

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192253** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.01.19

(22) Дата подачи заявки
2020.02.14

(51) Int. Cl. *A01H 1/02* (2018.01)
A01H 1/04 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(54) **РАСТЕНИЯ BRASSICA, ОБЛАДАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К КИЛЕ
КРЕСТОЦВЕТНЫХ**

(31) **19157382.3**

(32) **2019.02.15**

(33) **EP**

(86) **PCT/US2020/018249**

(87) **WO 2020/168166 2020.08.20**

(88) **2020.10.08**

(71) Заявитель:

**БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Нгуйен Тхи Нинх Тхуан (BE), Чонго
Годфрей (CA), Девламинк Яспер,
Вагнер Геоффрей (BE)**

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям Brassica, растительному материалу и семенам с низким содержанием эруковой кислоты, обладающим устойчивостью к киле, отличающимся тем, что эти продукты содержат в своем геноме специфический локус устойчивости к киле CrS. Кроме того, настоящее изобретение относится к средствам, обеспечивающим возможность обнаружения локуса устойчивости к киле CrS.

A1

202192253

202192253

A1

РАСТЕНИЯ BRASSICA, ОБЛАДАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К КИЛЕ КРЕСТОЦВЕТНЫХ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области борьбы с заболеваниями растений *Brassica*. Настоящим изобретением предоставляются растения *Brassica*, содержащие в своем геноме ген устойчивости к киле крестоцветных, в частности, к растениям *Brassica* с низкими уровнями эруковой кислоты. Также предоставляются способы и средства получения таких растений, а также способы и средства детекции гена устойчивости к киле крестоцветных.

Предпосылки к созданию изобретения

Кила крестоцветных представляет собой заболевание, вызываемое патогеном *Plasmiodiophora brassicae*, которое поражает семейство растений Brassicaceae, в том числе многие важные овощные и другие сельскохозяйственные культуры. Представляется что все представители семейства Brassicaceae потенциально могут быть инфицированы *Plasmiodiophora brassicae* (Dixon, 2009, J Plant Growth Regul 28: 194). Восприимчивые культуры включают все сорта *B. oleracea*, западные виды капусты (брюссельская капуста, кочанная капуста, калабрез/зеленая брокколи, цветная капуста, кулинарная и кормовая кудрявая капуста, кольраби); *B. rapa* (син. *B. campestris*) включая репу, репу масличную, сарсон и огромное количество восточных разновидностей, которые включают листовые овощи и корнеплоды, такие как *Brassica rapa* var. *pekinensis* и *B. rapa* var. *chinensis* (пекинская капуста); *B. napus*, включая брюкву, масличный рапс и кормовой рапс; и семена, приправы (горчица) и овощные культуры, полученные из *B. carinata*, *B. nigra* и *B. juncea*. Также подвержены инфекции родственные рода растений, такие как редис (*Raphanus*), крестоцветные сорняки, например, *Sinapis*, и декоративные растения, включая левкой (*Matthiola*) и лакфиоль (*Cheiranthus cheiri*). Кроме того, инфицированы этим патогеном могут быть растения *Arabidopsis*, которые используют в качестве модели в научных исследованиях (Dixon, 2009, выше).

При развитии килы на корнях пораженных растений образуются булавовидные наросты. В результате этого инфицированные корни с трудом поглощают питательные вещества и воду. Симптомы, наблюдаемые на надземных частях растения, включают увядание, низкорослость, пожелтение и преждевременное старение (Hwang et al, 2012, Mol Plant Pathol 13: 105).

По оценкам, кила присутствует на 10% всех площадей выращивания растений-хозяев возбудителей этого заболевания (Diederichsen et al, 2009, J Plant Growth Regul 28: 265). В прошлом столетии кила была преимущественно заболеванием овощных культур. Однако в 2003 году в центральной части провинции Альберта было обнаружено 12 коммерческих полей рапса, зараженных киллой. После этого количество полей с подтвержденным заражением киллой неуклонно увеличивалось, и к 2019 году заражение *P. brassicae* было обнаружено более чем на 3353 полях (более 35000 га) в провинции Альберта, на 51 поле в провинции Саскачеван и на 35 полях в провинции Манитоба (Strelkov et al, 2019, Canadian Journal of Plant Pathology 41:sup1: 129). Согласно исследованиям сообщалось, что потери урожая рапса, выращенного на зараженных киллой полях в Квебеке, составили 80% - 91%. Качество семян также значительно снизилось: содержание масла снизилось на 4,7% - 6,1%, а абсолютная масса семян – на 13% - 26% (Hwang et al., 2012, выше).

Устойчивость растений – эффективное средство борьбы с киллой. Недавно появившиеся устойчивые сорта относятся к трем видам Brassica: *B. napus*, *B. oleracea* и *B. rapa* (Diederichsen et al., 2009, выше).

Были обнаружены сорта европейской кормовой репы (*B. rapa ssp. Rapifera*), такие как Gelria R, Siloga, Debra и Milan White, которые являются источниками устойчивости к киле и которые использовались для переноса генов устойчивости к киле в пекинскую капусту (Piao et al., 2009, J Plant Growth Regul 28: 252). Действительно, в *B. rapa* присутствуют много раса-специфичных, одиночных и доминантных генов *R* (рассматриваемых в Neik et al., 2017, Frontiers in Plant Science 8:1788). Гены *Crr2*, *CRc* и *Crr4* картируются на хромосомах A01, A02 и A06 соответственно. Несколько основных генов были идентифицированы на хромосоме A03: *CRA*, *Crr3*, *CRb*, *CRb^{Kato}* и *CRk*. Различные основные гены или QTL были

картированы на хромосоме A08: *PbBa8.1* из *ssp. rapifera* ECD04 (Chen et al 2013 PLoS ONE 8(12): e85307), *QS_B8.1* из Siloga' (Pang et al., (2014) Hort Environ Biotechnol 55:540-547), *Rcr9* из 'Pluto' (Yu et al, 2017, Scientific Reports 7:4516), *Crr1a* и *Crr1b* (Hatakeyama et al., 2013, PLOS one 8: e54745).

В *B. oleracea* редко выявляются образцы, обладающие полной устойчивостью. Представляется, что устойчивость к киле у *B. oleracea* наследуется полигенно. (Piao et al., 2009, выше). У *B. oleracea* были обнаружены, по меньшей мере, 22 QTL, что указывает на сложную генетическую основу устойчивости к киле у *B. oleracea*. Поскольку в различных исследованиях по картированию использовали разные источники устойчивости к киле и разные изоляты *P. brassicae*, сравнение этих QTL невозможно (Piao et al., 2009, выше).

Устойчивость к киле также наблюдалась у нескольких сортов *B. napus*. У *B. napus* были идентифицированы, по меньшей мере, 22 QTL устойчивости к киле. Основной ген, *Pb-Bn1*, был картирован в группе сцепления DY4, и по крайней мере два дополнительных QTL были обнаружены на хромосомах DY4 и DY15 соответственно. Кроме того, были обнаружены эпистатические взаимодействия между девятью областями с аддитивными эффектами или без них. В двойных гаплоидных популяциях был идентифицирован основной ген и два рецессивных гена, происходящие из ECD04. В ресинтезированных растениях *B. napus*, полученных путем скрещивания сорта Vöhmerwaldkohl (*B. oleracea*) и ECD-04 (*B. rapa*), были обнаружены девятнадцать и изолированы семь устойчивых QTL на восьми хромосомах, четыре из которых были тесно связаны друг с другом на хромосоме N03, а три были связаны на хромосоме N08. Гены *CRk* и *Crr3* расположены в аналогичной области *PbBn-k-2*, *PbBn-l-1* и *PbBn-01:60-1* на N03. *CRa* и *CRb* являются независимыми от них. *PbBn-01.07-2*, *PbBn-l-2* и *PbBn-a-1* связаны с *BRMS088* на хромосоме N08 в *B. napus*, а также связаны с *Crr1* на R8 в *B. rapa*. *PbBn-k-1* находится в хромосоме N02. QTL, расположенные на N03 и N19, обладают сильным эффектом и придают устойчивость широкого спектра действия. (Piao et al., 2009, выше; and Werner et al., 2008, Theor Appl Genet 116:363; Neik et al., 2017, Frontiers in Plant Science 8:1788).

К настоящему времени клонированы два гена устойчивости к киле: *CRa* и *Crr1a*. Было произведено более точное картирование гена *CRa Brassica rapa*, а ген TIR-NBS-LRR был идентифицирован как ген *CRa* (Ueno et al., 2012, Plant Mol Biol 80: 621). Было произведено картирование и выделение гена *Crr1a* из сорта Siloga европейской кормовой репы *B. rapa*. *Crr1a* также кодирует белок устойчивости к заболеванию TIR-NBS-LRR (Hatakeyama et al., 2013, выше и WO2012/039445).

Ген *CRb* из *B. rapa* при картировании был отнесен к геномной области 140 т. п. н. В этой области были предсказаны четырнадцать функциональных белков, среди которых белки семейства Rho и два белка TIR-NBS-LRR, которые могут быть генами-кандидатами для *CRb* (Kato et al., 2013, Breeding Science 63: 116). Этот ген *CRb*, для которого было произведено точное картирование, был переименован в ген *CRb^{Kato}*, поскольку его положение в геноме не совпадало с ранее картированным геном *CRb* (Zhang et al. 2014, Molecular Breeding 34: 1173).

Для увеличения продолжительности устойчивости сорта важным средством будет являться комбинация различных генов устойчивости к киле в одной линии для получения сортов с устойчивостью к более широкому спектру физиологических рас. Таким образом, чтобы иметь возможность связывать гены без переноса балластного генетического материала, сцепленного с целевым признаком, с использованием маркерной селекции и методов генетической инженерии, остается потребность в разработке молекулярных маркеров, связанных с генами устойчивости к киле. Настоящим изобретением предоставляется локус устойчивости к киле в соответствии с описанием в настоящем документе в различных вариантах осуществления, в разделе "Примеры" и в формуле изобретения.

Краткое изложение предпочтительных вариантов осуществления изобретения

В первом варианте осуществления изобретением предоставляется растение *Brassica*, содержащее <2% эруковой кислоты в масле семян и содержащее локус устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркер M4. В еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4

до M5. В еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M8, в то время как в еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M11. В еще одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению содержит маркерный аллель M4/R, в то время как еще в одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению содержит маркерные аллели M4/R и M5/R или содержит маркерные аллели M4/R, M5/R, M6/R и M7/R.

В еще одном варианте осуществления изобретения растение по настоящему изобретению не содержит маркерный аллель M3/R или M2/R, или M1/R или их комбинацию.

В еще одном варианте осуществления растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение *Brassica napus* или *Brassica rapa*, в то время как в еще одном варианте осуществления растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ОМР (озимого масличного рапса) (*Brassica napus*) или растение ЯМР (ярового масличного рапса) (*Brassica napus*).

В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ОМР (*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M7. В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ЯМР (*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M5, например, растение ЯМР (*Brassica napus*), содержащее маркерный интервал от маркера M4 до M8, например, растение ЯМР (*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент может быть получен из эталонных семян, депонированных в NCIMB под номером доступа NCIMB 43341.

В соответствии с еще одним аспектом растение *Brassica* по настоящему изобретению обладает устойчивостью к патотипам *P. brassicae* P2, P3, P5, P6 или P8 или к изоляту CR11.

В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению является гетерозиготным по указанному локусу устойчивости к киле, в то время как в еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению является гомозиготным по указанному локусу устойчивости к киле.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления предоставляется растение *Brassica* по настоящему изобретению, которое также содержит ген, придающий устойчивость к гербицидам. В еще одном варианте осуществления ген, придающий устойчивость к гербицидам, представляет собой ген, придающий устойчивость к глюфосинату или глюфосинату аммония, или ген, придающий устойчивость к глифосату.

Изобретением также предоставляются семена, полученные из растений по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы: (а) идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS, по меньшей мере, с одним маркером в пределах 10 сМ от маркерного интервала от M4 до M5, и (b) отбор растения, содержащего указанный локус устойчивости к киле CrS. В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения указанный способ включает идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R, в то время как в соответствии с другим вариантом осуществления указанное растение *Brassica* идентифицируется с помощью маркеров в маркерном интервале от M4 до M5.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы: (а) скрещивание первого растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS со вторым растением, и (b) идентификацию растения-потомка, содержащего, по меньшей мере, один маркер в пределах 10 сМ от маркерного интервала от M4 до M5. В соответствии с еще одним

вариантом осуществления изобретения указанный способ включает идентификацию растения-потомка, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R.

В еще одном варианте осуществления изобретения предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий введение локуса устойчивости к киле CrS в растение, не содержащее локус устойчивости к киле CrS, с использованием геномного редактирования.

Еще одна цель изобретения относится к применению, по меньшей мере, одного маркера в пределах 10 сМ маркерного интервала от M4 до M5 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS. Еще одна цель изобретения относится к применению маркеров M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 и/или M11 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS.

В соответствии с еще одним аспектом предоставляется способ защиты группы культурных растений по настоящему изобретению на поле, на котором осуществляют борьбу с сорняками путем внесения композиции, содержащей один или более гербицидно активных ингредиентов. В соответствии с еще одним аспектом указанные растения содержат ген, придающий устойчивость к глюфосинату или глюфосинату аммония, или ген, придающий устойчивость к глифосату, а гербицидом является глюфосинат или глюфосинат аммоний или глифосат.

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Картирование локуса устойчивости к киле.

Фигура 2. Оценка устойчивости для линий, гомозиготных по аллелю рекуррентного родителя (AA), гетерозиготных по аллелю рекуррентного родителя и аллеля донора (AB) и гомозиготных по аллелю донора (BB) пикового маркера.

Фигура 3. Схема возвратного скрещивания для интрогрессии устойчивости к киле CrS в линию восприимчивого ярового масличного рапса (растение ЯМР).

Фигура 4. Схема селекции для линии рапса качества канолы, обладающей устойчивостью к киле CrS. Интрогрессия в восприимчивый яровой масличный рапс (растение ЯМР).

Фигура 5. Маркерное возвратное скрещивание для интрогрессии устойчивости к киле CrS. RP = рекуррентный родитель. MAS: маркерная селекция.

Фигура 6. Схема интрогрессии устойчивости к киле CrS в восприимчивый озимый масличный рапс (ОМР).

Общие определения

При использовании по тексту настоящего документа термин "ген устойчивости к киле" означает последовательность ДНК, которая придает повышенную устойчивость растениям или связана с повышенной устойчивостью растений, например, растений семейства Brassicaceae, таких как растения *Brassica*, к *Plasmodiophora brassicae* по сравнению с растениями, которые не имеют генов устойчивости или имеют нефункциональные (или инактивированные) формы генов.

При использовании по тексту настоящего документа термин "кила" означает заболевание, вызванное патогеном *Plasmodiophora brassicae*.

