

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Винахід належить до галузі боротьби з грибовим захворюванням у Brassica, як-от Brassica napus (B. napus). Винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослин Brassica, як-от рослини B. napus, що мають стійкість до стеблової виразки Phoma (Phoma stem canker), яка спричиняється грибовим патогеном (патогенами) Leptosphaeria maculans (L. maculans) і/або Leptosphaeria biglobosa (L. biglobosa). Пропонуються засоби виявлення, як-от маркери та праймери для виявлення присутності щонайменше одного алеля стійкості у рослин Brassica, як-от рослини B. napus, або їхніх частин, як-от тканини або насіння. Винахід також стосується способів отримання рослин Brassica, як-от рослини B. napus, що мають стійкість до Phoma stem canker, яка спричиняється грибовим патогеном (патогенами) L. maculans і/або L. biglobosa, а також до застосування рослин і насіння і способів згідно з цим винаходом.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Phoma stem canker, також відома як чорна ніжка, яка спричиняється грибовим патогеном (патогенами) L. maculans і/або L. biglobosa, є основним захворюванням широкого спектру культур Brassica, включаючи B. napus L. (олійний ріпак або канола) і Brassica oleracea (капуста), які щорічно призводять до великих економічних втрат у всьому світі, зокрема в Європі, Австралії, Канаді та Північній Америці. L. maculans особливо небезпечний для B. napus, який використовується в усьому світі для виробництва олії, біодизельного палива та борошна для ринків кормів для худоби.

B. napus (2n=38, геном AACC) являє собою амфідиплоїдний вид, що виник унаслідок спонтанної гібридизації Brassica rapa L. (син. B. campestris; 2n=20, AA) та Brassica oleracea L. (2n=18, CC). B. napus містить повні набори хромосом цих двох диплоїдних геномів.

Симптоми зараження L. maculans можуть виявлятися на сім'ядолях, листі, стручках і стеблах, та включають прикорневі виразки на стеблах, невеликі сірі ураження на листі і кореневу гниль. Більша частина втрат урожаю була пов'язана зі стебловою виразкою.

Ураження листя зазвичай розвиваються після зараження аскоспорами, розсіяними вітром, і/або конідіоспорами, розсіяними водою (бризки). Симптоми на стеблах (або виразки) можуть виникати унаслідок безпосереднього зараження стебел або унаслідок системного росту грибів із ураженого листя через судинну тканину в стебло. Стеблові виразки можуть оперізувати стебло, що може призвести до вилягання рослин (вигину стебел поблизу рівня землі) та загибелі рослин. Менш серйозні виразки можуть призвести до обмеження надходження води та поживних речовин, що, у свою чергу, може призвести до зморщування насіння та стручків. Зараження стручків може призвести до передчасного розтріскування стручків та зараження насіння.

Виробництво стійких до Phoma stem canker культур Brassica, як-от сорти B. napus, є однією з основних цілей програм селекції культур у всьому світі. Хоча для зниження втрат урожаю, спричинених грибовою інфекцією, у цей час використовуються як хімічні способи боротьби, як-от розпорошення фунгіцидів, так і культурні способи, як-от ротація сівозміни, вважається, що найбільш надійним і, ймовірно, найбільш екологічно безпечним способом боротьби на сьогодні є генетична стійкість. Генетична стійкість може бути зумовлена генами зі стійкістю, специфічною для раси (якісна стійкість; R), і/або генами зі стійкістю, неспецифічною для раси (кількісна стійкість; QR).

Стойкість, опосередкована геном R, зазвичай відповідає класичній гіпотезі "від гена до гена" і має основні алельні ефекти, які можуть бути ефективно і точно випробувані на стадії сім'ядолі. Однак послідовна відповідь стійкості може бути не виявлена, якщо рослини вирощують у природних польових умовах, при постійному впливі інокулята, що надходить від різних рас грибових патогенів, як-от L. maculans. QR зазвичай контролюється кількома генами з меншим алельним ефектом, проте ці QR-алелі можуть разом надавати більш стабільну стійкість на стадії дорослої рослини в польових умовах.

У видів Brassica було зареєстровано близько дев'ятнадцяти локусів стійкості, і з них приблизно одинадцять генів (гени стійкості до L. maculans (Rlm): Rlm1, Rlm2, Rlm3, Rlm4, Rlm7, Rlm9, Rlm11 та LepR1, LepR2, LepR3 та LepR4) як вважають, походять з геному A B. napus та Brassica rapa.

Відсутність відповідної стійкості, виявленої у B. napus (геном AACC), і постійна загроза зниження стійкості при широкому застосуванні стійкого сорту протягом тривалих періодів часу змушують селекціонерів шукати альтернативні джерела стійкості. Основна увага в дослідженнях приділялася ідентифікації та переданню алелів стійкості від споріднених видів Brassica, як-от B. rapa (AA), B. oleracea (CC), B. nigra (геном BB), B. juncea (геном AABB) та B. carinata (BBCC).

Одним із генетичних підходів до забезпечення стійкості було створення синтетичних ліній B. napus шляхом міжвидової гібридизації двох диплоїдних видів (геноми AA та CC) та подальшого культивування ембріонів in vitro та подвоєння хромосом. Отже, стійкість до чорної ніжки була введена в B. napus шляхом отримання синтетичних рослин B. napus з диких сортотразків B. rapa (геном AA) [Крауч та співавт., (1994), Селекція рослин 112: 265-278] та диких сортотразків B. atlantica (геном CC) [Мітен і Маграт (1992), Селекція рослин 108: 60-68, і Мітен і Херрон (1991), Матеріали 8-го Міжнародного конгресу з ріпаку].

Серед серій синтетичних ліній B. napus із спільним геномом C, але з різними геномами A дві лінії були виявлені стійкими до ізолятів грибів під час випробувань у теплиці (випробування на сім'ядолі та листя), проте синтетичні лінії, отримані від зазначених ліній та їхніх гібридів F1 із сортами олійного ріпаку, показали високу стійкість до чорної ніжки в експериментах у теплиці. Тільки одна з цих ліній також продемонструвала стійкість у польових експериментах в Англії та Австралії.

Крім того, синтетичні лінії B. napus, описані Краучем та Мітеном (див. вище), не були комерційно придатними, оскільки вони містили високі рівні глюкозинолатів, високі рівні ерукової кислоти, мали низьку фертильність і страждали від самонесумісності.

В іншому прикладі сорт B. napus з відкритим запиленням Surpass400 був виведений на ринок компанією Pacific Seeds у 2000 році в Австралії. На той час він отримав національний рейтинг стійкості до чорної ніжки 9,0 (Australia Blackleg Rating: ABR, Асоціація каноли Австралії), що є найвищим відомим рівнем стійкості. Surpass400

являє собою синтетичний *B. parus*, отриманий унаслідок міжвидового схрещування дикого *B. para ssp sylvestris* з Сицилії та *B. oleracea ssp alboglabra*, і повідомлялося, що у Surpass400 був присутній основний домінуючий алель стійкості до чорної ніжки на стадії проростання. Однак до початку 2003 року з'явилися повідомлення про зниження стійкості Surpass400, що вказують на те, що всього за три роки розвинувся більш вірулентний штам гриба.

В іншому прикладі генетичної стійкості, Ю та співавт., Theor Appl Genet 2005 березня; 110(5):969-79 повідомлялося про локуси стійкості у популяціях *B. parus*. Перший локус був нанесений на карту групи зчеплення N02 і був позначений як *LepR1*, а другий локус був нанесений на карту в групі зчеплення N10 і був позначений як *LepR2*. *LepR1* та *LepR2* були спочатку ідентифіковані у запатентованих лініях схрещування *B. parus* DHP95 та DHP96, відповідно. Третій локус, *LepR3*, був ідентифікований у сорту *B. parus* Surpass400.

При постійному ризику порушення генетичної стійкості через зміни у популяції патогену, бажано селекціонерам ідентифікувати нові генетичні джерела та маркери стійкості, способи їх перенесення до сортів з високими агрономічними показниками, та способи підвищення довговічності стійкості.

СТИСЛИЙ ВИКЛАД СУТНОСТІ ВИНАХОДУ

Цей винахід заснований щонайменше частково на визначенні авторами винаходу гаплотипу стійкості *LepR1* і маркерів, зчеплених із зазначеним гаплотипом.

До цього винаходу селекціонерам було доступно лише кілька простих повторів послідовностей (SSR) маркерів, асоційованих зі стійкістю *LepR1* до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або стійкістю *L. biglobosa*. Застосування цих SSR-маркерів для ідентифікації рослин із стійкістю було економічно неефективним для селекціонерів і часто призводило до того, що рослини мали погані негативні агрономічні і/або фенотипічні властивості, спричинені зчепленим вантажем.

Наприклад, див. Фігуру 1, яка показує генетичну карту, що містить чотири SSR на хромосомі A02 та *LepR1*. Розмір області-мішені *LepR1* на ґрунті загальнодоступного геномного довіднику Darnog v.4.1 на той момент, становив близько 6 Мб.

Застосування маркерів згідно з цим винаходом дозволяє зменшити область-мішень *LepR1*, асоційовану зі стійкістю, приблизно від 6 Мб до приблизно 90 т.о.

Отже, цей винахід пропонує маркери, які дозволяють відбирати і/або ідентифікувати рослини, які мають стійкість до *Phoma stem canker* та знижений зчеплений вантаж. Переважно, цей винахід дозволяє отримувати і/або відбирати, або ідентифікувати рослини *B. parus*, що мають стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*, які зберігають комерційно прийнятні агрономічні і/або фенотипічні властивості. Наприклад, цей винахід може забезпечити отримання і/або відбір, або ідентифікацію рослин, які мають знижені негативні агрономічні властивості або взагалі не мають негативні агрономічні властивості, спричинені зчепленим вантажем.

В одному аспекті цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. parus*, що має стійкість до *Phoma stem canker*, яка спричиняється грибовими патогенами, як-от *L. maculans* і/або *L. biglobosa*, що містить виявлення у зазначеної рослини *B. parus* або її частини (як-от тканина або насіння) присутність або відсутність щонайменше одного маркера, який міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 і SEQ ID No: 10.

Відповідно, зазначений щонайменше один маркер може міститися на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 2 та SEQ ID No: 9.

Відповідно, зазначений щонайменше один маркер може міститися на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 3 та SEQ ID No: 8.

Відповідно, зазначений щонайменше один маркер може міститися на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 4 та SEQ ID No: 7.

Відповідно, зазначений щонайменше один маркер може міститися на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 5 та SEQ ID No: 6.

Відповідно, спосіб може містити виявлення щонайменше одного алеля з наступних:

- а) алель C/T в межах SEQ ID No: 1 (цей алель також іменується в цьому документі як ga24982s01);
- б) алель C/T в межах SEQ ID No: 2 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74607s01);
- в) алель C/T в межах SEQ ID No: 3 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74625s01);
- г) алель C/T в межах SEQ ID No: 4 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74605s01);
- д) алель C/T в межах SEQ ID No: 5 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74601s01);
- е) алель C/T в межах SEQ ID No: 6 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74589s02);
- ж) алель C/T в межах SEQ ID No: 7 (цей алель також іменується в цьому документі як ga74593s01);
- з) алель C/T в межах SEQ ID No: 8 (цей алель також іменується в цьому документі як ga25028s01);
- и) алель A/G в межах SEQ ID No: 9 (цей алель також іменується в цьому документі як ga25042s01); і/або
- й) алель G/T в межах SEQ ID No: 10 (цей алель також іменується в цьому документі як ga25063s01);

Переважно, щоб був виявлений нуклеотид або відповідний алель, який асоційований із стійкістю. У зв'язку з цим слід розуміти, що спосіб згідно з цим винаходом охоплює виявлення щонайменше одного алеля з наступних:

- а) алель у або алель с в ga24982s01 відповідно до SEQ ID No: 1
- б) алель у або алель t в ga74607s01 відповідно до SEQ ID No: 2
- в) алель s або алель g в ga74625s01 відповідно до SEQ ID No: 3
- г) алель у або алель t в ga74605s01 відповідно до SEQ ID No: 4
- д) алель у або алель t в ga74601s01 відповідно до SEQ ID No: 5
- е) алель у або алель с в ga74589s02 відповідно до SEQ ID No: 6
- ж) алель у або алель с в ga74593s01 відповідно до SEQ ID No: 7
- з) алель k або алель t в ga25028s01 відповідно до SEQ ID No: 8
- и) алель r або алель g в ga25042s01 відповідно до SEQ ID No: 9
- й) алель k або алель g в ga25063s01 відповідно до SEQ ID No: 10

Цей спосіб може містити виявлення

- а) нуклеотиду або алеля с в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 1
- б) нуклеотиду або алеля t в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 2
- в) нуклеотиду або алеля g в положенні алеля або нуклеотиду s, як зазначено в SEQ ID No: 3
- г) нуклеотиду або алеля t в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 4
- д) нуклеотиду або алеля t в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 5
- е) нуклеотиду або алеля с в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 6
- ж) нуклеотиду або алеля с в положенні алеля або нуклеотиду у, як зазначено в SEQ ID No: 7
- з) нуклеотиду або алеля t в положенні алеля або нуклеотиду к, як зазначено в SEQ ID No: 8
- и) нуклеотиду або алеля g в положенні алеля або нуклеотиду г, як зазначено в SEQ ID No: 9
- й) нуклеотиду або алеля g в положенні алеля або нуклеотиду к, як зазначено в SEQ ID No: 10.

Виявлення може містити маркер, зазначений вище (наприклад, маркер ga24982s01 для виявлення, як описано в пункті а) і так далі). Застосування відповідних праймерів – це можливість застосування маркерів у контексті способу. Відповідні праймери, які представляють маркери, розкрито у цьому документі в іншому місці. Праймери можуть бути позначені, хімічно модифіковані або доповнені, як описано у цьому документі. Технічні параметри згідно з цим пунктом можуть бути застосовані у способі сільськогосподарського культивування та можуть бути застосовані у способі боротьби з *Leptosphaeria maculans* і/або *L. biglobosa*.

