

АННОТАЦИЯ рабочей программы учебной дисциплины

2.1.2.2 Паспортизация селекционных достижений

1. Общая характеристика дисциплины

ДНК-паспортизация сортов сельскохозяйственных растений – наиболее эффективный, на сегодняшний день, способ их идентификации для того, чтобы защитить авторские права селекционеров, свести к минимуму фальсификат на рынке семян, оптимизировать селекционный процесс.

ДНК-паспортизация сортов сельскохозяйственных растений представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью молекулярных маркеров. В настоящее время это наиболее эффективный способ их идентификации для защиты авторских прав селекционеров. До сих пор приходится годами культивировать растения на опытных полях, отслеживая их устойчивость и продуктивность, но уже созданные и внедряемые в настоящее время генные технологии дают возможность с высокой вероятностью предсказывать, как культура будет вести себя в тех или иных условиях. Более того, применение генных технологий уже становится осознанной необходимостью и в селекции, и в семеноводческой работе, и в решении правовых вопросов.

Кроме того, сохранение и пополнение картотеки генов ускорит развитие отечественной селекции. Наличие такой базы данных по каждому сорту позволит производить скрещивания значительно более целенаправленно. Период создания сорта может сократиться в разы, поскольку идентификация родительских форм и гибридного материала, а также анализ результатов скрещивания на генетическом уровне проводится в предельно короткий срок по сравнению с традиционными методами.

Генетическая идентификация также решит ряд проблем в семеноводстве, в частности, оценки соответствия партий стандарту и контроля качества семенных материалов.

1.1. Цель дисциплины

- 1) научить обучающихся использовать молекулярно-генетические методы на любых стадиях развития растений, начиная с семян для проведения идентификации сортов и гибридов сельскохозяйственных растений;
- 2) сформировать у аспирантов умения самостоятельно проводить генетическую паспортизацию, как на этапе селекции, так и на этапе сортоиспытания, поскольку это позволяет оперативно выявить ошибку и снизить ее «стоимость», например, при выявлении повторно заявленного или близкородственного селекционного достижения.

1.2. Задачи дисциплины

- овладение навыками отбора образцов растительного материала исследуемого сорта, выделение ДНК, амплификация ДНК в реакционной смеси с последовательным участием указанных нескольких праймеров по современным методикам;
- умение обучающихся для каждого сорта выявить специфичные профили продуктов амплификации, которые служат маркерами данного селекционного достижения;
- проведение обработки полученных данных.

1.3. Предмет дисциплины

Дисциплина **2.1.2.2 Паспортизация селекционных достижений** формирует знания, необходимые в области практической генетики и селекции растений, ускорения селекционного процесса с использованием новейших генетических подходов, и создания на их основе ДНК-паспортов сортов и гибридов сельскохозяйственных культур.

1.4. Место дисциплины в образовательной программе

Дисциплина **2.1.2.2 Паспортизация селекционных достижений** относится к дисциплинам **по выбору**.

1.5. Взаимосвязь с другими дисциплинами

Дисциплина **2.1.2.2 Паспортизация селекционных достижений** взаимосвязана с такими дисциплинами, как: Селекция, семеноводство и биотехнология растений, Маркерориентированная селекция, Современные концепции защиты интеллектуальной собственности селекционных достижений.

2. Планируемые результаты обучения по дисциплине

Код	Название	
ПК-2	Способен к анализу генетических коллекций с целью подбора исходного материала для создания сортимента с комбинацией хозяйственно-полезных признаков и свойств с использованием современных селекционных методов: генотипирования, фенотипирования и др.	Знает основные законы математических, естественнонаучных и общепрофессиональных дисциплин, необходимых для решения типовых задач в области агрономии Использует знания основных законов математических и естественных наук для решения стандартных задач профессиональной деятельности Решает типовые задачи профессиональной деятельности на основе знаний основных законов математических и естественных наук с применением информационно-коммуникационных технологий
ПК-3	Способен осуществлять экспериментальный дизайн селекционногенетических экспериментов, применять полевые и лабораторные методы оценки и отбора форм с целевыми хозяйственно-полезными признаками и свойствами.	Знает современные технологии в профессиональной деятельности, знает технологии возделывания сельскохозяйственных культур в открытом и закрытом грунте Умеет обосновывать применение современных технологий в профессиональной деятельности Реализует современные технологии в профессиональной деятельности