При использовании по тексту настоящего документа термин "ген устойчивости к киле" означает устойчивость к одному или нескольким изолятам *Plasmodiophora brassicae*, например, помимо прочего, устойчивость к патотипам *Plasmodiophora brassicae* P2, P3, P5, P6 и/или P8 в соответствии с классификацией в Williams (1966) *Phytopathology*, 56, 624–626, и/или к изоляту CR11 и/или к изолятам 2B, 3A, 5X и 8P согласно системе CCD (Canadian Clubroot Differential set), см. публикацию Strelkov et al. 2018, *Can J Plant Pathology* стр. 284. Указанная устойчивость относится к уменьшению повреждений, вызванных инфицированием к килой, по сравнению с повреждениями у контрольных растений. Оценка степени повреждений может осуществляться, например, на основании образования булабовидных наростов на корнях, увядания, задержки роста, пожелтения, преждевременного старения и т.д. В частности, уменьшение повреждений может проявляться в уменьшении потерь урожая, когда растения выращивают на поле в условиях стресса, вызванного заболеванием, по сравнению с контрольными растениями. Такое уменьшение потерь

урожая может быть, например, связано со снижением или предотвращением инфицирования, размножения, распространения или выживаемости патогена у растений с повышенной устойчивостью. Упомянутая устойчивость может также относиться к растениям, которые являются полностью устойчивыми, то есть к растениям, на которых симптомы заболевания не наблюдаются.

Оценка устойчивости к киле может осуществляться с использованием шкалы от нуля до трех: ноль – поражение килей не наблюдается, один – килей поражено <25% корневой системы; два – килей поражено 25 - 50% корневой системы; три - килей поражено >50% корневой системы (Humpherson-Jones, 1989, Tests Agro Cult 10:36). Индекс заболевания (ID) может рассчитываться с использованием следующего уравнения:

$$\left[(\text{количество растений в классе 0} * 0) + ((\text{количество растений в классе 1} * 1) + (\text{количество растений в классе 2} * 2) + (\text{количество растений в классе 3} * 3)) \right] / \text{общее количество растений} * 3$$

(Strelkov et al., 2006, Can J Plant Pathol 28:467).

Очевидно, что на оценку устойчивости к киле могут влиять условия окружающей среды, например, условия конкретной локации, погодные условия и стресс, вызванный заболеванием, а также индивидуальное восприятие человека, оценивающего симптомы заболевания. Следовательно, необходимо минимизировать вариации этих факторов в сравнительных тестах. В соответствии с настоящим изобретением для сравнения растений по изобретению с контрольными растениями можно также применять любые другие способы оценки устойчивости, известные специалистам.

Термин "растение, обладающее устойчивостью к киле" означает растение, балл которого при оценке составляет 0 или 1 при естественном или искусственном заражении возбудителем килы. "Популяция, устойчивая к киле" означает популяцию с индексом болезни (ID) менее 30%. Термин "растение с повышенной устойчивостью к киле" означает растение, у которого поражение килей корневой системы уменьшено, по меньшей мере, на 5% или, по меньшей мере, на 10% или, по меньшей мере, на 15% или, по меньшей мере, на 20% или, по меньшей мере, на 30% или, по меньшей мере,

на 40% или, по меньшей мере, на 50% или, по меньшей мере, на 70% или, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 100% (т.е. поражение килой не наблюдается), или означает популяцию растений, в котором индекс заболевания уменьшен, по меньшей мере, на 3% или, по меньшей мере, на 5% или, по меньшей мере, на 8% или, по меньшей мере, на 10% или, по меньшей мере, на 15% или, по меньшей мере, на 20% или, по меньшей мере, на 30% или, по меньшей мере, на 40% или, по меньшей мере, на 50% или, по меньшей мере, на 70% или, по меньшей мере, на 95% или, по меньшей мере, на 100% (т.е. все растения относятся к классу 0 (поражение килой не наблюдается)).

При использовании по тексту настоящего документа термин "локус устойчивости к киле CrS" или "локус устойчивости CrS" или "локус CrS" означает локус, который придает устойчивость к патотипам *Plasmodiophora brassicae* P2, P3, P5, P6 и/или P8 в соответствии с классификацией в Williams (1966) *Phytopathology*, 56, 624–626, и/или к изоляту CR11. Термин "локус устойчивости к киле CrS" относится к положению на хромосоме. Это положение идентифицируется локацией на генетической карте хромосомы или локацией на физическом положении хромосомы, например, когда доступна последовательность генома.

При использовании по тексту настоящего документа термин "локус" (локусы) означает положение, которое ген занимает на хромосоме. Термин "локус устойчивости к киле" относится к положению на хромосоме, где находится ген устойчивости к киле. Это положение идентифицируется локацией на генетической карте хромосомы. В это определение входит фрагмент (или сегмент) геномной ДНК хромосомы, на которой расположен локус устойчивости к киле. Указанный локус устойчивости к киле может представлять собой локус устойчивости к киле CrS или другой локус устойчивости к киле. Локус, который не содержит ген устойчивости к киле CrS по изобретению, который находится в положении на хромосоме, соответствующем положению, в котором ген устойчивости к киле CrS находится в устойчивой линии, может именоваться "локус восприимчивости к киле CrS". При использовании по тексту настоящего документа термин "QTL" (локус количественного признака) относится к положению в геноме, которое соответствует измеряемому признаку или к характеристике, например, описанный в настоящем документе локус CrS.

При использовании по тексту настоящего документа термин "аллель(и)" гена означает любую одну или любые несколько альтернативных форм гена в определенном локусе. В диплоидной клетке организма, аллели определенного гена находятся в определенном месте или в локусе в хромосоме. Один аллель присутствует в каждой хромосоме пары гомологичных хромосом или может присутствовать в гомологичных хромосомах.

При использовании по тексту настоящего документа термин "гомологичные хромосомы" означает, что хромосомы содержат информацию для тех же биологических характеристик и содержат те же гены, в тех же местах, однако другие аллели таких генов. Гомологичные хромосомы – это хромосомы, которые образуют пары в ходе мейоза. Негомологичные хромосомы, которые представляют все биологические характеристики организма, образуют набор, количество таких наборов в клетке называется пloidностью. Диплоидные организмы содержат два набора негомологичных хромосом, где каждая гомологичная хромосома унаследована от другого родителя. В тетраплоидных видах присутствует два набора диплоидных геномов, при этом хромосомы двух геномов именуется гомологичными хромосомами (и, аналогичным образом, локусы или гены двух геномов именуется гомологичными локусами или генами). Аналогичным образом, тетраплоидные виды имеют два набора диплоидных геномов и т.д. Диплоидные, тетраплоидные или гексаплоидные виды растений могут включать в себя большое число различных аллелей в определенном локусе. Уровни пloidности видов *Brassica*: диплоидный (*Brassica rapa*, AA; *Brassica nigra* BB; *Brassica oleracea*, CC) и тетраплоидный (*Brassica juncea*, AABB; *Brassica napus*, AACC; *Brassica carinata*, BBCC).

При использовании по тексту настоящего документа термин "гетерозиготный" означает генетическое условие, когда два различных аллеля находятся в специфическом локусе, однако при этом они расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом клетке. С другой стороны, при использовании по тексту настоящего документа термин "гомозиготный" означает генетическое условие, когда два идентичных аллеля находятся в специфическом локусе, однако при этом они расположены индивидуально на соответствующих парах гомологичных хромосом клетке.

Аллель определенного гена или локуса может иметь определенную пенетрантность, т.е. он может быть доминантным, частично доминантным, кодоминантным, частично рецессивным или рецессивным. Доминантный аллель – это вариант определенного локуса или гена, который, когда он присутствует в организме в гетерозиготной форме, дает тот же фенотип, что и в случае, когда присутствует в гомозиготной форме. С другой стороны, рецессивный аллель представляет собой вариант аллеля, над которым в гетерозиготной форме доминирует доминантный аллель, в результате чего возникает фенотип, который придается доминантным аллелем, а рецессивный фенотип возникает только в гомозиготной форме. Термины "частично доминантный", "кодоминантный" или "частично рецессивный" относятся к ситуации, когда гетерозигота проявляет фенотип, который является промежуточным между фенотипом организма, гомозиготного по одному аллелю, и организма, гомозиготного по другому аллелю определенного локуса или гена. Такой промежуточный фенотип демонстрирует частичную или неполную доминантность или пенетрантность. Когда имеет место частичная доминантность, у потомства обычно наблюдается ряд фенотипов. Это же относится и к частично рецессивным аллелям.

При использовании по тексту настоящего документа термин "хромосомный интервал" означает непрерывный линейный участок геномной ДНК на одной хромосоме. Хромосомный интервал может быть определен с помощью генетической карты и на основании генетических положений маркеров. Хромосомный интервал также может определяться на основе физической структуры хромосомы, например, на основе геномной последовательности.

Термин "маркерный интервал" означает хромосомный интервал, который определяется маркерами. Маркерный интервал от первого до второго маркера представляет собой хромосомный интервал от указанного первого до указанного второго маркера, включая указанные маркеры. Маркерный интервал между первым и вторым маркером представляет собой хромосомный интервал между указанным первым и указанным вторым маркером. Маркерный интервал может быть определен с помощью генетической карты и на основании генетического положения маркеров.

Маркерный интервал также может определяться на основе физической структуры хромосомы, например, на основе геномной последовательности.

Положения идентифицированных хромосомных сегментов и их маркеров, когда они выражены как частоты рекомбинации или единицы картирования, предоставлены здесь в разделе с общей информацией. Описанные в настоящем документе варианты осуществления были получены с использованием определенных популяций *Brassica*. Соответственно, положение определенных сегментов и маркеров в качестве единиц картирования указывается со ссылкой на используемые популяции. Предполагается, что значения, указанные для определенных сегментов и маркеров в качестве единиц картирования, могут варьироваться в зависимости от сорта и не входят в основное определение сегментов ДНК и маркеров, которые (т.е. сегменты ДНК и маркеры) описываются иным образом, например, нуклеотидной последовательностью.

При использовании по тексту настоящего документа термин "генетическая карта" или "карта сцепления" представляет собой таблицу для вида или опытной популяции, в которой указаны положения его генетических маркеров относительно друг друга с точки зрения частоты рекомбинации. Карта сцепления – это карта, созданная на основании частот рекомбинации между маркерами во время кроссинговера гомологичных хромосом.

Термин "физическая карта" генома относится к абсолютным расстояниям (которые измерены, например, в парах оснований), например, к расстояниям в геномной последовательности. Положение маркеров на физической карте можно определить, например, путем сравнения последовательности маркеров с последовательностью генома с использованием средства поиска основного локального выравнивания BLAST.

При использовании по тексту настоящего документа термины "генетически связанный", "связанный", "связанный с" или "сцепление" относятся к измеряемой вероятности того, что гены или маркеры, расположенные на данной хромосоме, вместе передаются людям в следующем поколении. Таким образом, термин "связанный" может относиться к одному или нескольким генам или маркерам, которые передаются

вместе с другим геном с вероятностью более 0,5 (т.е. с вероятностью выше, чем в случае независимого набора генов/маркеров, когда маркеры/гены расположены на разных хромосомах). Поскольку близость двух генов или маркеров на хромосоме напрямую связана с вероятностью того, что гены или маркеры будут переданы вместе людям в следующем поколении; кроме того, термин "генетически связанный" в настоящем документе может также относиться к одному или нескольким генам или маркерам, которые расположены на одной и той же хромосоме на расстоянии друг от друга в пределах около 50 сантиморганов (сМ) или менее. Генетическое сцепление обычно выражается в сМ. Сантиморган – это единица рекомбинантной частоты для измерения генетического сцепления, определяемая как расстояние между генами или маркерами, для которого один продукт мейоза из 100 является рекомбинантным, или, другими словами, сантиморган равен 1% вероятности того, что маркер на одном генетическом локусе на хромосоме будет отделен от маркера во втором локусе из-за кроссинговера в одном поколении. Его часто используют для определения расстояния на хромосоме. Число пар оснований, которым соответствуют значение в сМ, широко варьируется по геному (разные участки хромосомы имеют разную склонность к кроссинговеру) и в зависимости от вида (то есть в зависимости от общего размера генома). Таким образом, в этом отношении термин "связанный" может означать нахождение на расстоянии около 50 сМ или меньше, например, около 40 сМ, около 30 сМ, около 20 сМ, около 10 сМ, около 7,5 сМ, около 6 сМ, около 5 сМ, около 4 сМ, около 3 сМ, около 2,5 сМ, около 2 сМ или меньше. Конкретные примеры маркеров, связанных с локусом устойчивости к киле CrS, указаны в Таблице 8.

Термин "перед" определенным положением в эталонной геномной последовательности относится к направлению 5'. В отношении эталонной геномной последовательности термин "против хода транскрипции" относится к положению с номером меньше номера указанного положения. "Перед" определенным положением в геноме означает "по направлению к меньшему номеру" на генетической карте.

Термин "после" определенного положения в эталонной геномной последовательности относится к направлению 3'. В отношении эталонной геномной последовательности термин "против хода транскрипции" относится к положению с

номером больше номера указанного положения. "После" определенного положения в геноме означает "по направлению к большему номеру" на генетической карте.

Термин "слева" или "с левой стороны" от определенного положения на генетической карте означает "по направлению к меньшему номеру" на генетической карте (в сМ). Например, "левый фланкирующий маркер" означает маркер в интервале QTL с наименьшим номером в положении популяции. "Левая сторона" маркера – положение на генетической карте с меньшим номером (в сМ).

Термин "справа" или "с правой стороны" от определенного положения на генетической карте означает "по направлению к большему номеру" на генетической карте (в сМ). Например, "правый фланкирующий маркер" означает маркер в интервале QTL с наибольшим номером в положении популяции. "Правая сторона" маркера – положение на генетической карте с большим номером (в сМ).

Термин "возвратное скрещивание" относится к методу селекции, с помощью которого может осуществляться перенос (одного) признака, например, устойчивости к киле, из одного генетического окружения (из "донора") в другое генетическое окружение (т.е. в генетическое окружение "рекуррентного родителя"), например, в растение, не содержащее такого гена или локуса CrS. Потомство от скрещивания (например, растение F₁, полученное путем скрещивания растения, содержащего локус CrS, с растением, не содержащим CrS, или растение F₂, или растение F₃ и т.д., полученное в результате самоопыления F₁), "скрещивается" с родителем ("рекуррентным родителем"). После повторного возвратного скрещивания (BC₁, BC₂ и т.д.) и, при необходимости, самоопыления (BC₁F₁, BC₂F₁ и т.д.) признак из одного генетического окружения встраивается в другое генетическое окружение.

"Маркерная селекция" или "MAS" представляет собой процесс, когда присутствующие молекулярные маркеры, которые генетически связаны с конкретным локусом или с определенной областью хромосомы (например, с фрагментом интрогрессии), используются для селекции растений на наличие конкретного локуса или участка (фрагмента интрогрессии). Например, молекулярный маркер, генетически и физически связанный с локусом CrS может использоваться для детекции и/или отбора растений, содержащих CrS. Чем ближе генетическая связь молекулярного маркера с

локусом, тем менее вероятно, что маркер диссоциируется от локуса при мейотической рекомбинации.