Відповідно, вказаний спосіб може містити виявлення у вказаній рослині *B. napus* або її частини (як-от тканина або насіння) присутність або відсутність щонайменше двох маркерів, при цьому щонайменше один маркер міститься на першому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 і SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на другому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 10 та ga74589s02 SEQ ID No: 6.

Відповідно,

а) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на першому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 2 і SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на другому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 9 і SEQ ID: 6; і/або,

б) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на першому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 3 і SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на другому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 8 і SEQ ID: 6; і/або,

в) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на першому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 4 і SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на другому хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 7 і SEQ ID: 6; і/або,

г) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на першому хромосомному інтервалі визначеному SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на другому хромосомному інтервалі, визначеному SEQ ID: 6.

Відповідно, вказана рослина *B. napus* може бути отримана шляхом інтрогресії LepR1 з рослини-донора в рослину-реципієнт *B. napus* для отримання інтрогредованої рослини *B. napus*.

Відповідно, зазначена рослина-донор може мати стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*.

Відповідно, зазначена інтрогредована рослина *B. napus* може мати стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*.

Відповідно, зазначеною рослиною-донором може бути *Brassica rapa* subsp. *sylvestris*. Відповідно, зазначена рослина-донор може бути диким родичем *B. napus*.

Відповідно, зазначену інтрогредовану рослину *Brassica* вибирають для події рекомбінації на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10. Подія рекомбінації може нести локус стійкості або алель стійкості згідно з цим винаходом, або може бути відповідальною за обмін генетичним матеріалом в одній або обох фланкуючих областях локусу стійкості або алеля стійкості.

Відповідно, зазначена інтрогредована рослина *Brassica* обрана для події рекомбінації на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10, і не зберігає другий хромосомний інтервал, отриманий від рослини-донора.

В одному аспекті, зазначена рослина *B. napus* або її частина, відібрана або ідентифікована способом згідно з цим винаходом, що має стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*, не виявляє жодних негативних агрономічних властивостей, спричинених зчепленим вантажем.

В іншому аспекті, цей винахід пропонує набір праймерів для ідентифікації рослини *B. napus*, що має стійкість до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*), який містить:

а) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga24982s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 11, або праймер, що містить SEQ ID No: 12, та праймер, що містить SEQ ID No: 13; і/або

б) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74607s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 14, або праймер, що містить SEQ ID No: 15, та праймер, що містить SEQ ID No: 16; і/або

в) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74625s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 17, або праймер, що містить SEQ ID No: 18, та праймер, що містить SEQ ID No: 19; і/або

г) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74605s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 20, або праймер, що містить SEQ ID No: 21, та праймер, що містить SEQ ID No: 22; і/або

е) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74601s01, що містить

праймер, що містить SEQ ID No: 23, або праймер, що містить SEQ ID No: 24, та праймер, що містить SEQ ID No: 25; i/або

f) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74589s02, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 26, або праймер, що містить SEQ ID No: 27, та праймер, що містить SEQ ID No: 28; i/або

g) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga74593s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 29, або праймер, що містить SEQ ID No: 30, та праймер, що містить SEQ ID No: 31; i/або

h) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga25028s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 32, або праймер, що містить SEQ ID No: 33, та праймер, що містить SEQ ID No: 34; i/або

j) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga25042s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 35, або праймер, що містить SEQ ID No: 36, та праймер, що містить SEQ ID No: 37; i/або

j) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера ga25063s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 38, або праймер, що містить SEQ ID No: 39, та праймер, що містить SEQ ID No: 40.

В іншому аспекті, цей винахід пропонує застосування рослини, обраної способом згідно з цим винаходом, для отримання олії з олійного ріпаку або макухи з олійного ріпаку. В іншому аспекті, це винахід пропонує застосування щонайменше одного маркера, як описано в цьому документі (наприклад, як визначено в будь-якому з пунктів 1-13), або маркера, обраного з SEQ ID No: 1-10, або набору праймерів згідно з цим винаходом, для відбору рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker* (наприклад, стійкість до грибкового патогену (патогенів) *L. maculans* i/або *L. biglobosa*). В одному аспекті, зазначена рослина *B. napus* або її частина, відібрана або ідентифікована способом згідно з цим винаходом, яка має стійкість до *Phoma stem canker* (грибкового патогену (патогенів) *L. maculans* i/або *L. biglobosa*), не виявляє жодних негативних агрономічних i/або фенотипічних властивостей, спричинених зчепленим вантажем. З цього погляду цей винахід охоплює такі рослини, які несуть локус стійкості або алель стійкості згідно з цим винаходом, і забезпечують той же урожай (наприклад, ту ж кількість ядер або ту ж олійну масу), що і рослини, які не несуть локус стійкості або алель стійкості. Крім того, цей винахід охоплює також способи ідентифікації i/або відбору такої рослини, як описано в цьому документі.

Способи відбору, виявлення або ідентифікації, описані в цьому документі, можуть починатися з етапу пропозиції рослини, частини рослини, рослинної тканини або насіння, і можуть продовжуватися наступним етапом виділення ДНК із цієї рослини, частини рослини, рослинної тканини або насіння. Наступний етап виявлення, або ідентифікації, може бути проведений виділеною ДНК. Для цього можуть бути використані маркери виявлення або ідентифікації, як описано в цьому документі. Переважно, застосовують щонайменше один, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять або щонайменше шість маркерів, як розкрито в цьому документі. Етап виявлення або ідентифікації може містити створення переданих електронним способом i/або збережених в електронному вигляді даних, що представляють виявлення або ідентифікацію присутності відповідної молекули нуклеїнової кислоти або нуклеотидної послідовності, або присутності ДНК, або ділянки геному, які передбачають стійкість згідно з цим винаходом рослині, яка містить виявлений або ідентифікований генетичний матеріал. Дані можуть зберігатися на машинозчитуваному носії. Спосіб може містити етап відбору стійкої рослини, на якій був ідентифікований або виявлений відповідний генетичний матеріал. У кращому варіанті здійснення цього винаходу відбираються тільки ті рослини, які є гомозиготними за відповідним генетичним матеріалом, який надає стійкість. Генетичний матеріал, який надає стійкість, може бути алелем, що виявляється за допомогою маркерів і способів, розкритих у цьому документі.

СТИСЛИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1 показує генетичну карту SSRs, спроектовану на фізичну карту Darmor v.4.1. Фігура 2 показує тонке картування області-мішені хромосоми A02 для локусу стійкості *LepRI*. B = алель, який не є *LepR1*, G = статус гетерозиготного алеля. Тут рамка вказує область-мішень, в якій розташований ген, на ґрунті рекомбінантів, показаних на фігурі, порівняно зі стійкістю та сприйнятливістю (RES/SUS). Маркери, показані в рамці, можуть бути застосовані для відбору рослин, які мають стійкість до грибів. Номери RA належать до номерів внутрішньої обробки.

Фігура 3 показує бали (A) *L. maculans* та (B) *L. biglobosa* на наборі ліній, які несуть різні типи стійкості.

Фігури 4-43 показують послідовності SEQ ID No. 1-40, як описано нижче.

ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID No: 1: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga24982s01.

SEQ ID No: 2: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74607s01.

SEQ ID No: 3: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74625s01.

SEQ ID No: 4: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74605s01.

SEQ ID No: 5: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74601s01.

SEQ ID No: 6: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74589s02.

SEQ ID No: 7: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga74593s01.

SEQ ID No: 8: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga25028s01.

SEQ ID No: 9: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga25042s01.

SEQ ID No: 10: являє собою нуклеотидну послідовність, що містить маркер ga25063s01.

SEQ ID No: 11: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ga24982s01.

SEQ ID No: 12: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ga24982s01.

SEQ ID No: 13: являє собою праймер для виявлення присутності або відсутності ga24982s01.

SEQ ID No: 14: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ga74607s01.

SEQ ID No: 15: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74607s01.
SEQ ID No: 16: являє собою праймер для виявлення присутності або відсутності ra74607s01.
SEQ ID No: 17: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra74625s01.
SEQ ID No: 18: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74625s01.
SEQ ID No: 19: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74625s01.
SEQ ID No: 20: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra74605s01.
SEQ ID No: 21: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74605s01.
SEQ ID No: 22: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74605s01.
SEQ ID No: 23: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra74601s01.
SEQ ID No: 24: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74601s01.
SEQ ID No: 25: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74601s01.
SEQ ID No: 26: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74589s02.
SEQ ID No: 27: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74589s02.
SEQ ID No: 28: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74589s02.
SEQ ID No: 29: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra74593s01.
SEQ ID No: 30: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra74593s01.
SEQ ID No: 31: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74593s01.
SEQ ID No: 32: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra25028s01.
SEQ ID No: 33: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra25028s01.
SEQ ID No: 34: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25028s01.
SEQ ID No: 35: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra25042s01.
SEQ ID No: 36: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra25042s01.
SEQ ID No: 37: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25042s01.
SEQ ID No: 38: являє собою праймер для виявлення алеля стійкості ra25063s01.
SEQ ID No: 39: являє собою праймер для виявлення чутливого алеля ra25063s01.
SEQ ID No: 40: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25063s01.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Стійкість

В одному аспекті цього винаходу, запропонований спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker*.

Інакше кажучи, рослина *B. napus* має стійкість до грибкових патогенів, які спричиняють *Phoma stem canker*. Рослина *B. napus* стійка до захворювання *Phoma stem canker*.

"*Phoma stem canker*", також відома як "Чорна ніжка", є економічно важливим захворюванням хрестоцвітих, включаючи *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea* та *B. rapa*. Два грибкові патогени утворюють видовий комплекс, який спричиняє *Phoma stem canker*: *L. maculans*, який асоціюється з виразками, що ушкоджують основу стебла; та *L. biglobosa*, яка найчастіше асоціюється з менш ушкоджуючими ураженнями верхньої частини стебла.

Ізоляти *L. biglobosa* найчастіше зустрічаються в асоціації з *L. maculans*, але їх можна виявити незалежно один від одного. Ізоляти чорної ніжки можуть бути охарактеризовані на ґрунті випробувань на патогенність та молекулярно-філогенетичного аналізу (див., наприклад, З. Зу та співавт., *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1668), який включений у цей документ як посилання.

Ізоляти *L. maculans* можуть бути віднесені до різних груп патогенності (PG), залежно від їхньої специфічної взаємодії з сортами *B. napus* Westar, Galcier та Quinta [Менгісту та співавт., (1991), *Plant Disease* 75:1279-1282]. Ізоляти PG4 викликають спороутворюючі ураження у всіх трьох сортів, тоді як ізоляти PG3 викликають реакцію стійкості на сім'ядолях Quinta, а ізоляти PG2 викликають реакцію стійкості на сім'ядолях Quinta та Glacier. Ізоляти PG1 є непатогенними у цих хазяїв. Ізоляти PG2, PG3 і PG4 називаються "високоагресивні", або "високовірулентні", або "сильно патогенні" ізоляти, а ізоляти PG1 зазвичай називаються "неагресивні" або "невірулентні", або "слабо патогенні". Високоагресивна група відрізняється від слабоагресивної групи виробленням токсинів (ізоляти Tox+ проти ізолятів Tox°). Було виявлено, що ізоляти Tox° спричиняють некроз серцевини, який не супроводжується зовнішніми симптомами, і далі поділяються на три групи: NA1, NA2 і NA3, і було висловлено припущення, що ізоляти NA1 переважають у Європі, а ізоляти NA2 більш важливі в Канаді.

В одному аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *L. maculans*. Інакше кажучи, рослина є стійкою до зараження на *L. maculans*. В одному аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *L. biglobosa*. Інакше кажучи, рослина є стійкою до зараження на *L. biglobosa*.

"Стійкість до патогенів", "стійкість до грибів" та "стійкість до хвороб" означають, що рослина уникає або виявляє зменшені симптоми хвороби, які є результатом взаємодії рослини з патогеном. Інакше кажучи, запобігається виникнення хвороб рослин у патогенів та асоційованих з ними симптомів захворювання, або зменшуються симптоми захворювання, які спричиняються патогеном, як-от, наприклад, зменшення стресу та асоційованих з ним втрат.

Використовуваний у цьому документі термін "стійкість до грибів" стосується підвищеної стійкості або толерантності до грибкового патогену, порівняно з рослиною, яка не містить щонайменше один з описаних у цьому документі маркерів. Стійкість може варіюватися від підвищення толерантності до впливів грибкового патогену (наприклад, часткового інгібування патогену) до повної стійкості, такої, що присутність грибкового патогену не впливає на рослину.

Термін "стійкість" рослин, які містять певний ген стійкості або маркери, як описано в цьому документі, стосується зменшення шкоди, заподіяної зараженню грибами, порівняно зі збитком, заподіяним контрольним рослинам. Збитки можуть бути оцінені, наприклад, за кількістю і розміром симптомів на листі, частотою і тяжкістю симптомів на стеблі, виляганням рослин через зараження стебла.

Зокрема, зменшення збитків проявляється у зменшенні втрат урожаю, коли рослини вирощують у польових умовах під тиском хвороб, порівняно з контрольними рослинами. Таке зменшення втрат урожаю може, наприклад, бути пов'язане з тим фактом, що зараження, розмноження, поширення або виживання гриба зменшуються або запобігаються у рослин з підвищеною стійкістю. Підвищена стійкість може стосуватися рослин, які повністю стійкі, тобто до рослин, на яких не виявлено симптомів захворювання, або до рослин, які отримали найвищі бали стійкості в наявному оцінному кількісному аналізі на чорну ніжку, наприклад, Хангура і співавт. (2003, Міністерство сільського господарства, Західна Австралія, Farmnote № 6/2003, ISSN 0726-934X), який включений у цей документ як посилання.