ПК-5	Способен применять биотехнологические методы, маркерориентированную селекцию, генетическое фенотипирование на разных этапах селекционной схемы для повышения эффективности создания, оценки и отбора селекционного материала и воспроизводства в процессе семеноводства	Знает форму и структуру отчета о результатах сортоиспытания, порядок ведения Государственного реестра селекционных достижений, регламент принятия решения по заявке на выдачу патента на селекционное достижение Умеет оценивать отличимость, однородность и стабильность сорта в соответствии с действующими методиками испытаний Имеет навык описания сорта с заключением о его отличимости от общеизвестных сортов, однородности и стабильности на основе проведенных испытаний и сортов, впервые включаемых в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию
------	---	--

3. Содержание дисциплины

Сорта растений относятся к объектам интеллектуальной собственности и охраняются патентами, если являются оригинальными, не имеют аналогов и успешно проходят испытания на отличимость, однородность и стабильность (ООС-тест). Традиционные методы сортовой идентификации на основе морфологических дескрипторов и биохимических признаков значительно уступают современным подходам, основанным на молекулярных ДНК-маркерах, по точности, разрешающей способности и воспроизводимости результатов анализа. Система ДНК-идентификации в настоящее время успешно применяется на практике для ряда культур. Не исключено, что в ближайшее время она будет принята и одобрена Международным союзом по защите новых сортов растений (UPOV) в качестве обязательного элемента тестирования при регистрации нового селекционного достижения.

Ввиду высокой информативности молекул ДНК в мировой научной практике наблюдается стремительный рост числа методов молекулярно-генетического анализа культурных растений с использованием молекулярных маркеров, которые известны также под названием ДНК-маркеров. Эти же методы анализа молекул ДНК могут быть использованы для генетической паспортизации сортов сельскохозяйственных культур вместо малоинформативных методов анализа белковых маркеров.

Раздел 1. Введение. Цель и задачи паспортизации. Методика ДНКфингерпринтинга с помощью молекулярных маркеров на основе ПЦР.

Виды исходного материала для селекции и способы его получения (естественные популяции, гибридные популяции, самоопыленные (инцухт) линии, искусственные мутации и полиплоидные формы). Понятие о маркерах. Биохимические и молекулярные маркеры.

Молекулярные методы оценки генетического разнообразия, так называемый ДНКфингерпринтинг, предполагают изучение полиморфизма с разработкой надежного способа записи спектров ДНК, полученных в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР). На их основе для каждого сорта можно составить генетический паспорт, который позволит определить уникальность сорта, провести анализ однородности семенного и

посадочного материала. Генетическая паспортизация сортов, линий и гибридов может значительно повысить эффективность регистрации и авторской защиты селекционных достижений. Она востребована в семеноводстве – при сертификации и коммерческом распространении семян – и в селекционном процессе – при подборе родительских пар для скрещиваний и выявления генетических маркеров ценных признаков.

Для ДНК-идентификации необходимо предварительное создание эталонных генетических паспортов районированных сортов. Путем сличения с ними тестируемого образца можно установить подлинность сорта, гибридность, наличие примесей и т. д. Внедрение методов ДНК-фингерпринтинга в практику требует комплексного научного подхода, включающего выбор оптимальной системы молекулярного маркирования и создание эффективных технологий генотипирования с учетом особенностей растений конкретного вида.

Наиболее распространенным и доступным методом выявления генетического полиморфизма и установления филогенетических связей между растениями является метод фрагментного анализа генома с использованием различных маркерных техник на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Раздел 2. Подготовка материала для анализа

Первым этапом молекулярно-генетического анализа является формирование репрезентативной выборки. Выборка должна включать не менее 30-50 растений от сорта или популяции. Однако масштабный анализ индивидуальных генотипов является сложным, трудоемким и дорогостоящим процессом.