"LOD-балл" (количественный показатель сцепления генов (основание логарифма – 10) означает показатель, который получают с использованием статистического теста для анализа сцепления в популяциях животных и растений. LOD-балл относится к сравнению вероятности получения тестовых данных о фактической связи двух локусов (локусов молекулярных маркеров и/или локуса фенотипического признака) с вероятностью чисто случайного наблюдения одних и тех же данных. Положительный LOD-балл свидетельствует о высокой вероятности наличия сцепления, а LOD-балл 3,0 расценивается как доказательство наличия сцепления. LOD-балл +3 означает, что вероятность того, что наблюдаемая связь возникла неслучайно, составляет 1000 к 1.

При использовании по тексту настоящего документа термин "молекулярный маркер" или "маркер" относится к полиморфному локусу, то есть к полиморфному нуклеотиду (так называемый однонуклеотидный полиморфизм или SNP, который также именуется полиморфным основанием) или полиморфной последовательности ДНК (которая может представлять собой вставку или делецию определенной последовательности ДНК в определенном локусе или полиморфные последовательности ДНК). Маркер относится к измеряемой генетической характеристике с фиксированным положением в геноме, которая обычно наследуется по менделевскому принципу и может использоваться для картирования интересующего признака. Таким образом, молекулярный маркер может представлять собой короткую последовательность ДНК, например, последовательность, окружающую изменение одной пары оснований, то есть однонуклеотидный полиморфизм или SNP, или длинную последовательность ДНК, такую как микросателлиты или простые повторяющиеся последовательности (SSR). Свойства маркера зависят от используемого молекулярного анализа, и они могут определяться на уровне ДНК, РНК или белка. Генетическое картирование может осуществляться с использованием молекулярных маркеров, таких как, помимо прочего, RFLP (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов); Botstein *et al.* (1980), *Am J Hum Genet* 32:314-331; Tanksley *et al.* (1989), *Bio/Technology* 7:257-263), RAPD

[произвольно амплифицированная полиморфная ДНК; Williams *et al.* (1990), *NAR* 18:6531-6535], AFLP [полиморфизм длины амплифицированных фрагментов; Vos *et al.* (1995) *NAR* 23:4407-4414], SSR или микросателлиты [Tautz *et al.* (1989), *NAR* 17:6463-6471]. Соответствующие праймеры или зонды зависят от используемого метода картирования.

Маркер может идентифицироваться по идентичности 5'-фланкирующей последовательности полиморфного локуса, по самому полиморфному локусу (который может быть полиморфным основанием в SNP) и по 3'-фланкирующей области полиморфного локуса.

При использовании по тексту настоящего документа термины и выражения "маркер M1", "от маркера M2 до маркера Mx" или "M1", "M2" до "Mx", относятся к полиморфному локусу (или полиморфному основанию) в соответствии с описанием в настоящем документе выше.

Термин "маркерный аллель" относится к версии маркера (т.е. версии полиморфного локуса), который присутствует в определенном растении на одной из хромосом. Как правило, маркер может существовать в виде двух маркерных аллелей или он имеет или включает два маркерных аллеля. При использовании по тексту настоящего документа термин "гаплотип" относится к специфической комбинации маркерных аллелей, присутствующих в определенном растении или группе (родственных) растений. В соответствии с описанием в настоящем документе маркерный аллель может быть версией маркера, которая присутствует в устойчивой линии (маркерный аллель устойчивости к киле CrS). Версия того же маркера, которая присутствует в восприимчивой линии может именоваться аллелем маркера восприимчивости к киле CrS.

При использовании по тексту настоящего документа маркеры, обозначенные как "маркер M1/R", "маркер M2/R" – "маркер Mx/R" или "M1/R", "M2/R" – "Mx/R", относятся к маркерному аллелю (или к версии полиморфного локуса), который присутствует в обладающем устойчивостью источнике (или в обладающей устойчивостью донорной линии). Примеры маркерных аллелей для обладающего

устойчивостью источника, которые содержат полиморфное основание обладающего устойчивостью источника, приведены в Таблице 9.

При использовании по тексту настоящего документа маркеры, обозначенные как "маркер M1/S", "маркер M2/S" – "маркер Mx/S" или "M1/R", "M2/S" – "Mx/S", относятся к маркерному аллелю, который присутствует в восприимчивой линии (или в восприимчивом родителе). Примеры маркерных аллелей для восприимчивого источника, которые содержат полиморфное основание восприимчивой линии, приведены в Таблице 9.

Очевидно, что при упоминании по тексту документа определенного генотипа SNP или аллеля SNP (или маркерного генотипа или маркерного аллеля) в определенной геномной последовательности по изобретению, такое упоминание также включает генотипы или аллели SNP в вариантах этой геномной последовательности, то есть генотипы или аллели SNP в геномной последовательности, которая является гомологичной, и, например, включает, по меньшей мере, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более идентичности последовательности (существенная идентичность последовательности) с указанной последовательностью, такой как последовательность маркеров по изобретению. Таким образом, при упоминании по тексту документа любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - 22 в одном аспекте также включает вариант (гомологичную последовательность) любой из SEQ ID NO: 1 - 22, при этом указанный вариант включает, по меньшей мере, 85%, 90%, 95 %, 98%, 99% или более идентичности последовательности с указанной последовательностью (которая определяется с использованием, например, программы "Needle") и содержит указанный генотип (маркер) SNP или аллель SNP.

Термины "AFLP"[®] (AFLP[®] – зарегистрированная торговая марка KeyGene N.V., Вагенинген, Нидерланды), "AFLP-анализ" и "AFLP-маркер" используют в соответствии со стандартной терминологией [Vos *et al.* (1995), *NAR* 23:4407-4414; EP0534858; <http://www.keygene.com/keygene/techs-apps/>]. Вкратце, AFLP-анализ представляет собой технологию ДНК-дактилоскопии, с помощью которой осуществляют детекцию множественных рестрикционных фрагментов ДНК посредством ПЦР-амплификации. Технология AFLP обычно включает следующие

стадии: (i) рестрикция ДНК двумя рестрикционными ферментами, предпочтительно рестриктазами с четырёх- и шестинуклеотидным сайтом узнавания, например, EcoRI, PstI и MseI; (ii) лигирование двухцепочечных адаптеров к концам рестрикционных фрагментов, например, адаптеров EcoRI, PstI и MseI; (iii) амплификация подмножества рестрикционных фрагментов с использованием двух праймеров, комплементарных последовательностям адаптера и сайта рестрикции и которые удлинены на 3'-концах "селективными" нуклеотидами (1 - 3 нуклеотида), т.е. за счет использования праймеров, которые простираются в рестрикционные фрагменты, амплифицируя только те фрагменты, в которых удлинения праймера соответствуют нуклеотидам, фланкирующим сайты рестрикции, обеспечивается селективная амплификация. Таким образом, AFLP-праймеры имеют определенную последовательность, и каждый AFLP-праймер имеет определенный код (коды праймеров и их последовательности указаны на сайте Keygene: <http://www.keygene.com/keygene/pdf/PRIMERCO.pdf>, они включены в настоящий документ посредством ссылки); (iv) гель-электрофорез амплифицированных рестрикционных фрагментов на денатурирующих пластинчатых гелях или капиллярах; (v) визуализация ДНК-фингерпринтов путем радиоавтографии, фосфорной визуализации или других способов. С использованием этого способа можно визуализировать наборы рестрикционных фрагментов путем ПЦР без знания нуклеотидной последовательности. При использовании по тексту настоящего документа термин "AFLP-маркер" означает фрагмент ДНК определенного размера, который создается и визуализируется в виде полосы на геле путем проведения AFLP-анализа. Каждый AFLP-маркер обозначается комбинацией праймеров, использованной для его амплификации, с указанием приблизительного размера (в парах оснований) амплифицированного фрагмента ДНК. Очевидно, что размер этих фрагментов может незначительно варьироваться в зависимости от лабораторных условий и используемого оборудования. При каждом упоминании по тексту настоящего документа AFLP-маркера посредством указания комбинации праймеров и определенного размера фрагмента, следует понимать, что такой размер указан приблизительно и подразумевает незначительные вариации, которые могут наблюдаться в различных лабораториях. Каждый AFLP-маркер представляет определенный локус в геноме.

Термин "SSR" означает "простые повторяющиеся последовательности" или микросателлит [Tautz *et al.* (1989), *NAR* 17:6463-6471]. Короткие простые повторяющиеся последовательности встречаются в виде повторяющихся элементов во всех геномах эукариот. Локусы простых последовательностей, как правило, демонстрируют расширенные полиморфизмы. Эти полиморфизмы длины простых последовательностей (SSLP) могут быть обнаружены путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) и использоваться для тестирования идентичности, исследований популяций, анализа сцепления и картирования генома.

Очевидно, что одни молекулярные маркеры могут быть преобразованы в другие типы молекулярных маркеров. При упоминании по тексту настоящего изобретения конкретного молекулярного маркера следует понимать, что определение включает другие типы молекулярных маркеров, которые используют для обнаружения генетической вариации, первоначально идентифицированной конкретными молекулярными маркерами. Например, если AFLP-маркер преобразуется в другой молекулярный маркер с использованием известных методов, этот другой маркер включается в определение. Например, AFLP-маркер могут быть преобразованы в маркеры, специфичные для последовательности, например, помимо прочего, маркеры STS (STS – ДНК-маркирующий сайт) или SCAR (амплифицированные области, охарактеризованные секвенированием) с использованием стандартной технологии в соответствии с описанием в публикации Meksem *et al.* [(2001), *Mol Gen Genomics* 265(2):207-214], Negi *et al.* [(2000), *TAG* 101:146-152], Barret *et al.* (1989), *TAG* 97:828-833], Xu *et al.* [(2001), *Genome* 44(1):63-70], Dussel *et al.* [(2002), *TAG* 105:1190-1195] or Guo *et al.* [(2003), *TAG* 103:1011-1017]. Например, в публикации Dussel *et al.* [(2002), *TAG* 105:1190-1195] описано преобразование AFLP-маркеров, связанных с устойчивостью, в ДНК-маркирующий сайт-меченый сайты на основе ПЦР, таких как маркеры indel (вставка/удаление) и маркеры CAPS (рестрикционный полиморфизм амплифицированных последовательностей).

Подходящими молекулярными маркерами являются, например, маркеры SNP (однонуклеотидные полиморфизмы), AFLP-маркеры, микросателлиты, минисателлиты, маркеры произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD), маркеры RFLP, маркеры амплифицированных областей, охарактеризованных

секвенированием (SCAR) и другие, такие как маркеры TRAP, описанные в публикации Hu *et al.* 2007, *Genet Resour Crop Evol* 54: 1667-1674).

Способы и анализы для обнаружения маркеров или для анализа геномной ДНК на наличие маркера известны специалистам. Наличие маркера можно, например, обнаружить с использованием методов, основанных на гибридизации (например, аллель-специфической гибридизации), с использованием методов Taqman, Invader, методов на основе ПЦР, методов на основе лигирования олигонуклеотидов или методов на основе секвенирования.

Для обнаружения маркеров SNP может использоваться технология (KASP Competitive Allele-Specific PCR, аллель-специфическая ПЦР). Для KASP-анализа выбираются 70 или более пар оснований перед SNP и 70 или более пар оснований после SNP, и конструируются два аллель-специфичных прямых праймера и один аллель-специфический обратный праймер. Смотрите, например, Allen *et al.* 2011, *Plant Biotechnology J.* 9, 1086-1099, в частности, стр. 1097-1098 для KASP-анализа (который включен в настоящую заявку посредством ссылки).

Другие методы обнаружения SNP и Indel включают методы на основании удлинения одного основания гибрида зонд-нуклеиновая кислота. Эти методы обнаружения SNP осуществляют на основании гибридизации зонда, который находится рядом с полиморфизмом и который является идентичным для обоих аллелей, и удлинении нуклеотида для включения детектируемого нуклеотидного остатка при удлинении праймера. Обнаруживаемый сигнал от добавленного нуклеотида используется для определения идентичности добавленного нуклеотида, на основании чего определяется идентичность соответствующего аллеля. См., например, публикацию Gunderson *et al.*, 2006, *Methods Enzymol* 410:359 (которая включена в настоящую заявку посредством ссылки).

При использовании по тексту настоящего документа выражения "молекулярный маркер, связанный с локусом устойчивости к киле CrS" или "молекулярный маркер, связанный с наличием локуса устойчивости к киле CrS" означают молекулярный маркер в области генома, который наследуется с локусом устойчивости к киле CrS (в качестве единой генетической единицы) не менее чем в

50% случаев. Таким образом, в этом отношении термин "связанный" может означать нахождение на расстоянии около 50 сМ или меньше, например, около 40 сМ, около 30 сМ, около 20 сМ, около 10 сМ, около 7,5 сМ, около 6 сМ, около 5 сМ, около 4 сМ, около 3 сМ, около 2,5 сМ, около 2 сМ или меньше. Конкретные примеры маркеров, связанных с локусом устойчивости к киле CrS, указаны в Таблице 8. Таким образом, указанный "молекулярный маркер, связанный с локусом устойчивости к киле CrS" – это маркер, который связан с геном устойчивости к киле CrS.

Выражения "молекулярный маркер, связанный с локусом устойчивости к киле CrS" или "молекулярный маркер, связанный с наличием локуса устойчивости к киле CrS" также могут относиться к маркеру, который находится в пределах 10 сМ, в пределах 7,5 сМ, в пределах 6 сМ, в пределах 5 сМ, в пределах 4 сМ, в пределах 3 сМ, в пределах 2,5 сМ, в пределах 2 сМ или в пределах 1 сМ или в пределах 0,5 сМ от маркерного интервала от M4 до M5 включительно или между маркерами M4 - M5 включительно или между маркерами M4 - M7 включительно, или между маркерами M4 - M11 включительно. Такие молекулярные маркеры могут представлять собой маркеры, расположенные в маркерном интервале между маркерами M4 - M5 включительно или между маркерами M4 – M7 включительно или между маркерами M4 - M11 включительно. Таким образом, такой маркер может представлять собой любой маркер в положении на хромосоме в пределах 10 сМ от маркерного интервала M4 – M11, включая маркеры M4 и M11. В Таблице 8 приведены примеры маркеров, расположенных в маркерном интервале между маркерами M4 и M11 включительно.

При использовании по тексту настоящего документа термины "Brassicaceae" или "растение Brassicaceae" относятся к растениям, принадлежащим к семейству растений Brassicaceae, которое также может именоваться семейство Cruciferae. Примеры растений семейства Brassicaceae включают, помимо прочего, следующие растения: виды *Brassica*, такие как *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica carinata*, *Brassica nigra*, и *Brassica juncea*; виды *Raphanus*, такие как *Raphanus caudatus*, *Raphanus raphanistrum*, и *Raphanus sativus*; виды *Matthiola*; виды *Cheiranthus*; виды *Camelina*, такие как *Camelina sativa*; виды *Crambe*, такие как *Crambe abyssinica* и *Crambe hispanica*; виды *Eruca*, такие как *Eruca vesicaria*; виды *Sinapis*, такие как *Sinapis*

alba; виды *Diplotaxis*; виды *Lepidium*; виды *Nasturtium*; виды *Orychophragmus*; виды *Armoracia*, виды *Eutrema*; виды *Lepidium*; и виды *Arabidopsis*.