Підвищена стійкість також може бути оцінена за допомогою біоаналізів, що проводяться в контрольованих умовах, як-от камери для вирощування, але в ідеалі вона підтверджується у польових випробуваннях, оскільки оцінки контрольованого середовища можуть не відображати польових умов. Це може бути пов'язано з тим фактом, що в біоаналізах зазвичай випробують невелику кількість одиничних спорових ізолятів гриба, тоді як у польових умовах існує набагато більша варіабельність популяції патогену.

В одному аспекті, стійкість вимірюють в польових умовах. Відповідно, способи згідно з цим винаходом можуть відбирати або ідентифікувати рослину *B. parus*, яка має підвищеною стійкістю до *Phoma stem canker*, під час вирощування в полі або в польових умовах.

Наприклад, стійкість може бути виміряна із застосуванням системи балів PG2 або системи балів передчасного дозрівання (PMR), описаної в Прикладі 2.

Наприклад, використовуючи систему балів PG2, описану в Прикладі 2, рослина *B. parus*, що має щонайменше один маркер згідно з цим винаходом, може мати зменшення бала PG2 щонайменше на 10 %, щонайменше на 20 %, щонайменше на 30 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 70 % або щонайменше на 80 %, порівняно з контрольними рослинами або еквівалентними рослинами, які чутливі до зараження (наприклад, які не мають щонайменше одного маркера згідно з винаходом і не мають локусу стійкості *LepR1* або гена стійкості).

Рослина *B. parus*, ідентифікована за допомогою цього винаходу, може мати бал стійкості приблизно 6,0-9,0 при вимірюванні за допомогою австралійського бала чорної ніжки (ABR) (Маркрофт та співавт., Aust. J. Exp. Agric. 42: 587-594, що включено в цей документ як посилання). Наприклад, при оцінці стійкості за шкалою від 1,0 до 9,0, де 1,0 є найбільш чутливим, а 9,0 є найбільш стійким фенотипом, рослина, у якої немає щонайменше одного маркера згідно з цим винаходом, може мати бал менше 5, наприклад, приблизно від 1,0 до 2,0, при цьому рослина згідно з цим винаходом може мати бал щонайменше п'ять, наприклад, від 5,0 до 10, або від 5,0 до 8,0.

В одному аспекті, рослина *B. parus*, ідентифікована способом згідно з цим винаходом, яка має стійкість до *Phoma stem canker*, має агрономічно прийнятний урожай. В одному варіанті здійснення цього винаходу, урожай вимірюється як маса ядра (центнерів на гектар).

Коли спосіб згідно з цим винаходом використовується для відбору або ідентифікації рослин із програми селекції, спосіб дозволяє ідентифікувати потомство, яке має стійкість до *Phoma stem canker*, і яке має агрономічно прийнятний урожай. Наприклад, спосіб може бути застосований для відбору потомства, яке буде мати урожай, порівняний з рослиною-реципієнтом, наприклад, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 % урожаю рослини-реципієнта (під час вирощування в аналогічних польових умовах).

В одному аспекті, інтрогресована (або зворотносхрещена) рослина *B. parus*, ідентифікована способом згідно з цим винаходом і має стійкість до *Phoma stem canker*, має щонайменше агрономічно прийнятний урожай, а це означає, що його можна вигідно використовувати в сільському господарстві.

Слід розуміти, що умови довкілля, як-от місце розташування, погодні умови та тиск захворювання, а також індивідуальне сприйняття людини, що оцінює симптоми захворювання, можуть впливати на бал стійкості до чорної ніжки. Отже, фахівцю в цій галузі техніки буде зрозуміло, що відмінності у цих факторах у порівняльних випробуваннях мають бути зведені до мінімуму.

Будь-які інші бали стійкості, відомі в цій галузі техніки, можуть бути застосовані згідно з цим винаходом для порівняння рослин згідно з цим винаходом з контрольними рослинами.

Підвищена або покращена стійкість до грибів може стосуватися підвищеного рівня стійкості до певного грибкового патогену (як-от *L. maculans* і/або *L. biglobosa*) або до ширшого спектру грибкових патогенів.

Зокрема, цей винахід стосується рослин *B. parus*, які стійкі до зараження на грибкові патогени (як-от *L. maculans* і/або *L. biglobosa*), або які мають підвищену стійкість до зараження *L. maculans* і/або *L. biglobosa* унаслідок локусу *LepR1*.

Відповідно, зазначені рослини зазвичай виявляють підвищену стійкість порівняно з еквівалентними рослинами, які сприйнятливі до зараження *L. maculans* і/або *L. biglobosa*, оскільки у них відсутній локус стійкості *LepR1*.

В одному аспекті, винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. parus*, яка має стійкість, що асоційована з локусом *LepR1* або викликана ним.

Використовуваний у цьому документі термін "локус" є положенням, в якому ген розташований на хромосомі.

"Локус *LepR1*" стосується положення в групі зчеплення A02/на хромосомі, де розташований "ген стійкості" до *Phoma stem canker*. Це визначення включає фрагмент (або сегмент) геномної ДНК хромосоми, на якій розташований локус стійкості *LepR1*.

Локус *LepR1*, згаданий у цьому документі, розташований у межах хромосомного інтервалу, який відповідає інтервалу між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10, наприклад, між SEQ ID No: 2 та SEQ ID No: 9, наприклад, між SEQ ID No: 3 та SEQ ID No: 8, наприклад, між SEQ ID No: 4 та SEQ ID No: 7, наприклад, між SEQ ID No: 5 та SEQ ID No: 6. Відповідно, локус *LepR1*, згаданий у цьому документі, розташований в межах хромосомного інтервалу, який відповідає інтервалу між ra24982s01 і ra25063s01, наприклад, між ra74607s01 і ra25042s01, наприклад, між ra74625s01 і ra25028s01, наприклад, між ra74605s01 та ra74593s01, наприклад, між ra74601s01 та ra74589s02.

Інакше кажучи, локус стійкості *LepR1*, згаданий у цьому документі, розташований в межах хромосомного інтервалу, який відповідає положенням з 17985071 до 18087922 еталонного геному *Darmor* в.4.1.

Складання послідовності еталонного геному *B. napus Darmor-bzh* версії 4.1 було опубліковано в 2014 році; див., наприклад, Чалхуб і співавт., 2014 *Science* 345: 950-953, яка включена в цей документ як посилання.

Інші опубліковані складання геному *B. napus* включають *Darmor-bzh* в.8.1 та *Tapidor* (обидва описані Байєром та співавт., (2017) 1027 *Plant Biotechnol. J.* 15 1602-1610); *ZS11* (Сан та співавт., (2017) *Plant J.* 92 452-468); і зимовий сорт *Express 617* (Лі та співавт., (2020) *Front Plant Sci.* 11: 496), всі з яких включені в цей документ як посилання.

Фахівець в цій галузі техніки здатний визначити, чи відповідає хромосомний інтервал зазначеним інтервалам, використовуючи способи, що є в цій галузі техніки, наприклад, за допомогою інструментів вирівнювання послідовностей та порівняння.

Використовуваний у цьому документі "ген стійкості" стосується послідовності ДНК, яка надає або асоційована з підвищеною стійкістю рослини, переважно, рослини *B. napus*, *Phoma stem canker*, порівняно з рослиною, позбавленою гена (генів) стійкості, або мають нефункціональну (або інактивовану) форму гена (генів).

"*LepR1*" являє собою "локус стійкості до *Phoma stem canker*", який зчеплений з маркерами на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 і SEQ ID No: 10, наприклад, зчеплений з маркерами *ra24982s01*, *ra74607s01*, *ra74625s01*, *ra74605s01*, *ra74601s01*, *ra74589s02*, *ra74593s01*, *ra25028s01*, *ra25042s01* та *ra25063s01*.

В одному аспекті, локус стійкості *LepR1* або ген стійкості *LepR1* може бути перенесений з рослини-донора в рослину-реципієнт, як-от різні різновиди *B. napus*, і навіть у різні види рослин *Brassica*, наприклад, *B. juncea*, наприклад, із застосуванням молекулярних маркерів за цим винаходом. Відповідно, перенесення локусу або гена стійкості *LepR1* може підвищити стійкість рослини-реципієнта до *Phoma stem canker*.

Рослина *B. napus*, яка має щонайменше один маркер згідно з цим винаходом, може мати підвищену стійкість до *Phoma stem canker*, порівняно з зіставлюваною рослиною, як-от рослина *B. napus*, у якій немає щонайменше одного маркера згідно з цим винаходом.

Не бажаючи обмежуватися теорією, описані в цьому документі, маркери зчеплені з локусом стійкості *LepR1* або геном стійкості *LepR1*; отже, рослина *B. napus*, яка має щонайменше один маркер згідно з цим винаходом, містить локус стійкості *LepR1* або ген стійкості *LepR1*, і має підвищену стійкість до *Phoma stem canker*, порівняно з зіставлюваною рослиною, як-от *B. napus*, яка не має щонайменше одного маркера згідно з цим винаходом, і яка не містить локус стійкості *LepR1* або ген стійкості *LepR1*.

Маркер

В одному аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker*.

В іншому аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker*, що містить виявлення у зазначеної рослини *B. napus* або її частини (наприклад, тканини або насіння) наявності або відсутності щонайменше одного маркера, описаного у цьому документі.

Використовуваний у цьому документі "маркер" стосується молекулярного маркера, який являє собою вимірну генетичну характеристику з фіксованим положенням в геномі, яка зазвичай успадковується менделівським способом, і яка може бути застосована для картування ознаки, що цікавить.

Природа маркера залежить від використовуваного молекулярного аналізу і може бути виявлена лише на рівні ДНК, РНК або білка.

Доступні численні типи маркерів, включаючи, але не обмежуючись ними, одонуклеотидні поліморфізми (SNP); мікросателіти, які також називають SSR; маркерні експресовані послідовності (EST) і SSR, отримані з послідовностей EST; поліморфізми довжин рестрикційних фрагментів (RFLP); випадкова ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD) та поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Олігонуклеотиди або праймери можуть застосовуватися як маркери за умови, що вони можуть бути застосовані для отримання детектованого сигналу (як, наприклад, продукт ампліфікації). Крім того, маркери, праймери та олігонуклеотиди згідно з цим винаходом можуть бути з'єднані з флуоресцентним барвником для генерування сигналу флуоресценції, наприклад, при збудженні світлом відповідної довжини хвилі. Флуоресцентним барвником може бути флуорохром. Олігонуклеотиди згідно з цим винаходом можуть бути з'єднані з іншими сполуками, які придатні для створення сигналу. Такі маркери, праймери або олігонуклеотиди не зустрічаються в природі і не можуть бути виділені з природи. Для отримання таких мічених олігонуклеотидів виконується наступне: ДНК може бути позначена біоортогонально. Для цього ДНК може бути позначена *in vivo* або *in vitro* аналогами нуклеозидів, які, наприклад, згодом можуть бути з'єднані з флуорофором унаслідок реакції Штаудінгера. На додаток до цього, ДНК також може бути отримана хімічним шляхом за допомогою флуорофорів. Маркери, праймери та олігонуклеотиди можуть бути позначені за допомогою синтезу фосфорамідиту за допомогою флуорофорів, які, наприклад, застосовують у QPCR (кількісна ПЛР), секвенування ДНК та гібридизації *in situ*. Крім того, ДНК може бути згенерована ферментативно під час полімеразної ланцюгової реакції (PCR) за допомогою флуоресцентних нуклеотидів, або позначена за допомогою лігази, або термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази. ДНК також може бути виявлена опосередковано за допомогою біотинілування та флуоресцентного авідину. Для сполук, як флуорофорів, крім іншого, застосовуються флуоресцеїн, флуоресцентні лантаніди, наночастинки золота, вуглецеві нанотрубки або квантові точки. Однією з найчастіше використовуваних флуоресцентних речовин є FAM (карбоксифлуоресцеїн). Отже, цей винахід охоплює олігонуклеотиди і, зокрема, праймери, які мають FAM-маркування. FAM, переважно, присутній у вигляді 6-FAM, при цьому – залежно від бажаної довжини хвилі випромінювання та збудження – можуть, однак, також застосовуватись інші варіанти FAM, наприклад, 5-FAM. Прикладами додаткових флуоресцентних маркерів є AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red та Yakima Yellow. Залежно від галузі застосування праймери або олігонуклеотиди можуть бути забезпечені модифікаціями основ або сахарофосфатним кістяком. Серед них, серед іншого, аміно-dT, азид-dT, 2-амінопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксіінозин (INO), 3'-дезоксі-A, C, G, 5-Met-dC, 5-OH-Met-dCN6-Met-dA та інші. Якщо необхідно

застосувати методи картування, відповідні праймери, олігонуклеотиди визначаються методом картування.

В одному аспекті, щонайменше один маркер згідно з цим винаходом є SNP-маркером (SNP - однонуклеотидний поліморфізм). SNP-маркери виявляють нуклеотидні заміни в одній парі основ. SNP є найбільш поширеними з молекулярних маркерів, тому мають потенціал для забезпечення найвищої роздільної здатності генетичної карти. SNP можуть бути проаналізовані з більш високою продуктивністю, ніж SSR, вимагають невеликої кількості ДНК і є відносно недорогими системами. Доступно кілька методів генотипування SNP, включаючи, але не обмежуючись ними, гібридизацію, подовження праймера, лігування олігонуклеотидів, розщеплення нуклеазами, мінісеквенування та кодовані сфери.

