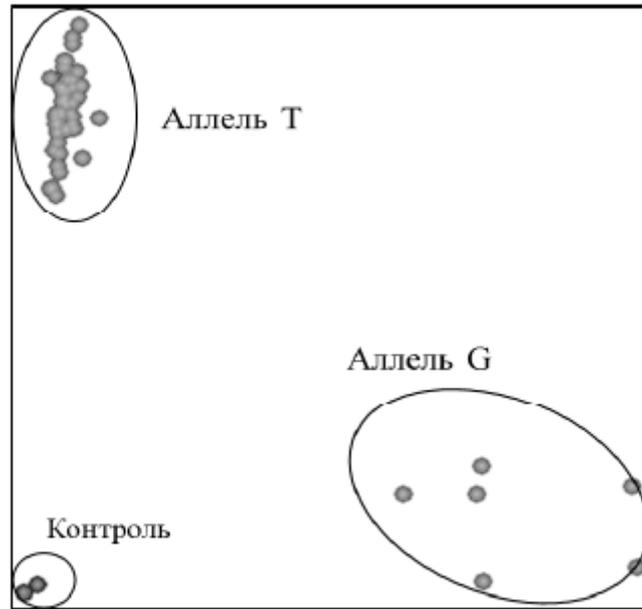
Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4



Фиг.5

Верстка Э. Жетписбаева
Корректор Г. Косанова