Термин "растение *Brassica*" означает аллотетраплоид или амфидиплоид *Brassica napus* (ААСС, $2n=38$), *Brassica juncea* (ААВВ, $2n=36$), *Brassica carinata* (ВВСС, $2n=34$), или диплоид *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*) (АА, $2n=20$), *Brassica oleracea* (СС, $2n=18$) или *Brassica nigra* (ВВ, $2n=16$).

При использовании по тексту настоящего документа термин "масличный рапс" или "масличная культура *Brassica*" или "культурный масличный рапс" относится к масличному рапсу, который выращивается как сельскохозяйственная культура, например, следующие виды: *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea* или *Brassica carinata*.

Термин "озимый масличный рапс" или "растение ОМР" означает растения масличного рапса *Brassica*, которые высевают в период от конца лета до ранней осени, которые переносят зиму и которые собирают следующим летом. Для цветения растения ОМР требуется яровизация.

Термин "яровой масличный рапс" или "растение ЯМР" означает растения масличного рапса *Brassica*, которые высевают ранней весной и собирают в конце лета. Для цветения растения ЯМР яровизация не требуется.

При использовании по тексту настоящего документа "эруковая кислота" представляет собой моносенасыщенную жирную кислоту омега-9, которая обозначается 22: 1ω9 или 22:1.

"С низким содержанием эруковой кислоты" означает содержание менее 2% эруковой кислоты в масле семян.

Выражения "качество канола" или "масло качества канола" означают масло, которое содержит менее 2% эруковой кислоты и менее 30 микромолей глюкозинолатов на грамм безмасляной муки воздушной сушки.

"Биологический образец" может относиться к растению или к части растения, например, к ткани или клетке растения.

При использовании по тексту настоящего документа термин "получение геномной ДНК" относится к получению образца, содержащего геномную ДНК из растения. Термин "образец" может означать образец ткани, полученный из указанного растения, например, образец листа, содержащий геномную ДНК из указанного растения. Термин "образец" может дополнительно относиться к геномной ДНК, полученной из образца ткани, например, к геномной ДНК, полученной из ткани, такой как образец листа. Получение геномной ДНК может включать, при необходимости, очистку геномной ДНК, полученной из образца ткани. Таким образом, получение геномной ДНК также включает получение тканевого материала из растения или более крупного фрагмента ткани и получение из него неочищенного экстракта или лизата.

При использовании по тексту настоящего документа термин "комплект" относится к набору реагентов, который предназначается для осуществления способа по изобретению, в частности, для идентификации ген устойчивости к киле CrS в биологических образцах или для определения статуса зиготности растительного материала, содержащего ген устойчивости к киле CrS. В частности, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения комплект по изобретению включает, по меньшей мере, два специфических праймера для идентификации генов устойчивости к киле CrS или, по меньшей мере, два или три специфических праймера для определения статуса зиготности. При необходимости, комплект также может включать любой другой реагент. В качестве альтернативы, в соответствии с другим вариантом осуществления изобретения комплект может включать, по меньшей мере, один специфический зонд, который специфически гибридизирует с нуклеиновой кислотой биологических образцов для идентификации присутствия в ней генов устойчивости к киле CrS, или комплект может включать, по меньшей мере, два или три специфических зонда для определения статуса зиготности. При необходимости, комплект также может включать любой другой реагент (в том числе, помимо прочего, буфер для гибридизации или метку) для идентификации генов устойчивости к киле CrS в биологических образцах с использованием специфического зонда.

При использовании по тексту настоящего документа термин "праймер" включает любые нуклеиновые кислоты, которые способны инициировать синтез возникающей нуклеиновой кислоты в матрица-зависимом процессе, таком как ПЦР.

Как правило, праймеры представляют собой олигонуклеотиды длиной от 10 до 30 нуклеотидов, однако также могут использоваться последовательности большей длины. Могут использоваться праймеры в двухцепочечной форме, несмотря на то, что предпочтительной является одноцепочечная форма. В качестве праймеров могут использоваться зонды, однако они предназначаются для связывания целевой ДНК или РНК, и нет необходимости в их использовании в процессе амплификации.

При использовании по тексту настоящего документа в отношении специфических праймеров термин "распознавать" относится к тому факту, что специфические праймеры специфически гибридизируют со специфической нуклеотидной последовательностью при условиях, заданных в соответствии со способом (таких как условия протокола ПЦР-идентификации), при этом определяется специфичность с помощью присутствующих положительных и отрицательных контролей.

При использовании по тексту настоящего документа термин "изолированная ДНК" относится к ДНК, не встречающейся в ее естественном геномном контексте, независимо от ее длины и последовательности. Термин "изолированная ДНК" может, например, относиться к ДНК, которая физически отделена от геномного контекста, например, к фрагменту геномной ДНК. Изолированная ДНК также может представлять собой искусственно полученную ДНК, например, химически синтезированную ДНК или ДНК, полученную с помощью реакций амплификации, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), известных специалистам. Термин "изолированная ДНК" может также относиться к ДНК, присутствующей в контексте ДНК, в которой она не встречается в природе. Например, термин "изолированная ДНК" может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в плазмиде. Кроме того, термин "изолированная ДНК" может относиться к фрагменту ДНК, присутствующему в другом хромосомном контексте, чем тот, в котором он встречается в природе, например, в таком положении в геноме, которое отличается от естественного положения, в геноме другого вида, чем тот вид, в котором он встречается в естественных условиях, или в искусственной хромосоме.

При упоминании по тексту термина "растение" или "растения" согласно данному изобретению подразумевается, что, за исключением случаев, когда прямо указано иное, настоящее изобретение также включает части растения (клетки, ткани или органы, семянки, семена, отделенные части, такие как корни, листья, цветки, пыльца и т.д.), потомство растений, которое сохраняет отличительные характеристики родителей (в особенности, характеристики, относящиеся к растрескиванию плодов), такое как семя, полученное путем самоопыления или скрещивания, например, гибридное семя (полученное путем скрещивания двух инбредных родительских линий), гибридные растения и части растений, полученный из таких растений.

При использовании по тексту настоящего документа выражение "создание материала для размножения" относится к любым известным специалистам средствам для получения других растений, частей или семян растений, такое выражение включает, помимо прочего, способы вегетативного размножения (например, размножение отводками, деление, прививка (почками), микроклональное размножение, столоны или плети, запасающие органы, такие как луковицы, клубнелуковицы, клубни и ризомы, разрезание или разделение клубней или луковиц), половое размножение (скрещивание с другим растением) и бесполое размножение (например, апогамогония, соматическая гибридизация).

Для целей изобретения термин "идентичность последовательности" двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей, выраженная в процентном соотношении, относится к количеству положений в двух оптимально выравниваемых последовательностях с идентичными остатками, которое умножается на сто и делится на количество сравниваемых положений. Разрыв, то есть положение в выравнении, где в одной последовательности какой-либо остаток присутствует, а в другой отсутствует, рассматривается как положение с неидентичными остатками. Термин "оптимальное выравнение" двух последовательностей определяется путем выравнения двух последовательностей по всей длине в соответствии с алгоритмом глобального выравнения Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol 48(3):443-53) в The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS, Rice *et al.*, 2000, Trends in Genetics 16(6): 276-277; смотрите, например, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>) с использованием установок по

умолчанию (штраф на внесение делеции = 10 (для нуклеотидов) / 10 (для белков) и штраф за продолжение делеции = 0,5 (для нуклеотидов) / 0,5 (для белков)). Для нуклеотидов по умолчанию используется матрица замен EDNAFULL, а для белков – EBLOSUM62. Очевидно, что всякий раз, когда нуклеотидные последовательности молекул РНК определяются со ссылкой на нуклеотидную последовательность соответствующих молекул ДНК, тимин (Т) в нуклеотидной последовательности должен быть заменен урацилом (U). Из контекста заявки ясно, имеются в виду молекулы РНК или ДНК.

При использовании по тексту настоящего документа термины "содержать" и "включать" указывают на присутствие заявленных свойств, целых чисел, этапов или компонентов, или их групп, однако не исключают присутствия или дополнительного наличия одного или нескольких других свойств, целых чисел, этапов, компонентов или их групп. Таким образом, например, нуклеиновая кислота или белок, включающий последовательность нуклеотидов или аминокислот, может включать большее количество нуклеотидов или аминокислот, чем фактически указано, т.е. они могут быть встроены в нуклеиновую кислоту или белок большего размера. Химерный ген, включающий нуклеиновую кислоту, которая функционально или структурно определена, может включать дополнительные области ДНК и т.д.

Подробное описание

Настоящее изобретение основано на идентификации локуса устойчивости к киле CrS у *Brassica*. Неожиданно было обнаружено, что локус устойчивости к киле CrS может быть введен в элитные сорта *Brassica* и что могут быть получены линии с низким содержанием эруковой кислоты.

В первом варианте осуществления изобретением предоставляется растение *Brassica*, содержащее <2% эруковой кислоты в масле семян и содержащее локус устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркер M4. В еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M5. В еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный

интервал от маркера М4 до М8, в то время как в еще одном варианте осуществления изобретения указанный локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера М4 до М11. В еще одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению содержит маркерный аллель М4/R, в то время как еще в одном варианте осуществления растение по настоящему изобретению содержит маркерные аллели М4/R и М5/R или содержит маркерные аллели М4/R, М5/R, М6/R и М7/R.

Растение по изобретению может содержать <2% эруковой кислоты или <1,5% эруковой кислоты или <1% эруковой кислоты или 0% эруковой кислоты.

Маркерный интервал может представлять собой область, которая присутствует в доноре CrS на генетической карте от 55,49 до 57,50 сМ или от 55,49 до 55,67 сМ или от 55,49 до 58,77 сМ или от 55,49 до 59,14 сМ или от 55,49 до 59,32 сМ или от 55,49 до 66,98 сМ на генетической карте, как показано в примерах в настоящем документе. Понятно, что маркер М4 может представлять собой маркерный аллель М4/R, при этом маркерный аллель для маркера М4 представляет собой А, маркер М5 может представлять собой маркерный аллель М5/R, при этом маркерный аллель для маркера М5 представляет собой Т, маркер М6 может представлять собой маркерный аллель М6/R, при этом маркерный аллель для маркера М6 представляет собой G, маркер М7 может представлять собой маркерный аллель М7/R, при этом маркерный аллель для маркера М7 представляет собой Т. Кроме того, понятно, что маркер М8 может представлять собой маркерный аллель М8/R, при этом маркерный аллель для маркера М8 может представлять собой С, маркер М9 может представлять собой маркерный аллель М9/R, при этом маркерный аллель для маркера М9 может представлять собой Т, маркер М10 может представлять собой маркерный аллель М10/R, при этом маркерный аллель для маркера М10 может представлять собой А, маркер М11 может представлять собой маркерный аллель М11/R, при этом маркерный аллель для маркера М11 может представлять собой А.

Маркерным интервалом может быть область, присутствующая в доноре CrS, которая соответствует области от положения 10,369,430 п.н. до положения 10,375,744 или от положения 10,369,430 до положения 9,699,466 п.н. или от положения 10,369,430

п.н. до положения 933,572 п.н. на геномной последовательности Darmog-bzh (версия 8.1) в соответствии с описанием в публикации Bayer et al., 2017, Plant Biotech J. 15, p. 1602, где основание в положении 10,369,430 п.н. представляет собой А; основание в положении 10,3757,44 п.н. представляет собой Т, и, при необходимости, основание в положении 9,801,311 представляет собой G, при необходимости, основание в положении 9,699,466 п.н. представляет собой Т, и, при необходимости, основание в положении 933,572 п.н. представляет собой А.

Растение *Brassica* по изобретению может содержать в маркерном интервале любой дополнительный маркер, такой как М5 и/или М6.

Локус устойчивости к киле CrS может находиться в маркерном интервале от маркера М4 до М5 или в маркерном интервале от маркера М4 до М6 или в маркерном интервале от маркера М4 до М7 или в маркерном интервале от маркера М4 до М8 или в маркерном интервале от маркера М4 до М9 или в маркерном интервале от маркера М4 до М10 или в маркерном интервале от маркера М4 до М11.

Ген устойчивости к киле CrS (который может также именоваться "ген устойчивости CrS", или "ген CrS") расположен в локусе устойчивости к киле CrS. Другими словами, термин "локус устойчивости к киле CrS" относится к генетическому локусу, который содержит ген устойчивости к киле CrS.

Семена *Brassica*, содержащие локус устойчивости к киле CrS, депонированы в NCIMB (NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Scotland, UK) 21 января 2019г., под номером доступа NCIMB 43341.

Хромосомный интервал, фланкированный маркерами в соответствии с описанием в настоящем документе, представляет собой, например, маркеры, расположенные между конкретно упомянутыми маркерами, перечень которых приведен в таблицах 3 и 8 ниже, или другие маркеры, которые явно не указаны, но которые также фланкируются указанными парами маркеров. Специалист может легко идентифицировать новые маркеры в геномной области, фланкируемой любой из пар маркеров, перечисленных выше. Такие маркеры не обязательно должны быть маркерами SNP, но могут представлять собой генотипический или фенотипический маркер любого типа, картированным в этой геномной или субгеномной области.

Предпочтительно такие маркеры генетически и физически связаны с описанным локусом CrS по изобретению. Маркеры предпочтительно указывают на наличие локуса CrS неспецифическим образом.

В еще одном варианте осуществления изобретения растение по настоящему изобретению не содержит маркерный аллель M3/R или M2/R, или M1/R или их комбинацию.

Очевидно, что растения, у которых хромосомный интервал на левой стороне маркера M4 происходит от восприимчивого рекуррентного родителя, не содержат фенотипа растения с высоким содержанием эруковой кислоты от резистентного родителя-донора.

Растение *Brassica* по изобретению также может представлять собой растение, не содержащее маркерного аллеля M3/R, не содержащее маркерного аллеля M2/R, не содержащее маркерного аллеля M1/R, не содержащее маркерного аллеля M3/R и M1/R или не содержащее маркерного аллеля M2/R и маркерного аллеля M1/R. Растение *Brassica* по изобретению может не содержать хромосомный сегмент, полученный от родителя-донора CrS, слева от маркера M3 или слева от маркера M2. Растение *Brassica* по изобретению может не содержать хромосомный сегмент, полученный от родителя-донора CrS, расположенный после положения, соответствующего положению 11,256,444 п.н. геномной последовательности Darmog-bzh (версия 8.1) (и включая указанное положение) в соответствии с описанием в указанной выше публикации Bayer et al.. Растение *Brassica* по изобретению может не содержать хромосомный сегмент, полученный от родителя-донора CrS, слева от генетического положения, соответствующего генетическому положению 53,14 cM согласно генетической карте в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе "Примеры". Таким образом, растение может не содержать маркерный аллель "A" маркера M3 и/или может не содержать маркерный аллель "A" маркера M2 и/или может не содержать маркерный аллель "T" маркера M1.