Процес або спосіб, описаний вище, що стосується полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), може містити два алель-специфічних прямих праймера (або їхнє застосування), і при цьому етап виявлення включає метод резонансного перенесення енергії флуоресценції (FRET), при цьому присутність, відсутність або вид флуоресценції визначається датчиком. Сигнал датчика може бути перетворений в електронному вигляді і/або дані, що зберігаються в електронному вигляді, що представляють виявлення присутності молекули нуклеїнової кислоти або нуклеотидної послідовності. Крім того, дані, що передаються в електронному вигляді і/або зберігаються в електронному вигляді, можуть зберігатися на машинозчитуваному носії. Видом флуоресценції може бути її колір/довжина хвилі або конкретний барвник, відповідальний за флуоресценцію (наприклад, FAM або HEX). Визначення флуоресценції датчиком може являти собою зчитування кінцевої точки флуоресценції.

Під термінами "гібридизація" або "гібридування" слід розуміти процес, при якому одноланцюгова молекула нуклеїнової кислоти зв'язується з ланцюгом нуклеїнової кислоти, яка комплементарна максимально можливою мірою, тобто, утворює з нею пари основ. Стандартні методи гібридизації описані, наприклад, в роботі Сембрук і співавт., Молекулярне клонування: Лабораторний посібник, 3-є вид., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001. Переважно слід розуміти, що щонайменше 60 % - краще щонайменше 65 %, 70 %, 75 %, 80 % або 85 % і, особливо переважно, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % - основ молекули нуклеїнової кислоти утворюють спарювання основ з ланцюгом нуклеїнової кислоти, яка комплементарна максимально можливою мірою. Можливість такого відпаду залежить від жорсткості умов гібридизації. Термін "жорсткість" стосується умов гібридизації. Висока жорсткість присутня, коли спарювання основ ускладнюється; низька жорсткість присутня, якщо спарювання основ спрощується. Наприклад, жорсткість умов гібридизації залежить від концентрації солі або іонної сили та температури. Загалом, жорсткість може бути збільшена шляхом підвищення температури і/або зменшення вмісту солі. Під терміном "жорсткі умови гібридизації" слід розуміти такі умови, за яких гібридизація переважно відбувається лише між гомологічними молекулами нуклеїнових кислот. Отже, термін "умови гібридизації" стосується не тільки умов, що переважають при фактичному додаванні нуклеїнових кислот, але також і умов, що переважають на наступних етапах промивання. Наприклад, жорсткі умови гібридизації являють собою умови, за яких переважно гібридизуються тільки ті молекули нуклеїнової кислоти, які мають щонайменше 70 % - переважно, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 % щонайменше 90 % або щонайменше 95 % ідентичність послідовностей. Жорсткими умовами гібридизації є, наприклад: гібридизація 4 x SSC при температурі 65 °C і подальше повторне промивання 0,1 x SSC при температурі 65 °C загалом протягом приблизно 1 години. Гібридизація переважно відбувається у жорстких умовах. Послідовності, які гібридизуються в жорстких умовах з локусом стійкості, є частиною винаходу.

SNP можуть бути застосовані для опису гаплотипу для будь-якого конкретного генотипу. SNP-маркером може бути, наприклад, маркер KASPAR, як описано в цьому документі в іншому місці.

В одному аспекті, щонайменше один маркер згідно з цим винаходом є SNP-маркером (SNP - однонуклеотидний поліморфізм).

PCR - це відносно короткі ділянки тандемно повторюваної ДНК довжиною 6 п.о. або менше. Поліморфізми виникають через відмінності в кількості повторюваних одиниць. Зміна довжини повтору може бути виявлена шляхом створення ПЛР-праймерів для консервативних неповторних фланкуючих областей. SSR добре придатні для картування та MAS (маркерна селекція), оскільки вони мультиалельні, кодомінантні, відтворювані та піддаються автоматизації з високою продуктивністю. Оцінка або маркерний генотип ґрунтуються на відносному розмірі ампліфікованого фрагмента.

В одному аспекті щонайменше один маркер згідно з винаходом є FLP-маркером (FLP – поліморфізм довжини фрагментів)

Можуть бути згенеровані різні типи FLP-маркерів. Здебільшого, ампліфікації ні праймери використовуються для генерації поліморфізмів довжини фрагмента. Такі FLP- маркери подібні до SSR-маркерів, за винятком того, що область, що ампліфікується праймерами, зазвичай не є областю з високим ступенем повторів. Однак ампліфікована область, або амплікон, матиме достатню варіабельність серед зародкової плазми, найчастіше через вставки або делеції, так що фрагменти, що генеруються ампліфікаційними праймерами, можуть бути помітні серед поліморфних індивідуумів.

Щоб маркери були корисними, вони мають виявляти відмінності або поліморфізми у контрольованій популяції. Для молекулярних маркерів це означає відмінності на рівні ДНК через відмінності у полінуклеотидних послідовностях (наприклад, SSR, RFLP, SNP). Геномна варіабельність може мати будь-яке походження, наприклад, вставки, делеції, дуплікації, повторювані елементи, точкові мутації, події рекомбінації або наявність і послідовність транспонованих елементів. Молекулярні маркери можуть бути отримані з геномних або експресованих нуклеїнових кислот (наприклад, EST). EST, зазвичай, добре зберігаються всередині виду, в той час як інші області ДНК (зазвичай не кодуєчі) мають тенденцію накопичувати поліморфізм і, отже, можуть бути більш варіабельними у індивідуумів одного й того ж виду. Ряд молекулярних маркерів Brassica відомий у цій галузі техніки, та опублікований або доступний з різних джерел, як-от Інформаційний портал Brassica Інституту Ерлхема.

В іншому аспекті, цей винахід пропонує зонди молекулярних маркерів для застосування у способах згідно з

цим винаходом.

"Зонд молекулярного маркера" являє собою послідовність або молекулу нуклеїнової кислоти, яка може бути застосована для ідентифікації присутності маркера або маркерного локусу, наприклад зонд нуклеїнової кислоти, який є комплементарним послідовності маркерного локусу.

У деяких аспектах маркерний зонд належить до зонда будь-якого типу, який здатний розрізняти (тобто генотип) конкретний алель, який присутній у маркерному локусі. Нуклеїнові кислоти "комплементарні", коли вони специфічно гібридизуються в розчині, наприклад, відповідно до правил парування основ за Уотсоном-Криком.

Повідомляється, що маркер "зчеплений" з геном, локусом або ознакою, або "асоційований з ним", якщо маркер і ген, локус або ознака мають більшу асоціацію у спадкуванні, ніж можна було б очікувати від незалежного розподілу, наприклад, маркер і локус можуть косегрегувати в сегрегуючій популяції і розташовані на одній і тій же хромосомі.

"Зчеплення" стосується генетичної відстані маркера від локусу (або двох локусів, або двох маркерів один від одного). Чим тісніше зчеплення, тим менша ймовірність того, що станеться подія рекомбінації, яка відокремить маркер від гена або локусу. Генетична відстань (відстань на генетичній карті) розраховується за частотами рекомбінації та виражається у сантиморганах (сМ).

Локуси або гени зазвичай вважаються генетично зчепленими, якщо частота рекомбінації між ними становить менше приблизно 50 %, як визначено на карті одного мейозу. Вони стають все більш зчепленими, якщо частота рекомбінації становить приблизно 40 %, приблизно 30 %, приблизно 20 %, приблизно 10 % або менше, як визначено на карті одного мейозу. Щонайменше два гени фізично зчеплені (або синтеничні), якщо було продемонстровано, що вони містяться на одній ділянці ДНК, такий як хромосома. Генетично зчеплені гени будуть фізично зчеплені (або синтеничні), але точна фізична відстань (кількість нуклеотидів), можливо, ще не продемонстрована.

Використовуваний у цьому документі термін "тісно зчеплений" стосується генетично зчеплених маркерів в межах 15 сМ або менше, включаючи, без обмеження, 12 сМ або менше, 10 сМ або менше, 8 сМ або менше, 7 сМ або менше, 6 сМ або менше, 5 сМ або менше, 4 сМ або менше, 3 сМ або менше, 2 сМ або менше, 1 сМ або менше і 0,5 сМ або менше, як визначено на генетичній карті.

Використовуваний у цьому документі термін "хромосомний інтервал" стосується безперервного лінійного відрізка геномної ДНК, який знаходиться в планті на одній хромосомі, що зазвичай визначається з посиланням на два маркери. Переважно, щоб інтервал дійсно включав два фланкуючі маркери.

В одному аспекті, хромосомний інтервал стосується послідовності, що містить будь-які два SEQ ID No: від 1 до 10, і послідовність між зазначеними послідовностями.

Наприклад, хромосомний інтервал може повністю охоплювати SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10 і всі послідовності між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10. Відповідно, хромосомний інтервал може повністю охоплювати SEQ ID No: 5 і SEQ ID No: 6 і всі послідовності між SEQ ID No: 5 і SEQ ID No: 6.

В одному аспекті, хромосомний інтервал належить до алелей в межах будь-яких двох SEQ ID No: від 1 до 10 і послідовності між зазначеними алелями.

Наприклад, хромосомний інтервал може охоплювати алель ra24982s01 та алель ra25063s01, та послідовність між зазначеними алелями. Відповідно, хромосомний інтервал може повністю охоплювати алель ra74601s01 та алель ra74589s02 та всі послідовності між зазначеними алелями.

Використовуваний у цьому документі термін "подія рекомбінації" стосується виникнення рекомбінації між гомологічними хромосомами і належить до конкретного місця розташування хромосоми, де відбулася така рекомбінація (наприклад, рекомбінація хромосомного інтервалу, внутрішнього відносно кінцевих точок хромосоми, матиме подію рекомбінації на кожному кінці хромосомного інтервалу).

У контексті цього винаходу хромосомний інтервал знаходиться між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10. Інтервал може містити SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10 та будь-яку послідовність між ними. Інтервал може охоплювати алель, ідентифікований в SEQ ID No: 1 (ra24982s01), і алель, ідентифікований в SEQ ID No: 10 (ra25063s01), і будь-яку послідовність між ними.

Відповідно, хромосомний інтервал може бути між SEQ ID No: 2 та SEQ ID No: 9. Інтервал може охоплювати SEQ ID No: 2 та SEQ ID No: 9 та будь-яку послідовність між ними. Інтервал може охоплювати алель, ідентифікований в SEQ ID No: 2 (ra74607s01), і алель, ідентифікований в SEQ ID No: 9 (ra25042s01), і будь-яку послідовність між ними.

Відповідно, хромосомний інтервал може бути між SEQ ID No: 3 та SEQ ID No: 8. Інтервал може охоплювати SEQ ID No: 3 та SEQ ID No: 8 та будь-яку послідовність між ними. Інтервал може охоплювати алель, ідентифікований в SEQ ID No: 3 (ra74625s01), і алель, ідентифікований в SEQ ID No: 8 (ra25028s01), і будь-яку послідовність між ними.

Відповідно, хромосомний інтервал може бути між SEQ ID No: 4 та SEQ ID No: 7. Інтервал може охоплювати SEQ ID No: 4 та SEQ ID No: 7 та будь-яку послідовність між ними. Інтервал може охоплювати алель, ідентифікований в SEQ ID No: 4 (ra74605s01), і алель, ідентифікований в SEQ ID No: 7 (ra74593s01), і будь-яку послідовність між ними.

Відповідно, хромосомний інтервал може бути між SEQ ID No: 5 та SEQ ID No: 6. Інтервал може охоплювати SEQ ID No: 5 та SEQ ID No: 6 та будь-яку послідовність між ними. Інтервал може охоплювати алель, ідентифікований в SEQ ID No: 5 (ra74601s01), і алель, ідентифікований в SEQ ID No: 6 (ra74589s02), і будь-яку послідовність між ними.

Відповідно, хромосомний інтервал можна визначити за допомогою SEQ ID No: 5. Відповідно, хромосомний інтервал можна визначити за допомогою SEQ ID No: 6. Відповідно, щонайменше один маркер може бути тісно зчеплений з будь-яким з SEQ ID No: 1-10. Відповідно, щонайменше один маркер може бути тісно зчеплений з ra74601s01, алелем, ідентифікованим SEQ ID No: 5, і/або ra74589s02, алелем, ідентифікованим SEQ ID No: 6.

В одному аспекті, щонайменше один маркер може знаходитися на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1

та SEQ ID No: 10; і бути тісно зчепленим з SEQ ID No: 5, або ra74601s01, алелем, ідентифікованим в SEQ ID No: 5 i/або тісно зчепленим з SEQ ID No: 6, або ra74589s02, алелем, ідентифікованим в SEQ ID No: 6.

В одному аспекті, маркер є або зчеплений (наприклад, тісно зчеплений) щонайменше з одним з наступних алелей:

- a) алель C/T в SEQ ID No: 1 (ra24982s01)
- b) алель C/T в SEQ ID No: 2 (ra74607s01)
- c) алель C/G в SEQ ID No: 3 (ra74625s01)
- d) алель C/T в SEQ ID No: 4 (ra74605s01)
- e) алель C/T в SEQ ID No: 5 (ra74601s01)
- f) алель C/T в SEQ ID No: 6 (ra74589s02)
- g) алель C/T в SEQ ID No: 7 (ra74593s01)
- h) алель G/T в SEQ ID No: 8 (ra25028s01)
- i) алель A/G в SEQ ID No: 9 (ra25042s01) i/або
- j) алель G/T в SEQ ID No: 10 (ra25063s01).

при цьому алель, позначений жирним шрифтом, є алелем, асоційованим зі стійкістю до Phoma stem canker.

Отже, кращий алель - це алель, позначений жирним шрифтом вище.

Відповідно, маркер, описаний у цьому документі, може виявляти щонайменше один із наступних алелей:

- a) алель C/T ra24982s01
- b) алель C/T ra74607s01
- c) алель C/G ra74625s01
- d) алель C/T ra74605s01
- e) алель C/T ra74601s01
- f) алель C/T ra74589s02
- g) алель C/T ra74593s01
- h) алель G/T ra25028s01
- i) алель A/G ra25042s01 i/або
- j) алель G/T ra25063s01.