Экстракция ДНК из растений – исходная точка для молекулярно-генетического анализа. Микросателлиты (SSR – simple sequence repeats) – это тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК. На их основе создают информативные молекулярные маркеры, которые позволяют получить индивидуальную характеристику сорта или генотипа – ДНК-профиль.

Продукты амплификации разделяют методом горизонтального или вертикального электрофореза. Различия в размере ПЦР-продуктов, а следовательно, в скорости перемещения фрагментов ДНК в электрофорезном геле, указывают на разное количество тандемных повторов в исследуемом участке генома.

Полиморфными считают фрагменты амплификации, присутствующие на электрофореграммах отдельных сортов или образцов.

На сегодняшний день технологии выявления молекулярных или ДНК-маркеров становятся важным стандартом селекции растений и получают все более широкое применение по всему миру. Их использование позволяет точно и быстро выявлять генетическое разнообразие популяций, подвидов, видов, и даже дифференцировать более высокие таксономические ранги - рода и семейства, а также делает возможным создание генетических фингерпринтов ("отпечатков пальцев") сортов, и эффективно, с точки зрения затрат, определять хозяйственно-ценные признаки еще на начальном этапе селекции на уровне ДНК. Эти же методы могут стать основой для генетической паспортизации сортов, линий и гибридов различных культурных растений.

Раздел 3. Выделение ДНК для изучения внутрисортного и межсортного ДНК-полиморфизма

Важным элементом технологии генетической паспортизации является анализ внутрисортного ДНК-полиморфизма. На основании его результатов можно сделать

закключение об однородности генотипов сорта и обоснованности использования «балк-образца» для оценки межсортового ДНК-полиморфизма.

По ДНК-профилю, характерному для каждого сорта, определяют минимальное количество маркеров для его надежной идентификации, буквами латинского алфавита обозначают исследуемые локусы (код локуса), а нижним индексом справа указывают размер выявленных аллелей в парах нуклеотидов.

Использование в селекции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее широко используемых методов молекулярной биологии поскольку она позволяет быстро и с небольшими затратами материальных ресурсов и времени получить более 10 миллионов копий определенной последовательности ДНК, первоначально представленной всего несколькими молекулами.

ДНК-секвенирование (методы изучения последовательностей фрагментов амплификации, полученных в ПЦР) является наиболее достоверным способом оценки разнообразия, т. к. позволяет обнаружить изменчивость даже на уровне нуклеотидов (полиморфизмы внутри блоков ДНК).

Продукты SSR-генотипирования, используемые для последующей паспортизации, целесообразно отсеку секвенировать для определения точных размеров выявленных генетических дескрипторов. Секвенирование проводится путем постепенного добавления флуоресцентно-меченных нуклеотидов к целевой ПЦР-матрице.

Раздел 3. Использование панели SRAP-маркеров для молекулярногенетической паспортизации

SRAP-маркирование (*sequence-related amplified polymorphism*) – относительно новая, простая и надежная техника генотипирования, основанная на использовании в ПЦР пары праймеров, разработанных для амплификации интрон-экзонных участков генома. Определяющую роль в вариабельности продуктов ПЦР играет обратный праймер, нацеленный на некодирующую область генома, обладающую низкой консервативностью. ДНК-полиморфизм, выявленный в этих участках генома с помощью SRAP-маркеров, позволяет установить межсортовые различия у разных видов сельскохозяйственных культур.

Результаты генотипирования анализируют с помощью программного обеспечения и составляют бинарные матрицы для каждой комбинации праймеров. На основании матриц можно определить индексы генетического сходства и дистанции Нея (Nei, Li, 1979) для попарного сравнения сортов, а затем составить дендрограмму методом UPGMA, если необходимо провести их кластеризацию и установить филогенетические отношения. Показатели генетического разнообразия – процент полиморфизма, эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона (Shannon, Weaver, 1949) – рассчитывают с помощью программы «PopGene».

4. Форма промежуточной аттестации

Зачет.