"M1/R" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M1, в котором полиморфным основанием является "T".

"M8/R" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M8, в котором полиморфным основанием является "С".

"M8/S" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M8, в котором полиморфным основанием является "Т".

"M9/R" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M9, в котором полиморфным основанием является "Т".

"M9/S" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M9, в котором полиморфным основанием является "С".

"M10/R" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M10, в котором полиморфным основанием является "А".

"M10/S" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M10, в котором полиморфным основанием является "G".

"M11/R" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M11, в котором полиморфным основанием является "А".

"M11/S" согласно определению в настоящем документе представляет собой маркерный аллель маркера M11, в котором полиморфным основанием является "G".

В еще одном варианте осуществления растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение *Brassica napus* или *Brassica rapa*, в то время как в еще одном варианте осуществления растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ОМР (*Brassica napus*) или растение ЯМР (*Brassica napus*).

В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ОМР (*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M7. В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению представляет собой растение ЯМР (*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M5, например, растение ЯМР (*Brassica napus*), содержащее маркерный интервал от маркера M4 до M8, например, растение ЯМР

(*Brassica napus*), в котором указанный хромосомный сегмент может быть получен из эталонных семян, депонированных в NCIMB под номером доступа NCIMB 43341.

Растение OMP (*Brassica napus*) может содержать локус устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M9 или от маркера M4 до M10 от маркера M4 до M11. Растение OMP *Brassica napus* может не содержать маркерного аллеля M2/R или может не содержать маркерных аллелей M2/R и M1/R. Указанное растение OMP *Brassica napus* может не содержать хромосомный сегмент, полученный от родителя-донора CrS, слева от маркера M3 или слева от маркера M2 или после положения, соответствующего положению 11,256,444 п.н. Darmog-bzh (версия 8.1) геномной последовательности в соответствии с описанием в указанной выше публикации Bayer et al. или после положения 12,499,060 п.н. геномной последовательности Darmog-bzh (версия 8.1) в соответствии с описанием в указанной выше публикации Bayer et al., или слева от генетического положения, соответствующего генетическому положению 53,14 cM согласно генетической карте в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе "Примеры" или слева от генетического положения, соответствующему положению 51,99 cM согласно генетической карте в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе "Примеры".

Растение ЯМР OMP (*Brassica napus*) может содержать локус устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M5 или от маркера M4 до M6 или от маркера M4 до M7 или от маркера M4 до M8 или от маркера M4 до M9 или от маркера M4 до M10 или от маркера M4 до M11. Растение ЯМР *Brassica napus* может не содержать маркерного аллеля M3/R или может не содержать маркерных аллелей M3/R и M1/R. Указанное растение ЯМР *Brassica napus* может не содержать хромосомный сегмент, полученный от родителя-донора CrS, слева от маркера M3 или после положения, соответствующего положению 11,256,444 п.н. Darmog-bzh (версия 8.1) геномной последовательности в соответствии с описанием в указанной выше публикации Bayer et al. или слева от генетического положения, соответствующего генетическому положению 53,14 cM согласно генетической карте в соответствии с описанием в настоящем документе, в разделе "Примеры".

Понятно, что растения по изобретению, содержащие локус устойчивости к киле CrS, могут содержать маркерные аллели из обладающего устойчивостью источника (из родителя-донора CrS) в указанном маркером интервале. Например, растения, содержащие локус устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M7, могут содержать маркерные аллели M4/R и M7/R или могут содержать маркерные аллели M4/R, M5/R, M6/R и M7/R. Указанные растения могут дополнительно содержать маркерный аллель M8/R и, при необходимости, маркерный аллель M9/R, и, при необходимости, маркерный аллель M10/R, и, при необходимости, маркерный аллель M11/R.

В соответствии с еще одним аспектом растение *Brassica* по настоящему изобретению обладает устойчивостью к патотипам *P. brassicae* P2, P3, P5, P6 или P8 или к изоляту CR11. Такое растение *Brassica* также может обладать устойчивостью к некоторым из недавно выявленных патотипов, включая 2B, 3A, 5X and 8P согласно системе CCD (Canadian Clubroot Differential set), см. публикацию Strelkov et al. 2018, *Can J Plant Pathology* стр. 284.

В еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению является гетерозиготным по указанному локусу устойчивости к киле, в то время как в еще одном аспекте растение *Brassica* по настоящему изобретению является гомозиготным по указанному локусу устойчивости к киле.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления предоставляется растение *Brassica* по настоящему изобретению, которое также содержит ген, придающий устойчивость к гербицидам. В еще одном варианте осуществления ген, придающий устойчивость к гербицидам, представляет собой ген, придающий устойчивость к глюфосинату или глюфосинату аммония, или ген, придающий устойчивость к глифосату.

Ген, придающий устойчивость к гербицидам, может представлять собой ген *bar* или *pat*, которые придают устойчивость к глюфосинату аммония (Liberty®, Basta® или Ignite®) [см. документы EP 0 242 236 и EP 0 242 246, включенные в настоящий документ посредством ссылки], или любой модифицированный ген EPSPS, например, ген 2mEPSPS кукурузы [см. документы EP 0 508 909 и EP 0 507 698, включенные в

настоящий документ посредством ссылки], или глифосатацетилтрансферазу, или глифосатоксидоредуктазу, которые придают устойчивость к глифосату (RoundupReady®), или бромксинитрилнитрилазу для придания устойчивости к бромксинитрилу или любой модифицированный ген AHAS, который придает устойчивость к сульфонилмочевинам, имидазолинонам, сульфониламинокарбонилтриазолинонам, триазолопиримидинам или пиримидил(окси/тио)бензоатам, такие как мутанты масличного рапса PM1 и PM2, устойчивые к имидазолинону, которые в настоящее время доступны на рынке как канола Clearfield®. Кроме того, растения по изобретению могут дополнительно содержать эндогенный ген или трансген, который обеспечивает повышенное содержание масла или улучшенный состав масел, например, повышение уровня АСР тиоэстеразы 12:0 для получения высокого содержания лаурата, который обеспечивает контроль за опылением, например, ген barnase под контролем пыльник-специфичного промотора для получения мужской стерильности или ген barstar под контролем пыльник-специфичного промотора для придания восстановления мужской стерильности, или например, цитоплазматическая мужская стерильность типа Ogura и ядерный восстановитель фертильности.

Растения по изобретению, которые дополнительно содержат ген, придающий устойчивость к глюфосинату аммония (Liberty®, Basta® или Ignite®), могут содержать ген, кодирующий фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT), такой как кодирующая последовательность гена устойчивости к биалафосу (bar-ген) *Streptomyces hygroscopicus*. Такие растения могут, например, содержать элитные события MS-BN1 и/или RF-BN1 как описано в WO01/41558, или элитное событие MS-B2 и/или RF-BN1, как описано в WO01/31042 или в WO2014/170387, или любую комбинацию указанных событий.

Растения по изобретению, которые содержат ген, придающий устойчивость к глифосату (RoundupReady®), могут содержать устойчивую к глифосату энолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу, например, CP4 EPSPS, или ген N-ацетилтрансферазы (gat). Такие растения могут, например, содержать элитное событие RT73, как описано в WO02/36831, или элитное событие MON88302, как описано в WO11/153186, или событие DP-073496-4, как описано в WO2012/071040.

Растения по настоящему изобретению могут также представлять собой растения качества канола.

Изобретением также предоставляются семена, полученные из растений по настоящему изобретению.

В соответствии с еще одним аспектом изобретением предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы: (a) идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS, по меньшей мере, с одним маркером в пределах 10 сМ от маркерного интервала от M4 до M5, и (b) отбор растения, содержащего указанный локус устойчивости к киле CrS. В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения указанный способ включает идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R, в то время как в соответствии с другим вариантом осуществления указанное растение *Brassica* идентифицируется с помощью маркеров в маркерном интервале от M4 до M5.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы: (a) скрещивание первого растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS со вторым растением, и (b) идентификацию растения-потомка, содержащего, по меньшей мере, один маркер в пределах 10 сМ от маркерного интервала от M4 до M5. В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения указанный способ включает идентификацию растения-потомка, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R.

Наличие локуса устойчивости к киле может идентифицироваться с использованием молекулярных маркеров.

Маркер в пределах 10 сМ от маркерного интервала M4 - M5 может представлять собой маркер в пределах 10 сМ или 8 сМ или 5 сМ или 3 сМ или 2 сМ или 1 сМ или

0,5 сМ от интервала М4 - М5 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М11 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М10 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М9 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М8 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М7 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М6 или может представлять собой маркер в интервале М4 - М5. Маркер в пределах 10 сМ маркерного интервала от М4 до М5 может содержать любой из маркеров М4, М5, М6, М7, М8, М9, М10 и М11.

Могут использоваться маркеры, которые связаны с локусом устойчивости к киле CrS. они могут быть разработаны с использованием известных специалистам способов. На основе генетической информации локуса CrS могут быть разработаны новые маркеры, котрые могут использоваться в соответствии с изобретением. Понятно, что такие маркеры могут быть разработаны путем сравнения последовательности локуса устойчивости к киле CrS из устойчивой линии *Brassica* с последовательностью того же локуса в восприимчивой линии *Brassica*, идентификации конкретной области последовательности в локусе устойчивости к киле CrS, которая не встречается в соответствующем локусе восприимчивой линии *Brassica*. Таким образом, молекулярный маркер, связанный с локусом устойчивости к киле CrS, может являться маркером, с помощью которого может определяться наличие локуса устойчивости к киле CrS. Молекулярный маркер, связанный с локусом устойчивости к киле CrS, может также представлять собой маркер в последовательностях, фланкирующих локус устойчивости к киле CrS, который является полиморфным между линиями, содержащими локус устойчивости к киле CrS, и линиями, не содержащими локус устойчивости к киле CrS, но который наследуется с локусом устойчивости к киле CrS (в качестве единой генетической единицы) не менее чем в 50% случаев. Соответствующие маркеры для идентификации наличия локусов устойчивости к киле CrS – любой из маркеров М4, М5, М6, М7, М8, М9, М10 и М11.

Маркеры, которые могут использоваться для определения наличия локуса устойчивости к киле CrS, могут представлять собой маркеры, которые связаны с локусом устойчивости к киле CrS, например, маркеры, указанные в Таблице 8, в частности, маркерные аллели устойчивости к киле CrS, которые являются

полиморфными между резистентным родителем-донором и восприимчивым рекуррентным родителем.

Понятно, что растения, содержащие локус устойчивости к киле львы CrS, могут быть получены путем идентификации наличия маркерных аллелей M4/R, M5/R, M6/R, M7/R, M8/R, M9/R, M10/R и M11/R.

Отсутствие локуса устойчивости к киле CrS можно определить по отсутствию маркерных аллелей, которые связаны с наличием локуса устойчивости к киле CrS (маркерные аллели устойчивости к киле CrS), например, по отсутствию маркерных аллелей устойчивости к киле CrS, указанных в Таблице 8, с полиморфным основанием, которое обнаруживается в обладающих устойчивостью линиях. Кроме того, маркеры, которые могут использоваться для определения отсутствия локуса устойчивости к киле CrS, могут представлять собой маркерные аллели, которые связаны с локусом восприимчивости к киле CrS (маркерные аллели восприимчивости к киле CrS, т.е. аллели в восприимчивом рекуррентном родителе). Примерами маркерных аллелей восприимчивости к киле CrS, которые связаны с локусом восприимчивости к киле CrS, являются маркерные аллели, указанные в Таблице 8, с полиморфным основанием, которое обнаруживается у рекуррентного родителя.

Отсутствие маркерных аллелей может определяться путем определения отсутствия указанных маркерных аллелей из обладающего устойчивостью источника. Отсутствие маркерных аллелей из обладающего устойчивостью источника может (но не обязательно) определяться путем определения наличия соответствующего маркерного аллеля из восприимчивой линии. Например, отсутствие маркерных аллелей M3/R или M2/R, или M1/R может определяться путем определения наличия M3/S или M2/S, или M1/S.

Анализ на наличие маркеров по изобретению может осуществляться с использованием первого праймера и второго праймера и, при необходимости, зонда, выбранного из группы, состоящей из первого праймера, состоящего из последовательности длиной 15 - 30 нуклеотидов или 15 - 25 нуклеотидов или 18 - 22 нуклеотидов генов устойчивости к киле CrS по изобретению, второго праймера, комплементарного последовательности длиной 15 - 30 нуклеотидов или 15 - 25

нуклеотидов или 18 - 22 нуклеотидов ген устойчивости к киле CrS по изобретению, и при этом расстояние между указанным первым и указанным вторым праймером на гене устойчивости к киле CrS составляет 1 - 400 оснований или 1 - 150 оснований, и при этом первый праймер расположен относительно кодирующей CrS последовательности перед указанным вторым праймером, а зонд, который идентичен, по меньшей мере, 15 нуклеотидам или, по меньшей мере, 18 нуклеотидам, но не более чем 25 нуклеотидам или не более чем 22 нуклеотидам последовательности гена устойчивости к киле CrS расположен между указанным первым и указанным вторым праймером при условии, что последовательность первого праймера или последовательность второго праймера или последовательность указанного зонда не присутствует в соответствующем локусе в восприимчивом растении *Brassica*. Указанный зонд может быть мечен так как, например, описано в патенте США 5,538,848.

Анализ на наличие маркеров по изобретению может осуществляться с использованием первого и второго праймера в соответствии с описанием выше, которые распознают последовательность CrS соответствующий локус в восприимчивой линии *Brassica*, при этом первый зонд распознает последовательность гена устойчивости к киле CrS в соответствии с описанием выше, но не распознает последовательность между указанным первым и указанным вторым праймером в восприимчивой линии *Brassica*, а второй зонд распознает последовательность между указанным первым и указанным вторым праймером в восприимчивой линии *Brassica*, но не распознает ген устойчивости к киле CrS, и при этом указанная метка первого зонда отличается от метки второго зонда.

Другими подходящими праймерами для анализа наличия маркеров по изобретению являются маркеры: первый праймер в соответствии с описанием выше, который распознает последовательность CrS и соответствующий локус в восприимчивой линии *Brassica*, второй праймер, который распознает последовательность CrS, но не распознает соответствующий локус в восприимчивой линии *Brassica* и третий праймер, который распознает соответствующий локус в восприимчивой линии *Brassica*, но не распознает последовательность CrS. Указанный

второй и третий праймеры могут быть помечены, как указано выше, и указанный второй праймер может содержать метку, отличную от указанного третьего праймера.