Кращий алель - це алель, позначений жирним шрифтом вище.

Відповідно, спосіб згідно з цим винаходом може містити виявлення щонайменше алелю C/T ra74601s01 i/або алелю C/T ra74589s02.

В одному аспекті, спосіб згідно з цим винаходом може містити виявлення більше одного маркера, наприклад, щонайменше двох маркерів, щонайменше трьох, щонайменше чотирьох, щонайменше п'яти, щонайменше шести, щонайменше семи, щонайменше восьми, щонайменше дев'яти, щонайменше десяти маркерів.

Не бажаючи обмежуватися теорією, можна використовувати щонайменше два маркери, які фланкують LepR1 або гаплотип, описаний у цьому документі. Наприклад, щонайменше один маркер може бути вище, і щонайменше один маркер може бути нижче LepR1 або гаплотипу, як описано в цьому документі.

Таблиця 1

Фізичні положення геному маркерів, розкритих у цьому документі щодо Darmor v.4.1.

Назва маркера	Напрямок	Фізичне положення геному на ґрунті Darmor v.4.1	Алель стійкості/чутливий алель Y
ra24982s01	F	17261239	C/T
ra74607s01	R	17643282	T/C
ra74625s01	F	17712460	G/C
ra74605s01	F	17869714	T/C
ra74601s01*	F	17985071	T/C
ra74589s02*	F	18087922	C/T
ra74593s01	F	18184032	C/T
ra25028s01	F	18255015	T/G
ra25042s01	R	18335590	G/A
ra25063s01	F	18698483	G/T

* вказує, що цей маркер є діагностичним для гаплотипу стійкості.

В одному аспекті, спосіб згідно з цим винаходом містить виявлення у вказаній рослині *B. parvus* або її частини (як-от тканина або насіння) присутність або відсутність щонайменше двох маркерів, при цьому щонайменше один маркер міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 10 та SEQ ID No: 6.

В іншому аспекті,

a) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 2 та SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 9 та SEQ ID No: 6; i/або,

b) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 3 та SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 8 та SEQ ID No: 6; i/або,

с) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 4 та SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 7 та SEQ ID: 6; і/або,

д) щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі, визначеному SEQ ID No: 5, і щонайменше один із зазначених маркерів міститься на хромосомному інтервалі, визначеному SEQ ID No: 6. На генетичній карті зчеплення одного молекулярного маркера з геном, локусом або іншим маркером вимірюється як частота рекомбінації. Наприклад, відсутність точної пропорційності між сМ та фізичною відстанню може призвести до варіації в частотах рекомбінації для різних хромосомних областей; деякі області є "гарячими точками" рекомбінації, тоді як у інших відбуваються рідкісні події рекомбінації.

В одному аспекті, щонайменше один маркер може мати частоту рекомбінації приблизно 50 % або менше (наприклад, приблизно 40 % або менше, наприклад, приблизно 30 % або менше, наприклад, приблизно 20 % або менше, наприклад, приблизно 10 % або менше) з ra74601s01 або SEQ ID No: 5 і/або ra74589s02 або SEQ ID No: 6.

В одному аспекті, щонайменше один маркер може бути розташований в межах 750 т.п.о. або менше від ra74601s01 або SEQ ID No: 5, або ra74589s02, або SEQ ID No: 6, наприклад, 700 т.п.о. або менше, 650 т.п.о. або менше, 600 т.п.о. або менше, 550 т.п.о. або менше, 500 т.п.о. або менше, 450 т.п.о. або менше, 400 т.п.о. або менше, 350 т.п.о. або менше, 300 т.п.о. або менше, 250 т.п.о. або менше, 200 т.п.о. або менше, 150 т.п.о. або менше, 100 т.п.о. або менше, 50 т.п.о. або менше, коли відстань відповідає еквівалентним фізичним положенням геному на A02 Darmog v.4.1.

Вирівнювання послідовностей або контиги також можуть бути застосовані для пошуку послідовностей вище або нижчих по потоку від конкретних маркерів, описаних тут. Ці нові послідовності, тісно зчеплені з описаними в цьому документі маркерами, потім використовуються для виявлення та розробки функціонально еквівалентних маркерів згідно з цим винаходом.

Наприклад, різні фізичні і/або генетичні карти можуть бути вирівняні для визначення розташування еквівалентних маркерів, не описаних в рамках цього розкриття, але які містяться в межах аналогічних хромосомних областей згідно з цим винаходом.

Інформацію про вирівнювання генетичних та фізичних карт Brassica та асоційованих з ними інструментів можна знайти на веб-сторінці Brassica Genome [Хургобін, Б., та співавт., Plant biotechnology journal 2018, 16, 1265-1274 (2011); Nature Genetics 43: 1035-1040 Маршалл та співавт., Plant Methods 6:19 (2010); Голич та співавт., Nature Communications 7:13390 (2016)], на якій розміщені бази даних з геному Brassica, а також на веб-сайті Brassica Database (BRAD) та у базі даних PlantGDB.

Комерційні ознаки

В одному аспекті, цей винахід стосується рослин *B. napus*, які мають стійкість до Phoma stem canker і мають комерційно бажані ознаки.

В одному аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини, яка має стійкість до Phoma stem canker, і яка має комерційно бажані ознаки.

Отже, в одному варіанті здійснення цього винаходу, способи та застосування цього винаходу стосуються підвищення стійкості до Phoma stem canker при збереженні характеристик і/або інших комерційно бажаних ознак комерційної рослини *B. napus* (наприклад, урожай).

Термін "комерційно бажані ознаки" буде містити такі ознаки, як урожайність, висота зрілої рослини (наприклад, зменшена висота рослини може бути вигідною для зменшення ризику вилягання), кондиційне зерно, кількість придатних для збору стручків, вміст олії в насінні, суха маса насіння, кількість листя, якість олії, абіотична толерантність до стресу (наприклад, до посухи), стійкість до осипання, толерантність до гербіцидів і/або толерантність до біотичного стресу (наприклад, до комах, бактерій або грибів).

Переважно вихід з масою ядер. Переважно, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини, яка має стійкість до Phoma stem canker, і яка має масу ядер, що становить щонайменше 20 центнерів на гектар або щонайменше 22 центнери на гектар, переважно, 24 центнери на гектар, більше переважно, 26 центнерів на гектар. Маса ядер стосується урожаю, що виробляється дорослою рослиною на момент збирання урожаю.

Комерційні рослини *B. napus* (рослини, придатні для комерційного вирощування) зазвичай містять нижчі рівні ерукової кислоти та нижчі рівні глюкозинолатів, ніж дикорослі рослини. Отже, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації рослини, яка має стійкість до Phoma stem canker, і має низькі рівні ерукової кислоти і/або глюкозинолатів. Переважно, щоб рівні ерукової кислоти становили менше 2 % відносно загального вмісту олії. Переважно, щоб рівень глюкозинолатів становив менше 25 пмоль на грам кукурудзи при вмісті вологи 9 %.

В одному аспекті, рослина має комерційно бажані ознаки "каноли".

Термін "канола", що використовується в цьому документі, стосується олійної рослини роду Brassica (*B. napus*, Brassica rapa або Brassica juncea), олія з насіння якої містить менше 2 % ерукової кислоти за її профілем жирних кислот, а твердий компонент містить менше 30 мікромоль будь-якого одного або будь-якої суміші 3-бутенілглюкозинолату, 4-пентенілглюкозинолату, 2-гідрокси-3-бутенілглюкозинолату і 2-гідрокси-4-пентенілглюкозинолату на грам повітряно-сухої твердої речовини, що не містить олії.

В одному аспекті, рослина *B. napus* виробляє олію (після подрібнення насіння), що містить менше 2 % ерукової кислоти (від загальної кількості жирних кислот в олії).

В одному аспекті, твердий компонент насіння містить менше 30 мікромоль будь-якого одного або будь-якої суміші 3-бутенілглюкозинолату, 4-пентенілглюкозинолату, 3-гідрокси-3-бутенілглюкозинолату та 2-гідрокси-4-пентенілглюкозинолату на грам повітряно-сухої твердої речовини, що не містить олії.

Селекція

Молекулярні маркери можуть бути застосовані у різних застосуваннях селекції рослин. Одним із основних застосувань є підвищення ефективності зворотного схрещування та інтрогресії генів із застосуванням маркерної селекції (MAS). Молекулярний маркер, який демонструє зчеплення з локусом, що впливає на бажану фенотипову

ознаку, надає інструмент для відбору ознаки в популяції рослин. Це може бути корисно, коли фенотип важко піддається аналізу, наприклад, ознаки стійкості до хвороб або ознака, яка вимірюється на пізній стадії, наприклад, характеристики насіння. Маркерні аналізи ефективніші, ніж польове фенотипування, і дозволяють аналізувати набагато більші популяції, тим самим збільшуючи ймовірність виявлення рекомбінанту з сегментом-мішенню з донорської лінії, введеного в лінію-реципієнт. Чим тісніше зчеплення, тим кориснішим є маркер, оскільки менш ймовірно виникнення рекомбінації між маркером і геном, що викликає ознаку.

Коли локус або ген інтрогресований за допомогою MAS, вводиться не тільки сам ген, а й фланкуючі області. Зазвичай це називається "зчепленим вантажем". Ці фланкуючі області можуть мати додаткові гени, які можуть кодувати комерційно або агрономічно небажані ознаки. Цей "зчеплений вантаж" також може призвести до зниження урожайності або інших негативних агрономічних характеристик навіть після багаторазових циклів зворотного схрещування з елітною лінією. Це також іноді називають "затримкою урожаю". Розмір фланкуючої області може бути зменшений шляхом додаткового зворотного схрещування, хоча це не завжди успішно, оскільки селекціонери не мають контролю за розміром області або рекомбінації. При класичній селекції зазвичай вибираються лише випадкові рекомбінації, які сприяють зменшенню розміру донорського сегмента. Однак за допомогою маркерів можна відібрати рідкісних індивідів, які зазнали рекомбінації поблизу області-мішені (наприклад, локус *LepR1*). Коли місцезнаходження області-мішені відомо, ряд фланкуючих маркерів, що оточують мішень, як описано в цьому документі, може бути застосований для відбору рекомбінацій в популяції різних розмірів.

Ключовими етапами для MAS є: (i) Визначення популяції, в межах якої буде визначена асоціація маркер-ознака, яка може бути сегрегуючою популяцією або випадковою або структурованою популяцією; (ii) моніторинг сегрегації або асоціації поліморфних маркерів щодо ознаки та визначення зчеплення або асоціації із застосуванням статистичних методів; (iii) визначення набору бажаних маркерів на ґрунті результатів статистичного аналізу, та (iv) застосування і/або екстраполяція цієї інформації на поточний набір селекційної зародкової плазми для прийняття рішень щодо відбору на ґрунті маркерів. У протоколах відбору за допомогою маркерів можуть використовуватися різні типи маркерів, наприклад: SNP, SSR і FLP.

В одному аспекті, цей винахід пропонує маркери для MAS рослин *B. napus*, які мають стійкість до *Phoma stem canker*. В іншому аспекті, цей винахід пропонує набори праймерів для MAS рослин *B. napus*, які мають стійкість до *Phoma stem canker*.

Інші аспекти цього винаходу включають способи ідентифікації рослин *B. napus*, які нещодавно надали або посилили стійкість до *Phoma stem canker* шляхом виявлення маркерів, які були інтрогресовані у вказану рослину.

В одному аспекті, цей винахід пропонує спосіб відбору або ідентифікації інтрогресованої рослини, яка має стійкість до *Phoma stem canker*, і має комерційно бажані ознаки.

Відповідно, маркери згідно з цим винаходом можуть бути застосовані для відбору або ідентифікації інтрогресованих рослин, які мають стійкість до *Phoma stem canker*, при зниженні або запобіганні будь-яким негативним агрономічним характеристикам, які можуть бути спричинені зчепленим вантажем.

Спосіб згідно з цим винаходом може бути застосований для відбору або ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker*, при цьому зазначена рослина *B. napus* була отримана шляхом процесу інтрогресії *LepR1* з рослини-донора в рослину-реципієнт *B. napus* для отримання інтрогресованої рослини *B. napus*.

Процес "інтрогресії" часто називають "зворотним схрещуванням", коли процес повторюється щонайменше два рази.

Використовуваний у цьому документі термін "рослина-донор" стосується рослини, яка містить щонайменше один з описаних у цьому документі маркерів, і яка має стійкість до *Phoma stem canker*. Рослина-донор містить бажаний ген або локус, що підлягає інтрогресії в рослину-реципієнт.

Термін "рослина-реципієнт", що використовується в цьому документі, стосується рослини, в яку інтрогресується ген або локус.

Початкове схрещування дає початок поколінню F1; термін "BC1" потім стосується другого застосування реципієнта або рекурентного батька, "BC2" стосується третього застосування рекурентного батька і так далі.

Відповідно, спосіб згідно з цим винаходом може зменшити або усунути зчеплений вантаж у рослини-донора і може призвести до отримання агрономічно корисної лінії або сорту, або до отримання рослини, яка може бути застосована в програмі селекції (наприклад, лінія DH).

Відповідно, рослиною-донором може бути *Brassica rapa subsp. sylvestris* (AA genome).

Рослиною-реципієнтом може бути будь-яка рослина *B. napus*, для якої бажано підвищити стійкість до *Phoma stem canker*.

В одному аспекті, рослиною-реципієнтом може бути елітна лінія або елітний сорт.

