

Винахід відноситься до біотехнології і може мати широке впровадження в селекції зернових культур, зокрема кукурудзи, для підвищення ефективності добору в популяціях за рахунок прискорення темпів в селекції та скорочення обсягів робіт.

В сучасній селекції злакових культур починають використовуватися ДНК-технології, відомі під назвою MAS-добору [Stam P. Marker-assisted breeding // Proceedings of the Ninth Meeting of the EUCARPIA Section Biometrics and Plant Breeding, 6-8 July, Wageningen. - 1994. - P.32-44].

Але серед них нам невідомі способи прогнозування рівня розвитку господарських (кількісних) ознак в наступних поколіннях популяцій сільськогосподарських культур на основі технології ДНК-маркерів.

Найбільш близьким до заявленого винаходу є спосіб MAS-добору на основі індексу ВІДНОСНОЇ ефективності - прототип [Lande R., Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits // Genetics. - 1990. - Vol.124. - P.743-756].

Спільною суттєвою ознакою заявленого способу і прототипу є детекція ДНК-маркерів локусів кількісних ознак (QTL's). Однак, прототип зовсім не призначений для прогнозування розвитку кількісних ознак в подальших поколіннях. Він розроблений з метою визначення відносної ефективності MAS-добору (на основі ДНК-маркерів) у порівнянні з традиційними (немаркерними) методами добору за фенотипом: оцінюється співвідношення адитивної варіанси маркерних локусів або генетичного приросту популяції за маркерним доббором до коефіцієнту успадкованості (h^2) або генетичного приросту популяції при звичайному фенотиповому доборі. При цьому, така актуальна задача селекційного процесу, як прогнозування можливого рівня розвитку господарсько-цінних ознак вихідного матеріалу (в першу чергу індивідуальна продуктивність) залишалася невирішеною. Відсутність надійних методів прогнозування параметрів популяцій наступних циклів добору за важливими агрономічними ознаками не дозволяє суттєво скоротити обсяги робіт і сумарні ресурсні затрати, що призводить до зниження ефективності селекційного процесу в цілому. Дією винаходу є спрощення і прискорення селекційного процесу, зменшення обсягів робіт і ресурсних затрат за рахунок не прямого вимірювання і обчислення господарських ознак, а шляхом прогнозування рівня їх розвитку в наступних популяціях добору за цими ознаками.

Поставлена задача вирішується у такий спосіб: формується ефективна маркерна система за розробленими критеріями, визначається ефективний рівень "селективної ваги" певних (найкращих) алелів маркерних локусів, на цій основі визначається система узагальнених маркерних міток (УММ) і відповідних їм фенотипових значень локусів кількісних ознак. Між генотиповими (УММ) і фенотиповими значеннями ознаки розраховується рівень функціонального зв'язку через оцінку коефіцієнта регресії. Для формалізації прогнозованих значень фенотипової ознаки вводиться показник d - відхилення індивідуального значення ознаки від середнього значення цієї ознаки в популяції. Крім цього, визначають також систему УММ у популяції наступної генерації, для якої складається прогноз. На основі усіх цих складових елементів: УММ вихідної популяції, коефіцієнту регресії між генотиповою і фенотиповою базою даних, критерію d та УММ наступної популяції і складають прогноз рівня розвитку кількісної ознаки у популяції наступного циклу добору без безпосереднього вимірювання у ній досліджуваних ознак.

Запропонований спосіб має низку суттєвих ознак, які не використовувалися раніше для розробки способів прогнозування кількісних ознак в наступних популяціях і за якими він відрізняється від прототипу. Зокрема, головною суттєвою ознакою, за якою заявлений спосіб відрізняється від прототипу, є прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяції наступного циклу добору без додаткових затрат праці і ресурсів на їх визначення. У прототипа відсутня така суттєва ознака.