Идентификацию продуктов ПЦР, специфических для генов устойчивости к киле CrS и для соответствующего локуса в восприимчивой линии *Brassica*, может осуществляться, например, путем определения размера после гельэлектрофореза или капиллярного электрофореза (например, для локуса устойчивости к киле CrS и для соответствующего локуса в восприимчивой линии *Brassica*, содержащих некоторое количество нуклеотидных вставок или делеций, что приводит к разнице в размере между фрагментами, амплифицированными из локуса устойчивости к киле CrS и для соответствующего локуса в восприимчивой линии *Brassica*, таким образом, чтобы могла осуществляться визуальная сепарация указанного фрагмента на геле); путем оценки присутствия или отсутствия двух различных фрагментов после гельэлектрофореза или капиллярного электрофореза, при этом при необходимости может осуществляться диагностическая ПЦР-амплификация соответствующего локуса в восприимчивой линии; путем прямого секвенирования амплифицированных фрагментов; или методами детекции на основе флуоресценции.

Анализ на присутствие маркеров по изобретению может осуществляться с использованием зонда, который гибридизует с основаниями непосредственно перед маркером, после чего следует удлинение праймера, в ходе которого ДНК-полимераза удлиняет гибридизованный праймер, добавляя основание, комплементарное маркеру. Встроенное основание снабжается меткой и обнаруживается по специфичной метке, поскольку встроенное основание определяет маркерный аллель.

В любом из описанных выше способов или применений маркеры и маркерные аллели могут локализоваться в одних и тех же хромосомных интервалах и могут быть выбраны из тех же групп в соответствии с описанием выше для других вариантов осуществления и аспектов.

Также предоставляются любые маркеры, содержащие аллель, связанный с функциональным геном CrS, расположенным на хромосоме A08 в соответствии с описанием в настоящем документе.

Настоящим изобретением также предоставляется хромосомный фрагмент, который содержит ген устойчивости CrS в соответствии с описанием в настоящем документе. В соответствии с одним аспектом изобретения хромосомный фрагмент изолирован из своего природного окружения. В соответствии с еще одним аспектом таким окружением является клетка растения, в частности, клетка растения *Brassica*. Кроме того, настоящим изобретением предоставляется изолированная часть хромосомного фрагмента, содержащая ген устойчивости CrS, расположенный на хромосоме A08. Такой хромосомный фрагмент может представлять собой, например, контигом или скаффолд.

Кроме того, в настоящем документе описан хромосомный фрагмент, содержащий локус устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M5, при этом указанный хромосомный фрагмент также содержит маркерные аллели M3/S или M2/S или M1/S или их комбинации.

В еще одном варианте осуществления изобретения предоставляется способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий введение локуса устойчивости к киле CrS в растение, не содержащее локус устойчивости к киле CrS, с использованием геномного редактирования.

Введение локуса устойчивости к киле CrS может осуществляться путем замены соответствующего геномного сегмента в растении *Brassica*, не содержащего локус устойчивости CrS, на хромосомный сегмент, содержащий локус устойчивости к киле CrS, например, на хромосомный сегмент, содержащий маркерный интервал от маркера M4 до M5. В качестве альтернативы, указанный способ может включать определение последовательности локуса устойчивости CrS, например, хромосомного сегмента, содержащего маркерный интервал от маркера M4 до M5, определение последовательности соответствующего хромосомного сегмента растения *Brassica*, не содержащего локус устойчивости CrS, и замену путем геномного редактирования указанного хромосомного сегмента указанного растения *Brassica*, не содержащего локус устойчивости CrS, на последовательность указанного хромосомного сегмента с указанным локусом устойчивости CrS. Замена последовательности может

осуществляться путем замены хромосомного фрагмента или путем внесения отдельных изменений в последовательность.

Соответственно, с использованием этих технологий растения без гена CrS могут быть преобразованы в растения, обладающие устойчивостью к киле CrS, путем внесения целевых изменений в существующий локус, который соответствует локусу CrS, или, в качестве альтернативы, путем введения одной или нескольких полных последовательностей гена CrS, например, в соответствии с описанием в настоящем документе, в соответствующее конкретное положение в геноме.

При использовании по тексту настоящего документа термины "редактирование генома" или "геномное редактирование" или "геномная инженерия" относятся к направленной модификации геномной ДНК, при которой может осуществляться вставка, удаление, модификация или замена ДНК в геноме. При геномном редактировании могут использоваться специфичные для последовательности ферменты (такие как эндонуклеаза, нуклеазы, ферменты-редакторы оснований) и/или донорные нуклеиновые кислоты (например, дцДНК, олигонуклеотидов) для внесения необходимых изменений в ДНК. Сайт-специфичные нуклеазы, которые можно запрограммировать на распознавание определенных последовательностей ДНК, включают мегануклеазы (MGN), нуклеазы белкового домена "цинковые пальцы" (ZFN), нуклеаза на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN) и РНК-управляемые или ДНК-управляемые нуклеазы, такие как Cas9, Cpf1, CasX, CasY, C2c1, C2c3, некоторые системы на основе Argonaut (смотрите, например, Osakabe and Osakabe, *Plant Cell Physiol.* 2015 Mar;56(3):389-400; Ma et al., *Mol Plant.* 2016 Jul 6;9(7):961-74; Bortesi et al., *Plant Biotech J.* 2016, 14; Murovec et al., *Plant Biotechnol J.* 15:917-926, 2017; Nakade et al., *Bioengineered* Vol 8, No.3:265-273, 2017; Burstein et al., *Nature* 542, 37–241; Komor et al., *Nature* 533, 420–424, 2016; все включены в настоящую заявку посредством ссылки). Донорные нуклеиновые кислоты могут использоваться в качестве матрицы для репарации разрыва ДНК, индуцированного сайт-специфичной нуклеазой. Донорные нуклеиновые кислоты могут также использоваться сами по себе для геномного редактирования без индукции разрыва ДНК, чтобы внести необходимое изменение в геномную ДНК.

Еще одна цель изобретения относится к применению, по меньшей мере, одного маркера в пределах 10 сМ маркерного интервала от M4 до M5 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS. Еще одна цель изобретения относится к применению маркеров M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 и/или M11 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS.

Для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS могут использоваться следующие маркеры: M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 или M11 или их комбинация. В предпочтительном варианте осуществления изобретения для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS могут использоваться следующие маркеры: M4, M5, M6 и/или M7. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS, может использоваться маркер M4.

Кроме того, для идентификации растений с локусом устойчивости к киле CrS и с низким содержанием эруковой кислоты могут использоваться маркеры, фланкирующие локус устойчивости к киле CrS с левой стороны. Маркеры, которые могут использоваться для идентификации растений с локусом устойчивости к киле CrS и с низким содержанием эруковой кислоты, могут представлять собой маркер M3, не содержащий донорного аллеля, M2, не содержащий донорного аллеля, или маркер M1, не содержащий донорного аллеля.

В соответствии с еще одним аспектом предоставляется способ защиты группы культурных растений по настоящему изобретению на поле, на котором осуществляют борьбу с сорняками путем внесения композиции, содержащей один или более гербицидно активных ингредиентов. В соответствии с еще одним аспектом указанные растения содержат ген, придающий устойчивость к глюфосинату или глюфосинату аммония, или ген, придающий устойчивость к глифосату, а гербицидом является глюфосинат или глюфосинат аммоний или глифосат.

Гибридные семена растений по изобретению могут быть получены путем скрещивания двух инбредных родительских линий, при этом одна из инбредных родительских линий содержит гены устойчивости к киле CrS по изобретению. Инбредная линия может содержать ген устойчивости к киле CrS в гомозиготной

форме. Гибрид может содержать ген устойчивости к киле CrS в гетерозиготной форме. Для получения чистых гибридных семян одна из родительских линий имеет мужскую стерильность и опыляется пыльцой другой линии. Чистые гибридные семена получают путем рядового выращивания родительских линий и сбора только семян F1 родительского растения с мужской стерильностью. Для создания родительских линий с мужской стерильностью может использоваться система в соответствии с описанием в публикации EP 0,344,029 или US 6,509,516, в этой системе ген, кодирующий фитотоксический белок (барназу), экспрессируется под контролем промотора, специфичного для тапетума, такого как TA29, обеспечивая селективное разрушение клеток тапетума. Трансформация растений химерным геном рТА29: с использованием барназы получают растения, у которых образование пыльцы полностью подавлено [Mariani *et al.* (1990), *Nature* **347**: 737-741]. Цитохимический и гистохимический анализ развития пыльников растений *Brassica napus*, содержащих химерный ген рТА29-барназы, описан в публикации De Block and De Brouwer [(1993), *Planta* **189**:218-225]. Для восстановления фертильности в потомстве растения с мужской стерильностью растение с мужской стерильностью (родитель МС) скрещивают с трансгенным растением (родитель ВФ), несущим ген восстановления фертильности, который при экспрессии способен ингибировать или предотвращать активность гена мужской стерильности [Патенты США №№ 5,689,041; 5,792,929; De Block and De Brouwer, выше]. Использование корегулирующих генов при получении растений с мужской стерильностью для увеличения частоты трансформантов, обладающих хорошими агрономическими показателями, описано в WO96/26283. Как правило, когда стерильная ДНК кодирует барназу, корегулирующая ДНК будет кодировать барстар, предпочтительно использовать оптимизированный ген barstar в соответствии с описанием в заявке на патент PCT WO 98/10081. Очевидно, что для управления экспрессией барназы с целью придания растению мужской стерильности могут использоваться различные промоторы. Аналогичным образом, барстар может быть функционально связан с различными промоторами, такими как 35S из вируса мозаики цветной капусты.

Растения с мужской стерильностью также могут быть получены с использованием других методов, таких как системы цитоплазматической мужской стерильности/восстановления [например, система Ogura, опубликованная патентная

заявка США 20020032916, US 6,229,072, WO97/02737, US 5,789,566 или система Polima в US 6,365,798, WO98/54340 или Kosena система в WO95/09910, US 5,644,066].

Родитель с мужской стерильностью (МС) или родитель-восстановитель фертильности (ВФ) или оба родителя могут содержать гены устойчивости к киле CrS по изобретению. Это может быть достигнуто путем введения генов устойчивости к киле CrS в элитную линию *B. napus* и последующего введения характеристики мужской стерильности (МС) или восстановления фертильности (ВФ). В качестве альтернативы гены устойчивости к корням CrS могут быть введены непосредственно в родительскую линию МС или ВФ путем скрещивания растения, содержащего гены устойчивости к киле CrS, с родителем МС или с родителем ВФ. Гибридные семена F1, полученные в результате скрещивания родителя МФ и ВФ, впоследствии будут содержать гены устойчивости к киле CrS.

Для изобретения может использоваться выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая locus устойчивости к киле CrS, при этом указанный locus устойчивости к киле CrS локализован в интервале от M4 до M5. Изолированная молекула нуклеиновой в соответствии с описанием в настоящем документе может дополнительно характеризоваться тем, что она не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R.

В частности, способы и наборы по изобретению могут использоваться для определения присутствия локуса устойчивости к киле CrS. Присутствие локуса устойчивости к киле CrS может определяться с использованием, по меньшей мере, одного молекулярного маркера, при этом указанный молекулярный маркер связан с наличием локуса устойчивости к киле CrS в соответствии с определением в настоящем документе.

Могут предоставляться наборы, содержащие праймеры и/или зонды, специально разработанные для обнаружения маркерных аллелей по изобретению. Компоненты комплектов могут быть специально корректироваться для целей контроля качества (например, для контроля чистоты посевных серий), для детекции присутствия или отсутствия генов устойчивости к киле CrS в растительном материале или в материале, который содержит растительный материал или который был получен из растительного

материала, включая, помимо прочего, продукты питания или корма. Статус зиготности генов устойчивости к киле CrS может определяться с использованием альтернативных наборов праймеров и/или зондов, специфичных для локуса CrS и соответствующего локуса в восприимчивой линии *Brassica*.

Для изобретения может использоваться способ получения растений *Brassica*, на инфицированных килей, включающий следующие этапы: посев семян растений *Brassica* по изобретению, содержащих ген устойчивости к киле CrS, выращивание растений в поле, при необходимости, опрыскивание растений фунгицидами и сбор урожая.

Локус устойчивости к киле CrS по изобретению может использоваться для разработки молекулярных маркеров путем разработки праймеров, специфически распознающих последовательности в локусе устойчивости к киле CrS.

Также изобретением предоставляется способ получения пищевых продуктов, кормов, или промышленной продукции, который включает получение растения в соответствии с изобретением или его части и получение пищевых продуктов, кормов или промышленной продукции из указанного растения или его части. В соответствии с еще одной целью изобретения указанным пищевым продуктом или кормом является растительное масло, мука, зерно, крахмал или белок, или промышленной продукцией является биотопливо, волокно, химические вещества промышленного назначения, фармацевтический или нутрицевтический препарат.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения клетки растений по изобретению, т.е. клетки растений, содержащие ген устойчивости к киле CrS, а также клетки растений, полученные способами по изобретению, могут представлять собой не размножающиеся клетки.

Полученные растения по настоящему изобретению могут быть использованы в обычной схеме селекции для получения других растений с теми же характеристиками или для введения характеристик присутствия гена CrS по настоящему изобретению в другие сорта того же вида или в растения родственных видов или в гибридные растения. Полученные растения также могут использоваться для создания материала для размножения. Растения по настоящему изобретению также могут использоваться для получения гамет, семян (включая измельченные семена и жмых из семян), масла

из семян, зиготных или соматических зародышей, потомства или гибридов растений, полученных способами по настоящему изобретению. Также изобретение включает семена, полученные из растений по настоящему изобретению.

Все патенты, патентные заявки, публикации или публичные раскрытия сущности изобретения (включая публикации в Интернете), упомянутые или цитируемые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Перечень последовательностей, который находится в файле с названием "190202_ST25.txt" размером 5 килобайт (измерение размера файла осуществляли в ОС Microsoft Windows®), и который содержит xx последовательностей, с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 22, подан для регистрации вместе с настоящим документом путем подачи в электронном виде, указанный перечень включен в настоящую заявку посредством ссылки.

В описании изобретения и в разделе "Примеры" имеются ссылки на следующие последовательности:

SEQ ID No. 1:	5' фланкирующая последовательность Маркера 1
SEQ ID No. 2:	3' фланкирующая последовательность Маркера 1
SEQ ID No. 3:	5' фланкирующая последовательность Маркера 2
SEQ ID No. 4:	3' фланкирующая последовательность Маркера 2
SEQ ID No. 5:	5' фланкирующая последовательность Маркера 3
SEQ ID No. 6:	3' фланкирующая последовательность Маркера 3
SEQ ID No. 7:	5' фланкирующая последовательность Маркера 4
SEQ ID No. 8:	3' фланкирующая последовательность Маркера 4
SEQ ID No. 9:	5' фланкирующая последовательность Маркера 5
SEQ ID No. 10:	3' фланкирующая последовательность Маркера 5
SEQ ID No. 11:	5' фланкирующая последовательность Маркера 6
SEQ ID No. 12:	3' фланкирующая последовательность Маркера 6
SEQ ID No. 13:	5' фланкирующая последовательность Маркера 7
SEQ ID No. 14:	3' фланкирующая последовательность Маркера 7
SEQ ID No. 15:	5' фланкирующая последовательность Маркера 8

SEQ ID No. 16:	3' фланкирующая последовательность Маркера 8
SEQ ID No. 17:	5' фланкирующая последовательность Маркера 9
SEQ ID No. 18:	3' фланкирующая последовательность Маркера 9
SEQ ID No. 19:	5' фланкирующая последовательность Маркера 10
SEQ ID No. 20:	3' фланкирующая последовательность Маркера 10
SEQ ID No. 21:	5' фланкирующая последовательность Маркера 11
SEQ ID No. 22:	3' фланкирующая последовательность Маркера 11

Если не указано иное в примерах, все рекомбинантные технологии осуществляют согласно стандартным протоколам, как описано в "Sambrook J and Russell DW (изд.) (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е Издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Нью-Йорк" и в "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (изд.) (2006) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Нью-Йорк".