Використовуваний у цьому документі термін "елітна лінія" або "елітний сорт" являє собою лінію або сорт, що перевищує з агрономічного погляду, яка була отримана унаслідок багатьох циклів селекції і відбору для отримання чудових агрономічних характеристик. "Елітна інбредна лінія" - це елітна лінія, яка є інбредною, і яка, як було показано, корисна для отримання досить високоврожайних та агрономічно придатних гібридних сортів ("елітний гібридний сорт"). Існує безліч елітних ліній та сортів, які відомі фахівцям у цій галузі техніки селекції *Brassica*. Аналогічно, "елітна зародкова плазма" - це чудова з агрономічної точки зору зародкова плазма, що зазвичай отримується з рослини з чудовими агрономічними характеристиками і/або здатна дати початок рослині з чудовими агрономічними характеристиками, такої як існуюча або нещодавно розроблена елітна лінія *Brassica*.

У цьому документі представлений спосіб вирощування рослин роду *Brassica* або виду *Brassica napus*, що містить

(i) отримання стійкої рослини або насіння за допомогою одного із способів відбору або ідентифікації, описаних у цьому документі

(ii) посадку рослини або насіння, отриманих на етапі (i), і

(iii) культивування рослини або насіння, при цьому спосіб протидіє зараженню культурних рослин *Leptosphaeria maculans* і/або *L. biglobosa*. Посадка на етапі (ii) може відбуватися на ділянці, зараженій *Leptosphaeria maculans* і/або *L. biglobosa*. У кращому варіанті здійснення цього винаходу, спосіб додатково характеризується тим, що кількість застосовуваних фунгіцидів зменшена порівнянно з посадкою рослини або насіння, що не мають стійкості згідно з цим винаходом. Оскільки спори грибів можуть зберігатися на сільськогосподарському полі або у ґрунті протягом тривалого періоду, в іншому варіанті здійснення вищезгаданого способу спосіб повторюють протягом 2, 3, 4 або навіть 5 років на тій же ділянці (наприклад, на тому ж полі). Культивування на етапі (iii) має відбуватися в умовах, які дозволяють рослині рости і/або насінню прорости та згодом рости. Це означає, що рослину або насіння слід помістити у придатний субстрат (наприклад, ґрунт), при цьому субстрат містить достатню кількість води (наприклад, 10-35 % г/г), і при цьому придатне джерело світла (наприклад, сонячне світло) запускає фотосинтез протягом щонайменше частини дня (наприклад, 8-18 годин на добу). У кращому варіанті здійснення способу згідно з цим винаходом, рослина або насіння, отримані на етапі (i), є гомозиготними за стійкістю. Спосіб та кожне його здійснення можуть необов'язково включати етап (iv) - збирання рослини або рослинного матеріалу, як-от, наприклад, насіння. Наведений вище спосіб вирощування може бути частиною способу одержання олії канолі. Спосіб отримання олії канолі включає етапи (i) - (iv) та додатковий етап (v) екстракції олії з насіння, зібраного на етапі (iv).

Рослини

Використовуваний в цьому документі термін "рослина або її частина" включає рослину або будь-яку її частину, як-от рослинна тканина, коріння, листя, стебло, суцвіття, незрілі стручки, стінки стручка і насіння.

У Європі сорти озимого типу вирощують як однорічні сидеральні культури у сівозміні із зерновими культурами та сидеральними культурами. Сорти озимого типу, зазвичай, сильніші, ніж літні сорти, і менш чутливі до неврожаю.

Термін "озимий" або "озимого типу", що використовується в цьому документі, стосується культур, яким потрібна яровизація для початку процесу цвітіння.

Прикладами сортів озимого типу є Darmor-bzh.

Термін "ярий" або "ярого типу", що використовується в цьому документі, стосується культур, яким не потрібна яровизація для початку процесу цвітіння.

У Канаді та Австралії вирощують ярі сорти, які не є зимостійкими та не вимагають яровизації.

В одному аспекті, рослина *B. napus* є інтрогресованою або зворотносхрещеною рослиною.

В одному аспекті рослина-донор є сортом ярого типу.

В одному аспекті рослина-реципієнт належить до сорту озимого типу.

Наприклад, маркери, описані в цьому документі, можуть бути застосовані для внесення стійкості до *Phoma stem canker* (LepR1 на хромосомі A02) від ярого сорту у сорт озимого типу. Маркери, описані в цьому документі, можуть бути використані для мінімізації зчепленого вантажу джерела ярої культури з хромосоми A02.

НАБІР

Цей винахід також стосується набору праймерів для ідентифікації рослини *B. napus*, яка має стійкість до *Phoma stem canker* (як-от стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*).

Відповідно, набір може містити праймери, здатні ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше одного з маркерів, описаних у цьому документі.

Відповідно, набір може містити праймери, здатні ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше одного з таких маркерів:

- a) ra24982s01; і/або
- b) ra74607s01; і/або
- c) ra74625s01; і/або
- d) ra74605s01; і/або
- e) ra74601s01; і/або
- f) ra74589s02; і/або
- g) ra74593s01; і/або
- h) ra25028s01; і/або
- i) ra25042s01; і/або
- j) ra25063s01.

Відповідно, набір праймерів може містити щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше шість, щонайменше сім, щонайменше вісім, щонайменше дев'ять, щонайменше десять наборів праймерів, як визначено у пунктах а)-j) вище.

В одному аспекті, набір праймерів здатний ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше ra74601s01.

В одному аспекті, набір праймерів здатний ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше ra74589s02.

Відповідно, набір праймерів може містити праймери, здатні ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше одного з таких маркерів:

- a) ra24982s01 та ra25063s01;
- b) ra74607s01 і ra25042s01;
- c) ra74625s01 та ra25028s01;
- d) ra74605s01 і ra74593s01;
- e) ra74601s01 і ra74589s02.

Відповідно, набір праймерів може містити щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири або всі п'ять наборів праймерів, як визначено в пунктах а)-е) вище.

В одному аспекті, набір праймерів здатний ідентифікувати присутність або відсутність щонайменше га74601s01 та га74589s02.

Цей винахід також стосується набору праймерів для ідентифікації рослини *B. parus*, яка має стійкість до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибкового патогену (патогенів)

L. maculans і/або *L. biglobosa*), що містить щонайменше одне з наступного.

a) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га24982s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 11, або праймер, що містить SEQ ID No: 12, та праймер, що містить SEQ ID No: 13; і/або

b) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74607s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 14, або праймер, що містить SEQ ID No: 15, та праймер, що містить SEQ ID No: 16; і/або

c) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74625s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 17, або праймер, що містить SEQ ID No: 18, та праймер, що містить SEQ ID No: 19; і/або

d) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74605s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 20, або праймер, що містить SEQ ID No: 21, та праймер, що містить SEQ ID No: 22; і/або

e) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74601s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 23, або праймер, що містить SEQ ID No: 24, та праймер, що містить SEQ ID No: 25; і/або

f) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74589s02, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 26, або праймер, що містить SEQ ID No: 27, та праймер, що містить SEQ ID No: 28; і/або

g) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га74593s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 29, або праймер, що містить SEQ ID No: 30, та праймер, що містить SEQ ID No: 31; і/або

h) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га25028s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 32, або праймер, що містить SEQ ID No: 33, та праймер, що містить SEQ ID No: 34; і/або

i) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га25042s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 35, або праймер, що містить SEQ ID No: 36, та праймер, що містить SEQ ID No: 37; і/або

j) набір праймерів, здатних ідентифікувати присутність або відсутність маркера га25063s01, що містить праймер, що містить SEQ ID No: 38, або праймер, що містить SEQ ID No: 39, та праймер, що містить SEQ ID No: 40.

Відповідно, набір праймерів може містити щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше шість, щонайменше сім, щонайменше вісім, щонайменше дев'ять, щонайменше десять наборів праймерів, як визначено у пунктах a)-j) вище.

В одному аспекті, набір праймерів призначений для ідентифікації рослини *B. parus*, яка має стійкість до Phoma stem canker і має комерційно бажані ознаки. Винахід, зокрема, стосується пари праймерів, згаданих у контексті набору. Переважно, пара цих праймерів є парою, як визначено в пунктах a)-j) вище. Праймер може являти собою олігонуклеотид і/або маркер, переважно молекулярний маркер.

ЗАСТОСУВАННЯ

В одному аспекті, цей винахід пропонує застосування щонайменше одного маркера, як описано в цьому документі, або послідовності, обраної з SEQ ID No: 1-10, або набору праймерів, як описано в цьому документі, для відбору рослини *B. parus*, яка має стійкість до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибкового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*).

Відповідно, спосіб може містити відбір рослини *B. parus*, яка має маркер, асоційований зі стійкістю до Phoma stem canker (як-от грибковий патоген (патогени) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*), як описано в цьому документі.

В одному аспекті, цей винахід стосується застосування щонайменше одного маркера, як описано в цьому документі, або щонайменше однієї послідовності, обраної з SEQ ID No: 1-10, або набору праймерів, згідно з цим документом, для відбору рослини *B. parus*, яка має стійкість до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибкового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*).

Відповідно, застосування може являти собою застосування щонайменше двох, щонайменше трьох, щонайменше чотирьох, щонайменше п'яти, щонайменше шести, щонайменше семи, щонайменше восьми, щонайменше дев'яти або десяти маркерів, як описано в цьому документі (як-от маркери SEQ ID No: 1-10), для відбору рослини *B. parus*, яка має стійкість до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибкового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*).

В одному аспекті, застосування згідно з цим винаходом являє собою застосування щонайменше га74601s01 або SEQ ID No: 5.

В одному аспекті, застосування згідно з цим винаходом являє собою застосування щонайменше га74589s02 або SEQ ID No: 6.

В одному аспекті, застосування згідно з цим винаходом являє собою застосування щонайменше га74601s01 або SEQ ID No: 5 та га74589s02 або SEQ ID No: 6.

Цей винахід також пропонує застосування рослини, обраної способом згідно з цим винаходом, для отримання олії з олійного ріпаку або макухи з олійного ріпаку.

В одному аспекті, спосіб отримання олії з олійного ріпаку або макухи з олійного ріпаку містить виявлення у вказаній рослині *B. parus* або її частини (як-от тканина або насіння) присутність або відсутність щонайменше

одного маркера, як описано в цьому документі (наприклад, який міститься на хромосомному інтервалі між SEQ ID No: 1 та SEQ ID No: 10).

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити вилучення ДНК з рослинної тканини та проведення аналізу зазначеної ДНК на присутність або відсутність щонайменше одного маркера, як визначено в цьому документі.

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити вирощування рослини або рослин, ідентифікованих як такі, що мають маркер, асоційований зі стійкістю до Phoma stem canker (як-от стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*).

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити переробку насіння ріпаку для отримання олії.

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити виробництво ріпакового борошна.

Вважається, що ерукова кислота та глюкозинолати можуть бути небажаними в кормах для тварин. Наприклад, державне регулювання обмежує вміст у олії каноли ерукової кислоти максимум до 2 % за масою у США та 5 % у ЄС.

Як описано в цьому документі, рослини, відібрані способами згідно з цим винаходом, можуть містити нижчі рівні ерукової кислоти і нижчі рівні глюкозинолатів порівнянно з іншими рослинами *B. napus*, що мають стійкість до грибового патогену (патогенів) *L. maculans* і/або *L. biglobosa*, як-от дикорослі рослини *Brassica*. Отже, рослини *B. napus*, отримані способами згідно з цим винаходом, можуть мати більш високу поживну цінність, ніж пресовані макухи з олійного ріпаку для корму тварин.

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити одержання рослини, яка після подрібнення насіння дає масло, що містить менше 5 % (наприклад, менше 4 %, наприклад, менше 3 %, наприклад, менше 2 %, наприклад, менше 1 %) ерукової кислоти від загальної кількості жирних кислот у маслі.

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити одержання рослини, яка після подрібнення насіння дає масло, що містить менше 5 % (наприклад, менше 4 %, наприклад, менше 3 %, наприклад, менше 2 %, наприклад, менше 1 %) ерукової кислоти від загальної кількості жирних кислот у маслі.

Відповідно, спосіб або застосування згідно з цим винаходом може містити одержання рослини, в якій вміст аліфатичних глюкозинолатів у сухому, знежиреному макуховому борошні знаходиться на рівні менше 30 мкмоль/г.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Розробка інтрогресійної лінії елітного селекційного матеріалу, що несе стійкий алель/гаплотип локусу стійкості до чорної ніжки *LepR1* та набір діагностичних маркерів для відбору стійкого алеля/гаплотипу

Раніше була описана моногенна стійкість локусу *LepR1* до чорної ніжки. Була створена приблизна генетична карта, що складається з 4 SSR на основі хромосоми A02 (див. Фігуру 1). Розмір області-мішені *LepR1* на той момент, згідно з загальнодоступним геномним довідником *Darmog* в.4.1, становив приблизно 6,5 Мб.

Автори цього винаходу прагнули розробити інтрогресійну лінію елітного селекційного матеріалу, що несе стійкий алель/гаплотип локусу стійкості до чорної ніжки *LepR1* та набір діагностичних маркерів для відбору стійкого алеля/гаплотипу.

BC2S1 (покоління 2 зворотного схрещування, перше самозапилення) (09T11R1-13) було основою для програми зворотного схрещування, під час якої ген стійкості до чорної ніжки інтегрувався в елітний матеріал для зимового відновлення, намагаючись мінімізувати зчеплений вантаж ярого джерела на хромосомі A02.

20 отриманого насіння 09T11R1-13, все ще сегрегуючих за ознакою стійкості, були на першому етапі самозапилені в теплиці для розмноження матеріалу. Отримане насіння перевіряли у випробуванні сім'ядолів на стійкість до чорної ніжки із застосуванням ізоляту T12aD34, типового польового ізоляту німецької чорної ніжки. Для проведення випробування окремі рослини інокулювали на двох сім'ядолях двома краплями (по одній на кожну половину сім'ядолі) інокулята раси T12aD34. Приблизно за 10 днів симптоми були оцінені за шкалою 1-6 (1-3 = стійкі, 4-6 = чутливі).