Крім цього, заявлений спосіб включає також інші наступні суттєві ознаки, відсутні у прототипа:

- визначаються узагальнені маркерні мітки (УММ) як інтегральні значення всіх можливих алельних сполучень маркерних локусів;

- для формалізації фенотипічних значень кількісної ознаки вводиться показник d , як критерій відхилення значення певної ознаки окремої рослини від середнього значення цієї ознаки в популяції;

- виявляється функціональний зв'язок між маркерним профілем генотипу та фенотипічною мінливістю кожної кількісної ознаки, що забезпечується регресійним аналізом генотипічної та фенотипічної баз даних для визначення коефіцієнта регресії, як показника рівня функціонального зв'язку;

- за спеціальними принципами формується найбільш ефективна маркерна тестова система: 1) перевага надається маркерам одного типу; 2) комбінування домінантних маркерів в одній тестовій системі вимагає щоб однакові алелі

маркерних л оку сів мали найвищу "селективну вагу"; 3) комбінування доміантних і кодоміантних маркерів в одній тестовій системі вимагає ідентичності маркеруючих алельних станів; 4) за "каркасний" краще використовувати SSR-локус; 5) розщеплення у маркерному локусі повинно відповідати теоретичному.

Таким чином, заявлений спосіб є новим, оскільки з доступних джерел інформації невідомі його аналоги за метою, суттю та відмітними ознаками. Тому запропонований спосіб відповідає такій вимозі патентоспроможності, як "новизна". У загальнодоступних джерелах інформації не виявлені також відомості про те, що за допомогою відомих молекулярно-генетичних технологій (ДНК-технологія, доміантні і кодоміантні ПЛР-маркери), селекційно-генетичних прийомів (інбридинг, направлений добір) та статистичних показників (коефіцієнт регресії, d-відхилення індивідуального значення ознаки від середньопопуляційного), які використовуються у запропонованих комбінаціях (маркерна тестова система), сполученнях (система узагальнених маркерних міток - УММ) та певній послідовності (створення маркерної тестової системи, системи УММ, визначення d, визначення функціонального зв'язку маркер-QTL через коефіцієнт регресії) передбачається ступінь розвитку агрономічних (кількісних) ознак у наступних популяціях добору без додаткових масових робіт по оцінці цих ознак. Це дає підстави зробити висновок про відповідність заявленого винаходу і такій вимозі патентоспроможності як "винахідницький рівень". Розроблений спосіб при додержанні заявленої технології (елементів, їх комбінації та послідовності) може бути використаний в селекції само- та перехреснозапилювальних культур для створення та генетичного поліпшення вихідного матеріалу. Тому заявлений спосіб відповідає умові патентоспроможності "промислове застосування".

В результаті здійснення винаходу можуть бути отримані наступні види технічного результату:

- генетичне поліпшення вихідного матеріалу для селекції;
- добір цінних генотипів, важливих для задач сортової і гетерозисної селекції;
- підвищення ефективності селекційного прогнозу за рахунок істотного прискорення селекційного процесу та зменшення обсягів робіт і загальних витрат.

Приклад реалізації способу

Як модельну вивчали ознаку "величина розгалуженого простору волоті" (далі РП) в популяції кукурудзи (ГК26×Мо17) F₂ з метою прогнозування її параметрів у наступній генерації - F₃.

1. На підставі ДНК-маркерування QTL's цієї ознаки за допомогою кодоміантних (SSR) і доміантних (ISSR) маркерів визначили ефективну маркерну тестову систему: ρh083_170-178 - кодоміантний маркерний локус, isp7_466(+) - доміантний (вказано алельний стан, що детектується у генотипів з високим значенням фенотипічної ознаки).

2. Проаналізували рекомбінаційні класи популяції F₂ за показником УММ визначеної тестової системи (таблиця 1).

3. У вихідній популяції F₂ провели регресійний аналіз зв'язку між заданими значеннями УММ і відповідними значеннями фенотипічної ознаки "РП" та визначили коефіцієнт регресії ($y=24,0+2,6x$; $b=2,6$).

4. Розраховували індивідуальні значення показника d для рослин популяції F₂.