Стандартные материалы и источники информации описаны в публикации "Croy RDD (ed.) (1993) *Plant Molecular Biology LabFax*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford" и в "Brown TA, (1998) *Molecular Biology LabFax*, 2-е Издание, Academic Press, San Diego". Стандартные материалы и способы осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть найдены в "McPherson MJ and Møller SG (2000) *PCR (The Basics)*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford" и в "PCR Applications Manual, 3-е Издание (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim или www.roche-applied-science.com".

Очевидно, что может потребоваться корректировка некоторых параметров в любом лабораторном протоколе, например, в протоколах ПЦР в приведенных ниже примерах, для соответствия конкретным лабораторным условиям, а также может потребоваться незначительно модифицирование таких параметров для получения аналогичных результатов. Например, при применении другого способа получения ДНК или при выборе других праймеров в способе ПЦР необходимо подобрать другие оптимальные условия протокола ПЦР. Тем не менее, такие корректировки очевидны для специалистов, более подробная информация, относящаяся к таким корректировкам, приведена в действующих руководствах по применению ПЦР.

Примеры

1. Получение доноров, устойчивых к киле

Проводили скрининг на устойчивость к киле синтетического материала *Brassica napus*, полученного путем сегрегации, в камере для выращивания с использованием в качестве инокулята полевой смеси килы. Это позволило отобрать растения, обладающие устойчивостью, и охарактеризовать и назвать единственный присутствующий доминантный ген устойчивости CrS, из которого была разработана фиксированная линия методом двойных гаплоидов.

Инокулирование семян суспензией спор

Растения высевали в одноразовые пластиковые лотки на 36 ячеек, по одному растению на ячейку, и помещали в пластиковый контейнер без отверстий под ним, чтобы предотвратить утечку и снизить риск заражения. В каждом лотке пустую ячейку оставляли открытой для полива, чтобы растения получали воду через корни. Растения инокулировали суспензией спор путем осторожного капания суспензии спор на стебель сеянца у его основания через 5 – 7 дней после посева. Растения выращивали в камере для выращивания с температурным циклом 20/16 °C (день/ночь) и световом периоде 16 часов.

Оценка степени поражения заболеванием

Для оценки степени тяжести заболевания килы растения осторожно извлекали из почвы и производили оценку по шкале от 0 до 3 (Kuginuki et al., 1999; Xue et al., 2008), через 4-6 недель после инокуляции: 0 = отсутствие наростов, 1 = несколько малых наростов (малые наросты на <1/3 корней), 2 = умеренное образование наростов (наросты малого–среднего размера на 1/3 - 2/3 корней) и 3 = сильное образование наростов (наросты среднего–крупного размера на >2/3 корней). Затем производился расчет индекса заболевания (ID) по формуле, описанной в публикации Horiuchi and Hori (1980), с модификациями, описанными в публикации Strelkov et al. (2006):

$$ID(\%) = \frac{\sum(n \times 0 + n \times 1 + n \times 2 + n \times 3)}{N \times 3} \times 100\%$$

где: n – количество растений в классе; N – общее количество растений в экспериментальной единице; 0, 1, 2 и 3 – классы тяжести симптомов. Считалось, что растения с баллом 0 и 1 обладают фенотипом устойчивости, а растения с баллом 2 и 3 – фенотипом восприимчивости.

Были отобраны девять устойчивых растений, которые использовали в качестве доноров в методе ДГ, для переноса гена устойчивости к киле CrS (Таблица 1).

Таблица 1. Результаты скрининга отдельных растений в камере для выращивания.

РАСТЕНИЕ	Кила крестоцветных (шкала от 0 до 3)*	Комментарии
CrS-1	0	Для доноров в методе ДГ
CrS-2	3	Исключен
CrS-3	0	Для доноров в методе ДГ
CrS-4	0	Для доноров в методе ДГ
CrS-5	1	Для доноров в методе ДГ
CrS-6	1	Для доноров в методе ДГ
CrS-7	1	Для доноров в методе ДГ
CrS-8	1	Для доноров в методе ДГ
CrS-9	1	Для доноров в методе ДГ
CrS-10	0	Для доноров в методе ДГ
CrS-11	3	Исключен
CrS-12	3	Исключен
CrS-13	3	Исключен
CrS-14	3	Исключен
CrS-15	2	Исключен
CrS-16	2	Исключен

*По шкале от 0 до 3, где; 0-1 = R (устойчивое растение) и 2-3 = S (восприимчивое растение).

Синтетический донор, растение *Brassica napus*, имеет высокое содержание эруковой кислоты и глюкозинолатов, что не соответствует стандарту качества канолы (который составляет <2% эруковой кислоты (C22:1) и <30 микромолей общих глюкозинолатов на грамм безмасляной муки воздушной сушки), что затрудняет прямое использование источника для коммерческого разведения.

Небольшую популяцию, полученную методом двойных гаплоидов из 9 обладающих устойчивостью CгS доноров, проверяли на устойчивость к киле в камере для выращивания с полевой смесью, и в качестве обладающего устойчивостью донора было выбрано 1 устойчивое растение, полученное методом ДГ. Семена, собранные с этого растения, образовали донорную линию, обладающую устойчивостью. Данные о качестве были взяты из этой партии семян:

Глюкозинолаты:	90,41 мкмоль/г
C22:1:	11.5%

Отобранные устойчивые растения, полученные методом ДГ, использовали в качестве донора для скрещивания растений ЯМР. Для растений ОМР донор происходит из того же исходного синтетического материала *Brassica napus*, полученного путем сегрегации.

1.1. Спектр устойчивости доноров к разным патотипам килы (*Plasmodiophora brassicae*)

Характеризация устойчивости донорной линии осуществлялась с использованием различных патотипов и полевых изолятов из Канады (с использованием выбранной устойчивой линии ДГ, описанной в параграфе 1) и Европы (Германия, Франция, Нидерланды и Великобритания, с использованием растений, полученных из исходного синтетического материала *Brassica napus*, полученного путем сегрегации в камерах роста) (Таблица 2).

Таблица 2. Реакция устойчивых доноров на патотипы канадской и европейской килы. Классификация патотипов для Канады приведена в публикации Williams (1966) *Phytopathology*, 56, 624–626. Классификация патотипов для Европы приведена в публикации Somé et al. (1996) *Plant Pathology*, 45, 432–439.

Патотип/Изолят	Регион	Донорная линия	Элитная женская линия скрещивания ЯМР	Элитная мужская линия скрещивания ЯМР	Элитная линия скрещивания ОМР
P2	Канада	R	S	S	NA
P3	Канада	R	S	S	NA
P5	Канада	R	S	S	NA
P6	Канада	R	R	S	NA
P8	Канада	R	S	S	NA
Смешанные патотипы	Канада	R	S	S	NA
P1+	Европа	R	NA	NA	S
P1-	Европа	R	NA	NA	S
P2	Европа	R	NA	NA	S
P3-	Европа	R	NA	NA	S
P5-	Европа	R	NA	NA	S
CR11 (Полевой изолят)	Европа	R	NA	NA	S
CR25 (Полевой изолят)	Европа	R	NA	NA	S
CR30 (Полевой изолят)	Европа	R	NA	NA	S
CR37 (Полевой изолят)	Европа	R	NA	NA	S
CR41 (Полевой изолят)	Европа	R	NA	NA	S

2. Создание картирующей популяции и молекулярная карта локусов устойчивости в отобранной донорной линии

Из исходного синтетического материала *Brassica napus*, полученного путем сегрегации, описанного в части 1, обладающее устойчивостью растение скрещивали с восприимчивой линией растений ОМР для получения картирующей популяции F2. Популяцию F2 использовали для картирования локуса устойчивости CrS. 279

отдельных растений F2 были фенотипированы на устойчивость к изоляту CR11 с использованием метода инокуляции в камере роста и генотипированы.

На хромосоме A08 (N08) был идентифицирован один QTL (Фиг. 1 и Таблица 3).

Таблица 3. Маркеры в интервале QTL для CrS.

Идентификатор маркера	Хромосома	Pop position (cM)	Значимость (-log ₁₀ (p-значение))	
M3	A08	53.144	45.89	Левый фланкирующий маркер
M4	A08	55.486	50.42	
M5	A08	55.671	50.43	Маркер пика
M6	A08	57.137	45.45	Правый фланкирующий маркер

По маркеру пика QTL был произведен анализ фенотипического распределения растений F2 в трех классах генотипирования (гомозиготное с аллелем рекуррентного родителя (AA) или донорным аллелем (BB) и гетерозиготное (AB)) (Ф. 2). По маркеру пика QTL гетерозиготные растения имеют такой же уровень устойчивости, что и гомозиготные растения по аллелю родителя-донора, что свидетельствует о доминантной устойчивости.

3. Разработка растений ЯМР качества канолы, обладающих устойчивостью к киле

Введение характеристики устойчивости к киле CrS в растение ЯМР осуществляли с использованием растения-донора ДГ, описанного в параграфе 1, по схеме возвратного скрещивания в сочетании с фенотипическим отбором на устойчивость против смеси P3, P5, P6 и P8 в равных частях, как показано на Фиг. 3.

Была получена линия BC3F3 с устойчивостью к широкому спектру различных патотипов килы. Тем не менее, в этой линии высокое содержание эруковой кислоты (Таблица 4), что показывает, что высокое содержание эруковой кислоты связано с устойчивостью к киле CrS. Уровни глюкозинолатов составляли 22,4 мкмоль/г.

Таблица 4. Устойчивость линии BC3F3 и уровни эруковой кислоты (%). RP1 – рекуррентный родитель, используемый в схеме на Фигуре 3 для BC3F3.

Фенотип	RP1	BC3F3	Проверка на восприимчивость
P3	S	R	S
P5	S	R	S
P6	R	R	S
P8	S	R	S
Смешанные патотипы	S	R	S
Эруковый (%)	0	12.92	0

Таблица 5. Полевой скрининг женских линий скрещивания с устойчивостью к киле CrS. Контроль: рекуррентный родитель. *По шкале от 0 до 3, где; 0-1 = R (устойчивое растение) и 2-3 = S (восприимчивое растение). **ID: индекс заболевания (%).

Пред.	Описание	Источник устойчивости	Оценка килы крестоцветных*	
			(0-3)*	ID**
1	Линия BC3F3	CrS-A08 гомозиготный	0	0
2	Линия BC3F3	CrS-A08 гомозиготный	0	0
1	Проверка (RP)	No CrS	3	100
2	Проверка (RP)	No CrS	3	100

Таблица 6. Полевой скрининг гибрида с устойчивостью к киле CrS в четырех местах в Альберте. **ID = индекс заболевания (%). Гибрид 1 и 2: гибрид без CrS. Гибрид 3: результат скрещивания BC3F3 с другой линией без CrS.

ГИБРИД	CR ИСТОЧНИК	Положение и ID**			
		Положение 1	Положение 2	Положение 3	Положение 4
Гибрид 1	No CrS	99	96	71	82

Гибрид 2	No CrS	96	96	70	75
Гибрид 3	CrS-A08 гетерозиготный	0	0	0	0.67

Линии скрещивания BC3F3 с устойчивостью к киле CrS в гомозиготном состоянии выращивали на поле с естественной инвазией килы (неизвестный состав патотипов), после чего проводили проверку на устойчивость. Результаты представлены в Таблицах 5 и 6.

Селекцию линии качества канолы осуществляли с помощью дополнительных возвратных скрещиваний (в BC5F2) путем устранения переноса балластного генетического материала, сцепленного с признаком высокого содержания эруковой кислоты, с использованием фенотипирования для эруковой кислоты и отбора по присутствию CrS с использованием подхода возвратного скрещивания с помощью маркеров и маркеров области QTL для CrS в соответствии со схемой на Фиг. 4, и путем скрининга устойчивости с использованием смеси односпорных патотипов, включая P2, P3, P5, P6 и P8.

Для определения параметров качества из отобранного растения BC5F2 была создана линия BC5F3 следующего поколения. В линии BC5F3 уровень глюкозинолатов составлял 12 мкмоль/г, а уровень эруковой кислоты составлял 0,8%. Таким образом, в поколениях BC5 было устранен перенос балластного генетического материала, сцепленного с признаком высокого содержания эруковой кислоты.

Новое растение ЯМР BC5F2 качества канолы, обладающее устойчивостью к киле, затем использовалось в качестве донора в программе интрогрессии признаков устойчивости к киле с использованием метода возвратного скрещивания с помощью маркеров (с использованием различных рекуррентных родителей) для отбора устойчивых линий, несущих более короткий фрагмент интрогрессии, как показано на схеме на Фиг. 5. Для фенотипирования поколений обратного скрещивания использовали смесь односпорных патотипов, включая P2, P3, P5, P6 и P8.

Были разработаны шесть линий интрогрессии BC3F3 с использованием различных рекуррентных родителей (от IL2 до IL7). Для рекуррентных родителей,

донорной линии (BC5F3, полученная из устойчивого растения BC5F2) и линий интрогрессии определялся спектр устойчивости. На таблице 7 показано, что донорная линия демонстрирует широкую устойчивость, и что все линии интрогрессии демонстрируют тот же спектр устойчивости, что и донорная линия. Кроме того, из линии интрогрессии IL4 (IL4 BC3F2) было выбрано одно растение BC3F2. Эта линия была получена из другого растения, чем растение IL4 BC3F3. Растение IL4 BC3F2 имеет тот же спектр устойчивости, что и растение IL4 BC3F3.

Для идентификации хромосомной области, необходимой для устойчивости к киле CrS, использовались маркеры. Растение IL4 BC3F3 содержало минимальное количество маркеров CrS с левой стороны, которые ограничивают хромосомную область, необходимую для устойчивости к киле CrS, с левой стороны. Растение IL4 BC3F2 содержало минимальное количество маркеров CrS с правой стороны, которые ограничивают хромосомную область, необходимую для устойчивости к киле CrS, с правой стороны. Данные о маркерах для растения-донора BC5F2 (обозначенного как IL1 в Таблице 8) и для линий интрогрессии показаны в Таблице 8.