У цьому випробуванні на стійкість потомство одного індивіда могло бути повністю стійким (самозапилена рослина, гомозиготна по *LepR1*), повністю чутливим (самозапилена рослина, яка не несе *LepR1*) або сегрегуючим у плані стійкості (самозапилена рослина, гетерозиготна по *LepR1*). Рослини, що мають бал стійкості 1 (цілком стійкі, без симптомів захворювання), були відібрані та схрещені з елітними відновними лініями KWS.

Унаслідок BC0 всі рослини могли бути гетерозиготними (рослина-донор, гомозиготна по *LepR1*) або сегрегуючими на гетерозиготні, і не несуть (рослина-донор, гетерозиготна по *LepR1*) рослини.

Через те, що стійкість *LepR1* є домінуючою, рослина, яка виявляє стійкість, може бути гомозиготою або гетерозиготою, що несе ген стійкості. Якщо BC0 буде згенерований просто випадково у рослини, отриманої унаслідок цього випробування, наступне покоління може бути повністю гетерозиготним (відібрана рослина = гомозигота за *LepR1*) або сегрегуючим (відібрана рослина = гетерозигота).

Тому рослинний матеріал був повторно випробуваний у випробуванні на сім'ядолі, та стійкі гетерозиготні рослини були відібрані для отримання BC1 (покоління 1 зворотного схрещування). Випробування на сім'ядолі з BC2 по BC4 (покоління 2 та 4 зворотного схрещування) повторювали, відбираючи стійкі гетерозиготні рослини. Після BC4 матеріал надійшов у програму прямої селекції для виведення DH (подвійних гаплотипів) ліній та випробування їхніх характеристик в інтенсивних випробуваннях GCA- (загальна здатність до комбінування) та випробуваннях SCA- (спеціальна здатність до комбінування).

У BC2S1 (у 2012 році) був здійснений перший підхід внутрішнього генетичного картування, що підтверджує локус стійкості A02. У наступні роки подальші генетичні аналізи та QTL- картування в різних поколіннях BC-/BCS-/DH (DH= подвійний гаплотип), виконані авторами винаходу, скоротили область-мішень до 90 т.п.о. на ґрунті фізичного картування маркерів в еталонному геномі *Darmog* в.4.1 (див. Фігуру 2).

Ця область-мішень у цей час включає 21 ген в еталоні *Darmog*. Зменшення розміру мішені було засноване на покращенні щільності маркерів на карті та на скринінгу на наявність рекомбінантів. У перші два роки було

розміщено кілька нових виробників SSR, а потім маркери, обрані із загальнодоступного i60k, Illumina CHIP, перетворили RD-LS-MS на маркери KASPAR.

Останні розробки маркерів почалися на ґрунті даних повторного секвенування Illumina Xten лінії DH, що несе область-мішень LepR1. На сьогодні спільний набір із 115 маркерів KASPAR та 33 маркерів XT-CHIP (28 перекриваються) застосовується для аналізу області-мішені, включаючи фланкуючі області (4 Мб, 1620 млн п.о. на фізичній карті Darnog v.4.1). За допомогою двох маркерів (ra74589s02 та ra74601s01) автори цього винаходу ідентифікували діагностичний гаплотип, що охоплює область розміром приблизно 110 т.п.о.

Приклад 2 - Лінії LepR1 демонструють бали покращеної стійкості порівняно з чутливими лініями та лініями, що несуть лише кількісну стійкість.

Щоб показати цінність нового локусу стійкості для селекції олійного ріпаку, були проаналізовані різні польові випробування. Підмножина ліній DH з наступною стійкістю: LepR1, LepR2 та Rlm3 була випробувана у польових випробуваннях O18-RA W/PH1 з балом PG2.

Для підрахунку балів приблизно 20 рослин кожного генотипу були зрізані біля кореня, і відсоток зараженої кореневої тканини оцінювали за допомогою балів від 1 до 9 як основу для індексу захворювання PG2. Стислий виклад результатів наведений нижче в Таблиці 2, яка демонструє явне поліпшення бала PG2 у LepR1, що несуть лінії DH, порівняно з чутливими лініями, як-от Capitol.

Таблиця 2:

бали PG2 у випробуванні O18 RAW/PH1

Генотип	Кількість ліній	Середній бал PG2
Capitol	3	2,76
Express	3	0,98
Exquisite	3	0,88
Rlm3, що несе лінію DH	127	0,89
LepR2, що несе лінію DH	47	0,52
LepR1, що несе лінію DH	86	0,51

Крім того, лінії DH, що несуть різні гени моногенної стійкості, випробовували протягом трьох років на стійкість до *L. maculans* та *L. biglobosa* (див. Фігуру 3А і Фігуру 3В).

LepR1 демонструє кращі бали стійкості до обох патогенів порівняно з чутливими лініями та лініями, що несуть лише кількісну стійкість. Рівень захворювання в лініях LepR1 також є відносно низьким порівняно з лініями Rlm7 (частково порушеними) або Rlm3.

Застосовуючи внутрішній підхід "Фіксований ефект" у геномному прогнозуванні, можна оцінити ефект моногенної стійкості порівняно з кількісною стійкістю. Для фіксованих ефектів зазвичай потрібно, щоб маркер був якнайближче зчеплений з ознакою. Це було виконано для селекційного матеріалу у 2018 році. Була застосована ознака PMR, де стійкість до чорної ніжки є одним з основних компонентів. PMR здебільшого зумовлений хворобами, а на європейських полях основною причиною є чорна ніжка. Тому очікувалося, що нижчі значення PMR будуть корелювати з LepR1.

Відрізок PMR в програмі селекції склав 5,8. Лінії DH, що несуть стійкість LepR1, демонструють зниження балу на 0,68. Отже, лінії, що включають стійкість LepR1, можна застосовувати як сорти, стійкі до чорної ніжки, і застосовувати в комерційних цілях як сільськогосподарські лінії.

Для порівняння, лінії Rlm7 знижують відрізок всього на 0,2, демонструючи, що стійкість більше не є сильною, оскільки в Європі спостерігається перший збиток. Подальші випробування, проведені у 2019 році, дали аналогічні результати.

Усі публікації, згадані у наведеному вище описі, включені в цей документ як посилання. Фахівцям у цій галузі техніки будуть очевидні різні модифікації та варіації описаних способів і систем винаходу, що не укладаються в межі обсягу та сутності винаходу. Хоча цей винахід був описаний з огляду на конкретні варіанти здійснення, слід розуміти, що заявлений винахід не повинен зайво обмежуватися такими конкретними варіантами здійснення. Безсумнівно, передбачається, що різні модифікації описаних способів здійснення цього винаходу, очевидні для фахівців в галузі молекулярної біології, клітинної імунології або в суміжних областях, входять в обсяг наступної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> КВС СААТ СЕ ЕНД Ко. КГаА

<120> СПОСІБ ВІДБОРУ АБО ІДЕНТИФІКАЦІЇ РОСЛИНИ BRASSICA NAPUS, ЯКА МАЄ
СТІЙКІСТЬ ДО ГРИБКОВОГО ПАТОГЕНУ

<130> KWS0369PCT

<150> EP 20204175.2

<151> 2020-10-27

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra24982s01

<400> 1

cgtaccgatt gagactgaaa catccttata tgcattccgag tgtccattct yaggcctcaa 60

agataagcac tgaccaaaata ctctcttgaa agcttaactc t 101

<210> 2

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra74607s01

<400> 2

ttggtgttac taattttttkc tgagcagtcg gtaattagtc gctaataagt yggccatttt 60

tctataaaat ctaagcgata tcttccatac atttctgctc a 101

<210> 3

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra74625s01

<400> 3

tatttttgtg gaatcttccc taaaagaatt acagtgtaaa ttgttagtat satcaataca 60

ttggatatatt tgatwtaatc aaaaacacta ggtgataacc c 101

<210> 4
<211> 101
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> маркер ra74605s01

<400> 4
tcyacattts ggcaagacta tccacctgaa tgtttttagag agcttgcttt ygaagtggta 60
actwaccata ctcttttttag tcttaatktt ttgggttggt g 101

<210> 5
<211> 101
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> маркер ra74601s01

<400> 5
tggctctccat tgacgtaagg agatcaagaa aaagctatga gtctaaattg yctatcatgt 60
caagctcttt cacgaaccga ttcaaacaaa gaatttgatc t 101

<210> 6
<211> 101
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> маркер ra74589s02

<400> 6
gtagagatat gtggccttca aagtgtcact caatttctgg ccattgatga ytaaaacaag 60
taaacaactt catagttttc ttatgccagt tttatgatat g 101

<210> 7
<211> 101
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> маркер ra74593s01

<400> 7
aacgaaaaca maattttata gaggtagaaa atgaaatcac ttatggagag ycaatagtaa 60

acagatcgag atcaaaaaac ctaatcccct ttcgtcatta t 101

<210> 8

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra25028s01

<400> 8

tttgtttcat atatcttcta ttsatatatg atgtggtaca catatagact kaatgttacc 60

tttgatttta atgagttcaa tctccaaggc aagtagtaat c 101

<210> 9

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra25042s01

<400> 9

taattccatt tgtctcgtgt gtttctatty ggacacraat gtgtattacc rctaaccata 60

tactcagtac tcaaaatccg ttcattgaatt tcttcacata c 101

<210> 10

<211> 101

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> маркер ra25063s01

<400> 10

tttgagatga agatatgggt tacaagtaag attaatccaa caacggtatc ktggagcaag 60

tttttagaag tggatatgag accattcatt actggttgta a 101

<210> 11

<211> 45

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер для виявлення алеля X ra24982s01

<400> 11

gaaggtgacc aagttcatgc tatatgcatc cgagtgtcca ttctc	45
<210> 12	
<211> 45	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> праймер для виявлення алеля Y ra24982s01	
<400> 12	
gaaggtcgga gtcaacggat tatatgcatc cgagtgtcca ttctt	45
<210> 13	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra24982s01	
<400> 13	
agaggagtat ttggtcagtg cttatcttt	29
<210> 14	
<211> 48	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> праймер для виявлення алеля X ra74607s01	
<400> 14	
gaaggtgacc aagttcatgc tcgcttagat tttatagaaa aatggccg	48
<210> 15	
<211> 50	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> праймер для виявлення алеля Y ra74607s01	
<400> 15	
gaaggtcgga gtcaacggat tatcgcttag attttataga aaaatggcca	50
<210> 16	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74607s01

<400> 16
 ctgagcagtc ggtaattagt cgcta 25

<210> 17
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra74625s01

<400> 17
 gaaggtgacc aagttcatgc taaaagaatt acagtgtaaa ttgttagtat c 51

<210> 18
 <211> 53
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля Y ra74625s01

<400> 18
 gaaggtcgga gtcaacggat tctaaaagaa ttacagtgtgta aattttagt atg 53

<210> 19
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74625s01

<400> 19
 ygcgcgggtt atcacctagt gttt 24

<210> 20
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra74605s01

<400> 20
 gaaggtgacc aagttcatgc tgaatgtttt agagagcttg ctttc 45

<210> 21
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля Y ra74605s01

<400> 21
 gaaggtcgga gtcaacggat tcctgaatgt ttagagagc ttgctttt 48

<210> 22
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74605s01

<400> 22
 gactaaaagg agtatggtwa gttaccactt 30

<210> 23
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra74601s01

<400> 23
 gaaggtgacc aagttcatgc tatcaagaaa aagctatgag tctaaattgc 50

<210> 24
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля Y ra74601s01

<400> 24
 gaaggtcgga gtcaacggat tgatcaagaa aaagctatga gtctaaattg t 51

<210> 25
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74601s01

 <400> 25
 cggttcgtga aagagcttga catgat 26

 <210> 26
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra74589s02

 <400> 26
 gaaggtgacc aagttcatgc tcaactcaatt tctggccatt gatgac 46

 <210> 27
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер для виявлення алеля Y ra74589s02

 <400> 27
 gaaggtcgga gtcaacggat tcaactcaatt tctggccatt gatgat 46

 <210> 28
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74589s02

 <400> 28
 cgcgtcttca taccataaaa ctggcataa 29

 <210> 29
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra74593s01

 <400> 29
 gaaggtgacc aagttcatgc tgtagaaaat gaaatcactt atggagagc 49

<210> 30
<211> 50
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер для виявлення алеля Y ra74593s01

<400> 30
gaaggtcgga gtcaacggat tggtagaaaa tgaaatcact tatggagagt 50

<210> 31
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74593s01

<400> 31
gggattaggt tttttgatct cgatctgtt 29

<210> 32
<211> 49
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер для виявлення алеля X ra25028s01

<400> 32
gaaggtgacc aagttcatgc tatatatgat gtggtacaca tatagactg 49

<210> 33
<211> 49
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер для виявлення алеля Y ra25028s01

<400> 33
gaaggtcgga gtcaacggat tatatatgat gtggtacaca tatagactt 49

<210> 34
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25028s01

<400> 34
 ctacttgccct tggagattga actcattaa 29

<210> 35
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra25042s01

<400> 35
 gaaggtgacc aagttcatgc tggattttga gtactgagta tatggtagt 50

<210> 36
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля Y ra25042s01

<400> 36
 gaaggtcgga gtcaacggat tttagtact gagtatatgg ttagc 45

<210> 37
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25042s01

<400> 37
 gctaattcca ttgtctcgt gtgtttcta 29

<210> 38
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер для виявлення алеля X ra25063s01