5. Провели ДНК-аналіз популяції наступної генерації (F₃) до посіву (на коріннях паростків) або у полі (фаза 3-4 листків) і визначили УММ в F₃.

Таблиця 1

Рекомбінаційні класи на підставі УММ двухлокусної тестової системи ρh083-isp7_466 ознаки "величина розгалуженого простору волоті" (РП), см

Класи за УММ	Генотип за локусом ρh083 (п.н.)	Генотип за локусом isp7_466 (п.н.)	Середній рівень ознаки РП, визначеної для класів за:	
			генотипом	Фенотипом
1	170-170	466(-) - 466(-)*	23,8	24,0
2	170-170	466(+)	24,4	
3	178-178	466(-) - 466(-)	26,0	26,3
4	170-178	466(-) - 466(-)	26,5	
5	170-178	466(+)	29,3	29,3
6	178-178	466(+)	29,3	

*(-) - відсутність продукту ПЛР на електрофореграмі; (+) - наявність.

6. Прогнозні параметри популяції F₃ за ознакою "РП" визначили шляхом

побудови лінії регресії за допомогою коефіцієнту регресії, визначеного в F_2 , критерію d і значень УММ для F_3 (наведено на Фіг.).

Прогнозовані значення ознаки "РП" у одиницях вимірювання d знаходяться у точках перехресту лінії регресії та відповідних значень класів УММ і складають: -3,02; -0,40; 2,20 відповідно до 0-1-2 класів за УММ.

7. Прогнозуюча здатність заявленого способу була перевірена шляхом порівняння фактичних і прогнозованих значень "РП" в популяції F_3 (табл.2).

Таблиця 2

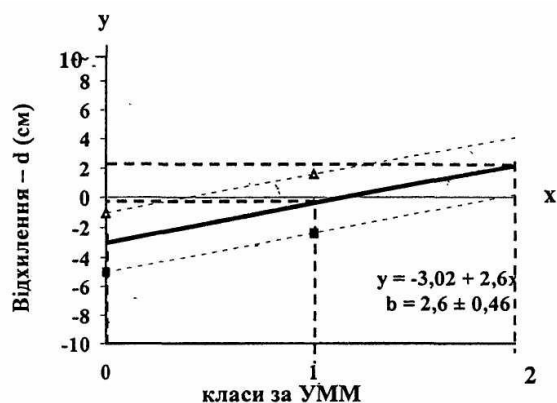
Ефективність моделі прогнозу значень ознаки "величина розгалуженого простору волоті" в популяції F_3 за тестовою системою phi083 - isp7_466

№ рослини	Значення d , см		№ рослини	Значення d , см	
	за прогнозом	фактичне		за прогнозом	Фактичне
1	-3,02	-3,3	12	-0,4	-0,3
2	-3,02	-7,3	13	-0,4	-2,3
3	-3,02	-9,3	14	-0,4	-2,3
4	-3,02	-2,3	15	-0,4	3,7
5	-3,02	-6,3	16	2,2	0,7
6	-0,4	-5,3	17	2,2	3,7
7	-0,4	-0,3	18	2,2	6,7
8	-0,4	-5,3	19	2,2	5,7
9	-0,4	-2,3	20	2,2	6,7
10	-0,4	0,7	21	2,2	4,7
11	-0,4	1,7	22	2,2	2,7
					$r=0,83^{**}$

$^{**}P<0,01$

Враховуючи високий статистичний рівень надійності прогнозу ($r=0,83$ при $P<0,01$) можна засвідчити значну ефективність заявленого способу прогнозу розвитку кількісних ознак в популяціях.

Розроблена модельна система на основі поєднання традиційних методів селекції з ДНК-технологіями, яка покладена в основу заявленого способу, показує принципову можливість успішного прогнозування важливих господарських кількісних ознак, зокрема продуктивності, біохімічних показників, якості зерна, стійкості до хвороб, шкідників, що дозволить значно скоротити терміни і обсяги селекційної роботи і підвищити її ефективність в цілому.



Фіг.