<400> 38
 gaaggtgacc aagttcatgc tagtaagatt aatccaacaа cggtatcg 48

<210> 39
<211> 50
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

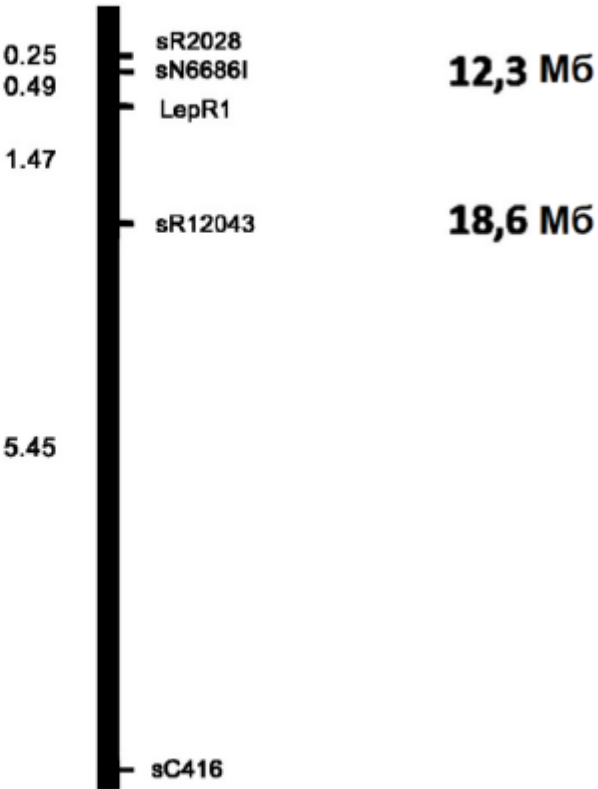
<220>
<223> праймер для виявлення алеля Y ra25063s01

<400> 39
gaaggtcgga gtcaacggat tcaagtaaga ttaatccaac aacggtatct 50

<210> 40
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra25063s01

<400> 40
accagtaatg aatggtctca tatccactt 29



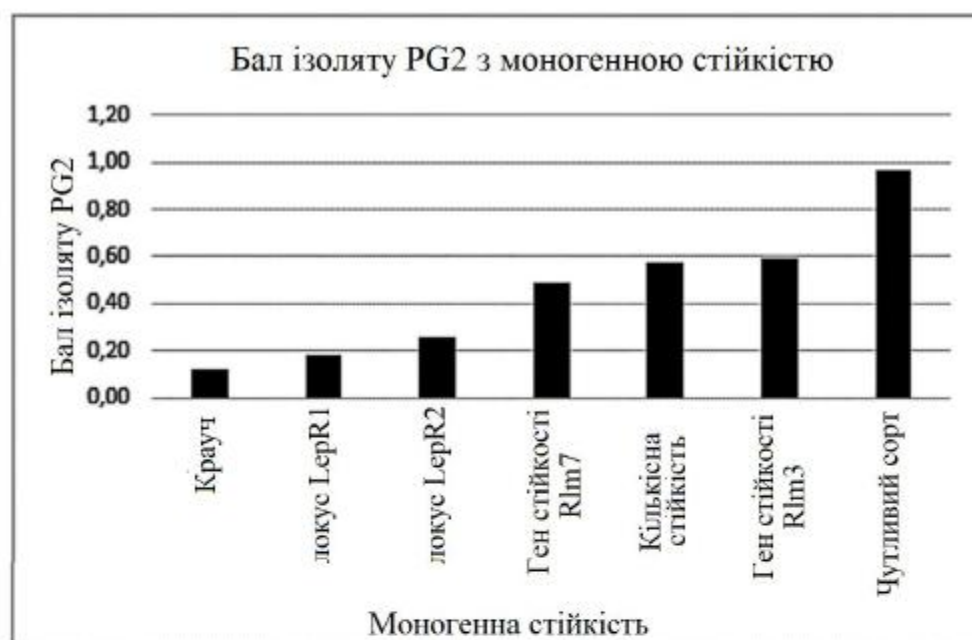
Фіг. 1

			Darmor (п.о.)														
	PRPLTNR	Бал	Тип	ra74605s01	ra74620s01	ra74618s01	ra74603s01	ra74601s01	ra74614s01	ra74599s01	ra74589s02	ra74586s01	ra74586s02	ra74585s01	ra74584s01	ra74584s02	
	RA18605_00002	1	RES	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	
	RA18605_00041	1	RES	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
	RA18605_00075	1	RES	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	
	RA18605_00079	1	RES	B	B	B	B	H	H	H	H	H	B	B	B	B	
	RA18605_00080	1	RES	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	
	RA18605_00089	1	RES	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	
	RA18605_00001	4	SUS	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
	RA18605_00018	4	SUS	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	
	RA18605_00030	4	SUS	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	

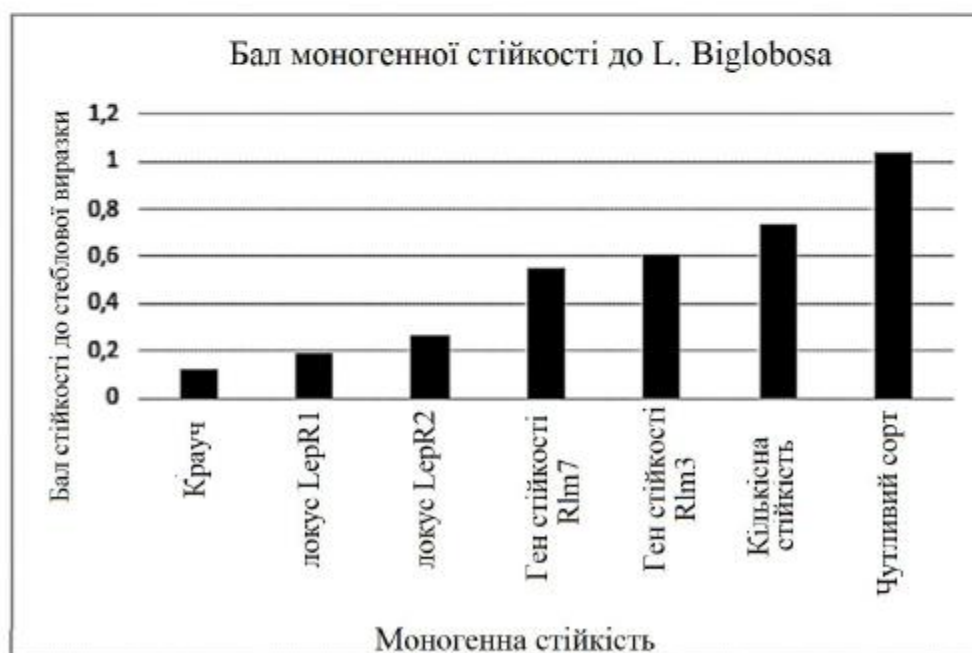
Фігура 2: Тонке картування області-мішені A02 для LepR1 з точністю до 90000 п.о.

Фіг. 2

А.



Б.



Фіг. 3

SEQ ID No: 1: являє собою нуклеотидну послідовність маркера га24982s01:

CGTACCGATTGAGACTGAAACATCCTTATATGCATCCGAGTGTCCATTCT [C/T] AGGCCTCAAAGAT
AAGCACTGACCAAATACTCCTCTGAAAGCTTAACCTCT

Фіг. 4

SEQ ID No: 2: являє собою нуклеотидну послідовність маркера га74607s01:

TTGGTGTTASTAATTTTTKCTGAGCAGTCGGTAATTAGTCGCTAATAAGT [C/T] GGCCATTTTTCTA
TAAATCTAAGCGATATCTTCCATACATTTCTGTCTCA

Фіг. 5

SEQ ID No: 3: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra74625s01:

TATTTTTGTGGAATCTTCCCTAAAAGAATTACAGTGTAATTTGTAGTAT [C/G] ATCAATACATTGG
ATATTTTGTATWTAATCAAAAACACTAGGTGATAACCC

Fig. 6

SEQ ID No: 4: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra74605s01:

TCYACATTTSGGCAAGACTATCCACCTGAATGTTTTAGAGAGCCTTGCTTT [C/T] GAAGTGGTAACTW
ACCATACTCCTTTTAGTCTTAATKTTTTGGGTTGGTG

Fig. 7

SEQ ID No: 5: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra74601s01:

TGGTCTCCATTGACGTAAGGAGATCAAGAAAAAGCTATGAGTCTAAATTG [C/T] CTATCATGTCAAG
CTCTTTCACGAACCGATTCAAACAAAGAATTTGATCT

Fig. 8

SEQ ID No: 6: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra74589s02:

GTAGAGATATGTGGCCTTCAAAGTGTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGA [C/T] TAAAACAAGTAAA
CAACTTCATAGTTTTCTTATGCCAGTTTTATGATATG

Fig. 9

SEQ ID No: 7: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra74593s01:

AACGAAAACAMAATTTTATAGAGGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAG [C/T] CAATAGTAAACAG
ATCGAGATCAAAAACCTAATCCCCTTTCGTCAATTAT

Fig. 10

SEQ ID No: 8: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra25028s01:

TTTGTTCATATATCTTCTATTSATATATGATGTGGTACACATATAGACT [G/T] AATGTTACCTTTG
ATTTTAATGAGTTC AATCTCCAAGGCAAGTAGTAATC

Fig. 11

SEQ ID No: 9: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra25042s01:

TAATTCCATTTGTCTCGTGTGTTTCTATTYGGACACRAATGTGTATTACC [A/G] CTAACCATATACT
CAGTACTCAAAATCCGTTTCATGAATTTCTTCACATAC

Fig. 12

SEQ ID No: 10: являє собою нуклеотидну послідовність маркера ra25063s01:

TTTGAGATGAAGATATGGGTTACAAGTAAGATTAATCCAACAACGGTATC [G/T] TGGAGCAAGTTTT
TAGAAGTGGATATGAGACCATTCTTACTGGTTGTAA

Fig. 13

SEQ ID No: 11: являє собою праймер для виявлення алеля X ra24982s01:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATGCATCCGAGTGTCCATTCTC

Fig. 14

SEQ ID No: 12: являє собою праймер для виявлення алеля Y ra24982s01:

GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATATGCATCCGAGTGTCCATTCTT

Fig. 15

SEQ ID No: 13: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra24982s01:
AGAGGAGTATTTGGTCAGTCGCTTATCTTT

Fig. 16

SEQ ID No: 14: являє собою праймер для виявлення алеля X ra74607s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGCTTAGATTTTATAGAAAAATGGCCG

Fig. 17

SEQ ID No: 15: являє собою праймер для виявлення алеля Y ra74607s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCGCTTAGATTTTATAGAAAAATGGCCA

Fig. 18

SEQ ID No: 16: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74607s01:
CTGAGCAGTCGGTAATTAGTCGCTA

Fig. 19

SEQ ID No: 17: являє собою праймер для виявлення алеля X ra74625s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAGAATTACAGTGTAATTTGTAGTATC

Fig. 20

SEQ ID No: 18: являє собою праймер для виявлення алеля Y ra74625s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTAAAAGAATTACAGTGTAATTTGTAGTATG

Fig. 21

SEQ ID No: 19: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74625s01:
YGC GCGGGTTATCACCTAGTGTTT

Fig. 22

SEQ ID No: 20: являє собою праймер для виявлення алеля X ra74605s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATGTTTTAGAGAGCTTGCTTTC

Fig. 23

SEQ ID No: 21: являє собою праймер для виявлення алеля Y ra74605s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGAATGTTTTAGAGAGCTTGCTTTT

Fig. 24

SEQ ID No: 22: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності ra74605s01:
GACTAAAAGGAGTATGGTWAGTTACCACTT

Fig. 25

SEQ ID No: 23: являє собою праймер для виявлення алеля X ra74601s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCAAGAAAAAGCTATGAGTCTAAATTGC

Fig. 26

SEQ ID No: 24: являє собою праймер для виявлення алеля Y га74601s01:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATCAAGAAAAAGCTATGAGTCTAAATTGT

Fig. 27

SEQ ID No: 25: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га74601s01:

CGGTTCGTGAAAGAGCTTGACATGAT

Fig. 28

SEQ ID No: 26: являє собою праймер для виявлення алеля X га74589s02:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGAC

Fig. 29

SEQ ID No: 27: являє собою праймер для виявлення алеля Y га74589s02:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGAT

Fig. 30

SEQ ID No: 28: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га74589s02:

CGCGTCTTCATATCATAAACTGGCATAA

Fig. 31

SEQ ID No: 29: являє собою праймер для виявлення алеля X га74593s01:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAGC

Fig. 32

SEQ ID No: 30: являє собою праймер для виявлення алеля Y га74593s01:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAGT

Fig. 33

SEQ ID No: 31: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га74593s01:

GGGATTAGGTTTTTTTGATCTCGATCTGTT

Fig. 34

SEQ ID No: 32: являє собою праймер для виявлення алеля X га25028s01:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATATGATGTGGTACACATATAGACTG

Fig. 35

SEQ ID No: 33: являє собою праймер для виявлення алеля Y га25028s01:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATATATGATGTGGTACACATATAGACTT

Fig. 36

SEQ ID No: 34: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га25028s01:

CTACTTGCCTTGGAGATTGAACTCATTA

Fig. 37

SEQ ID No: 35: являє собою праймер для виявлення алеля X га25042s01:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATTTTGAGTACTGAGTATATGGTTAGT

Fig. 38

SEQ ID No: 36: являє собою праймер для виявлення алеля Y га25042s01:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGAGTACTGAGTATATGGTTAGC

Fig. 39

SEQ ID No: 37: являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га25042s01:

GCTAATTCATTTGTCTCGTGTGTTTCTA

Fig. 40

SEQ ID No: 38: являє собою праймер для виявлення алеля X га25063s01:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTAAGATTAATCCAACAACGGTATCG

Fig. 41

SEQ ID No: 39: являє собою праймер для виявлення алеля Y га25063s01:

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAGTAAGATTAATCCAACAACGGTATCT

Fig. 42

SEQ ID No: 40 являє собою спільний праймер для виявлення присутності або відсутності га25063s01:

ACCAGTAATGAATGGTCTCATATCCACTT

Fig. 43