4. Разработка растений ОМР качества канолы, обладающих устойчивостью к киле

Локус устойчивости CrS также был введен в элитную линию скрещивания ОМР по схеме, показанной на Фигуре 6. Как указывалось ранее, донорное растение происходит из того же исходного синтетического материала *Brassica napus*, полученного путем сегрегации, что и донор, используемый в схемах скрещивания растений ЯМР. Фенотипический отбор осуществляли с использованием изолята CR11 *Plasmiodiophora brassicae* в сочетании с отбором маркерного-донорного аллеля.

В поколении BC1F1 были получены линии с низким уровнем эруковой кислоты.

В Таблице 8 приведены данные о маркерах для линии интрогрессии BC1F1 (устойчивость к киле, низкое содержание эруковой кислоты) и для линии интрогрессии BC2F1 (устойчивость к киле, низкое содержание эруковой кислоты).

5. Положение локуса устойчивости CrS растений с низким содержанием эруковой кислоты на хромосоме A08

В Таблице 8 приведены маркеры, используемые для интрогрессии локуса устойчивости к киле в растение ОМР и растение ЯМР. Для каждого маркера указаны положение согласно общедоступному описанию генома в Darmor-*bzh* (версия 8.1, Bayer et al., 2017, Plant Biotech J. 15, стр. 1602) и генетическое положение на генетической карте растений ОМР F2 (в соответствии с описанием в параграфе 2). Учитывая порядок маркеров на основании их генетического положения на генетической карте F2, в Таблице 8 показано, что слева от локуса устойчивости для устойчивости не требуются маркеры M1 - M3 (см. IL4 для ближайшего маркера M3) и что справа для устойчивости не требуются маркеры M6 - M11 (см. IL4 BC3F2 для ближайшего маркера M6). Это показывает, что для обеспечения устойчивости к киле CrS достаточно маркерного интервала между маркером M3 и маркером M6 (или маркерного интервала от маркера M4 до маркера M5) на основе генетической карты F2.

При сравнении порядка маркеров на генетической карте растения ОМР F2 согласно описанию генома в Darmor-*bzh* (версия 8.1) обнаруживается несоответствие

для маркера M9. Для представления всей информации о генотипировании от различных обратных скрещиваний в растениях ОМР и ЯМР в Таблице 8 мы представили порядок маркеров, следующий за генетическим положением на генетической карте растений ОМР F2 (которая была построена с использованием тех же исходных родителей, что и для растений ОМР BC1F1 и BC2F1).

Кроме того, в Таблице 8 показано, что фрагмент такой длины, как фрагмент от маркера M4 до маркера M11 на основании генетической карты F2, можно использовать для получения устойчивости к киле в растениях без высокого содержания эруковой кислоты.

Растения, преобразованные в рекуррентного родителя на левой стороне маркера M4 (с использованием генетического положения маркеров в популяции F2), имели низкие уровни эруковой кислоты в семенах. Справа на конце хромосомы находится маркер M11, поэтому область, которая придает характеристику высокого содержания эруковой кислоты, не может быть расположена справа от M11. Это показывает, что область донора, которая придает характеристику высокого содержания эруковой кислоты, расположена слева от маркера M4. Чтобы получить растения с низким содержанием эруковой кислоты, область слева от маркера M4 должна происходить от рекуррентного родителя. Поскольку FAE1 является ключевым геном в биосинтезе эруковой кислоты в масличном рапсе, его положение в геноме *Darmor-bzh* проверялось с использованием номера доступа EU543282 в качестве запроса в системе BLAST и общедоступной структурной аннотации генома (Bayet et al, выше) для определения положения гена. Одна копия гена расположена на хромосоме A08 (что соответствует *BnaA08g11590D2* – положение 11,261,862 п.н. – 11,263,382 п.н. на геноме *Darmor-bzh*).

Семена *Brassica*, содержащие локус устойчивости к киле CrS, и характеристики низкого содержания эруковой кислоты, депонированы в NCIMB (NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Scotland, UK) 21 января 2019г., под номером доступа NCIMB 43341.

Таблица 8. Данные о маркерах устойчивых донорных линий, восприимчивого рекуррентного родителя и устойчивых линий с интрогрессией характеристики низкого содержания эруковой кислоты. Аннотация: маркерный аллель происходит от восприимчивого рекуррентного родителя (растения RP, RP4 или растения, не содержащие не CrS) или от устойчивой донорной линии (CrS). "-" указывается в случае, если анализ не проводился. n.i. означает "нет информации". Генотипы, отмеченные звездочкой: не определены в самой соответствующей линии, но получены из данных о другом поколении.

идентификатор гена (из структурной аннотации в Bayer et al. 2017)	идентификатор маркера	геном Dargmor-bzh хромосомы (v8.1)	положение генома Dargmor-bzh (v8.1), в bp	генетическая карта хромосомы (карта F2)	положение генетической карты (карта F2), в cM	OMP						ЯМР								
						Рекуррентный родитель (RP, восприимчивый)	Родитель-донор (устойчивый, с высоким содерж-ем эруковой к-ты)	BS1F1 (устойчивый, с низким содерж-ем эруковой к-ты)	Аннотация BS1F1	BS2F1 (устойчивый, с низким содерж-ем эруковой к-ты)	Аннотация BS2F1	Рекуррентный родитель (восприимчивый)	Родитель-донор (устойчивый, с высоким содерж-ем эруковой к-ты)	IL1 (BS5F2, устойчивый, с низким содерж-ем эруковой к-ты)	Аннотация IL1	Рекуррентный родитель 4 (RP4, восприимчивый)	IL4 (BS3F3, устойчивый, с низким содерж-ем эруковой к-ты)	Аннотация IL4 BS3F3	IL4 (BS3F2, устойчивый, с низким содерж-ем эруковой к-ты)	Аннотация IL4 BS3F2
	M1	A08	13,108,209	A08	48.66	CC	TT	CC	RP	CC*		CC	TT	CC	RP	CC	CC	Ноль CrS	-	
	M2	A08	12,499,060	A08	51.99	GG	AA	GG	RP	GG*		AA	AA	AA	n.i.	GG	AA	n.i.	AG	n.i.
<i>BnaA08g11590D2</i>		A08	11,261,862-11,263,382																	
	M3	A08	11,256,444	A08	53.14	GG	AA	ноль		-		GG	AA	GG	RP	GG	GG	Ноль CrS	--	
<i>BnaA08g10690D2</i>		A08	10,531,290-10,532,568																	
	M4	A08	10,369,430	A08	55.49	CC	AA	AC	CrS	AC	CrS	CC	AA	AA	CrS	CC	AA	CrS	AC	CrS
	M5	A08	10,375,744	A08	55.67	CC	TT	ноль		-		CC	TT	TT	CrS	CC	TT	CrS	--	
	M6	A08	9,801,311	A08	57.14	AA	GG	AG	CrS	AG	CrS	AA	GG	GG	CrS	AA	GG	CrS	AA	RP4
	M7	A08	9,699,466	A08	57.50	CC	TT	TC	CrS	TC	CrS	CC	TT	TT	CrS	CC	TT	CrS	CC	RP4
	M8			A08	58.77	TT	CC	--		-		TT	CC	CC	CrS	TT	CC	CrS	--	
	M9	A08	11,933,021	A08	59.14	CC	TT	--		-		CC	TT	TT	CrS	CC	CC	RP4	--	
	M10			A08	59.32	GG	AA	AG	CrS	GG	RP	GG	AA	AA	CrS	GG	GG	RP4	GG	RP4
	M11	A08	933,572	A08	66.98	GG	AA	AG	CrS	GG	RP	GG	AA	AA	CrS	GG	GG	RP4	--	

Таблица 9. Идентичность маркеров.

Идентификатор маркера	5' фланкирующая последовательность	Полиморфное основание в цстойчивом источнике	Полиморфное основание в восприимчивой линии	3' фланкирующая последовательность
M1	SEQ ID NO: 1	T	C	SEQ ID NO: 2
M2	SEQ ID NO: 3	A	G	SEQ ID NO: 4
M3	SEQ ID NO: 5	A	G	SEQ ID NO: 6
M4	SEQ ID NO: 7	A	C	SEQ ID NO: 8
M5	SEQ ID NO: 9	T	C	SEQ ID NO: 10
M6	SEQ ID NO: 11	G	A	SEQ ID NO: 12
M7	SEQ ID NO: 13	T	C	SEQ ID NO: 14
M8	SEQ ID NO: 15	C	T	SEQ ID NO: 16
M9	SEQ ID NO: 17	T	C	SEQ ID NO: 18
M10	SEQ ID NO: 19	A	G	SEQ ID NO: 20
M11	SEQ ID NO: 21	A	G	SEQ ID NO: 22

6. Валидация гена устойчивости к киле *CRR1a* в трансгенном подходе

Для определения положения гена устойчивости к киле *CRR1a* осуществляли BLAST-анализ (в соответствии с описанием в Hatakeyama et al (2013) PLoS One 8(1) e54745; номер доступа AB605024) согласно общедоступному геному *Darmor-bzh* (версия 8.1). С использованием общедоступной структурной аннотации генома (см. Bayer et al., выше), ген будет соответствовать гену *BnaA08g10690D2*, локализованному в интервале 10,531,290 – 10,532,568 п.н. на хромосоме A08. Это соответствует маркерному интервалу между маркером M3 и маркером M4 с учетом положения этих двух маркеров в геноме *Darmor-bzh* (см. таблицу 8).

Ген *CRR1a* (в соответствии с описанием в публикации Hatakeyama et al (2013) PLoS One 8(1) e54745; номер доступа AB605024) клонировался под контролем конститутивного промотора 35S и трансформировался в восприимчивые растения *Brassica napus*. Растения инфицировали изолятом CR6 *Plasmodiophora brassicae* в условиях теплицы. В целом, производилась оценка устойчивости к киле 4 трансгенных линий и их соответствующих сегрегационных линий.

Инокулят получали с использованием зараженных килей корней симптоматических растений из предыдущего эксперимента, которые хранили при -20 °C. Корни с симптомами заболевания гомогенизировали с помощью Polytron в 40 мл дистиллированной воды. Полученный гомогенат фильтровали через Miracloth, а затем центрифугировали (2000 g в течение 10 минут), чтобы удалить как можно больше растительных остатков. Полученный супернатант переносили в новую пробирку объемом 50 мл, и остаток проверяли под микроскопом. Наблюдались мелкие сферические споры, подтверждающие присутствие *P. brassicae* в инокуляте. Трансгенные растения возрастом 10 дней инокулировали путем погружения корней с использованием полученной суспензии спор или дистиллированной воды (имитационные инокуляции). Через 10 минут после погружения корней растения переносили в почву и выращивали в отдельных лотках. Оценку симптомов у растений осуществляли через 60 дней после инокуляции (дпи). В качестве контроля использовались две устойчивые линии скрещивания. Ни у одного растения с имитационной инокуляцией симптомы не наблюдались через 60 дпи. Как и ожидалось,

в двух контрольных линиях скрещивания не наблюдалось каких-либо симптомов и корней, пораженных килей.

У трансгенных линий с геном *CRR1a* наблюдались симптомы поражения корней килей.

Эти данные показывают, что гена *CRR1a* недостаточно для придания устойчивости к киле, к изоляту CR6.

Формула изобретения

1. Растение *Brassica*, содержащее <2% эруковой кислоты в масле семян и содержащее locus устойчивости к киле CrS в хромосомном сегменте, содержащем маркер M4.
2. Растение *Brassica* по п. 1, **отличающееся тем**, что указанный locus устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M5.
3. Растение *Brassica* по п. 1 или 2, **отличающееся тем**, что указанный locus устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M8.
4. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 3, **отличающееся тем**, что указанный locus устойчивости к киле CrS находится в хромосомном сегменте, содержащем маркерный интервал от маркера M4 до M11.
5. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 4, **отличающееся тем**, что указанное растение содержит маркерный аллель M4/R.
6. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 5, **отличающееся тем**, что указанное растение содержит маркерные аллели M4/R и M5/R, или указанное растение содержит маркерные аллели M4/R, M5/R, M6/R и M7/R.
7. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 6, **отличающееся тем**, что указанное растение не содержит маркерный аллель M3/R или M2/R, или M1/R, или их комбинацию.
8. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 7, **отличающееся тем**, что указанное растение представляет собой растение *Brassica napus* или *Brassica rapa*.
9. Растение *Brassica* по п. 8, которое представляет собой растение ОМР *Brassica napus* или растение ЯМР *Brassica napus*.
10. Растение *Brassica* по п. 9, которое представляет собой растение ОМР *Brassica napus*, **отличающееся тем**, что указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M7.

11. Растение *Brassica* по п. 9, которое представляет собой растение ЯМР *Brassica napus*, **отличающееся тем**, что указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M5.

12. Растение *Brassica* по п. 11, которое представляет собой растение ЯМР *Brassica napus*, **отличающееся тем**, что указанный хромосомный сегмент содержит маркерный интервал от маркера M4 до M8.

13. Растение *Brassica* по п. 12, **отличающееся тем**, что указанный хромосомный сегмент может быть получен из эталонных семян, депонированных в NCIMB под номером доступа NCIMB 43341.

14. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 13, которое обладает устойчивостью к патотипам *P. brassicae* P2, P3, P5, P6 или P8 или к изоляту CR11.

15. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 14, **отличающееся тем**, что указанное растение является гетерозиготным по указанному локусу устойчивости к киле.

16. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 14, **отличающееся тем**, что указанное растение является гомозиготным по указанному локусу устойчивости к киле.

17. Растение *Brassica* по любому из пп. 1 - 16, **отличающееся тем**, что указанное растение дополнительно содержит ген, придающий устойчивость к гербицидам.

18. Растение *Brassica* по п. 17, **отличающееся тем**, что указанный ген, придающий устойчивость к гербицидам, представляет собой ген, придающий устойчивость к глюфосинату или глюфосинату аммония, или ген, придающий устойчивость к глифосату.

19. Семена растений *Brassica* по любому из пп. 1 - 18.

20. Способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы:

- (a) идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS, по меньшей мере, с одним маркером в пределах 10 сМ от маркерного интервала от M4 до M5, и

- (b) отбор растения, содержащего указанный локус устойчивости к киле CrS.

21. Способ по п. 20, включающий идентификацию, по меньшей мере, одного растения *Brassica*, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R.

22. Способ по п. 20 или 21, **отличающийся тем**, что указанное растение *Brassica* идентифицируют с помощью маркеров в маркерном интервале от M4 до M5.

23. Способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий следующие этапы:

- (a) скрещивание первого растения *Brassica*, содержащего локус устойчивости к киле CrS со вторым растением; и
(b) идентификацию растения-потомка, содержащего, по меньшей мере, один маркер в пределах 10 сМ маркерного интервала от M4 до M5.

24. Способ по п. 23, включающий идентификацию растения-потомка, которое содержит, по меньшей мере, один маркер в маркерном интервале от M4 до M11 и не содержит маркерный аллель M3/R или не содержит маркерный аллель M2/R, или не содержит маркерный аллель M1/R.

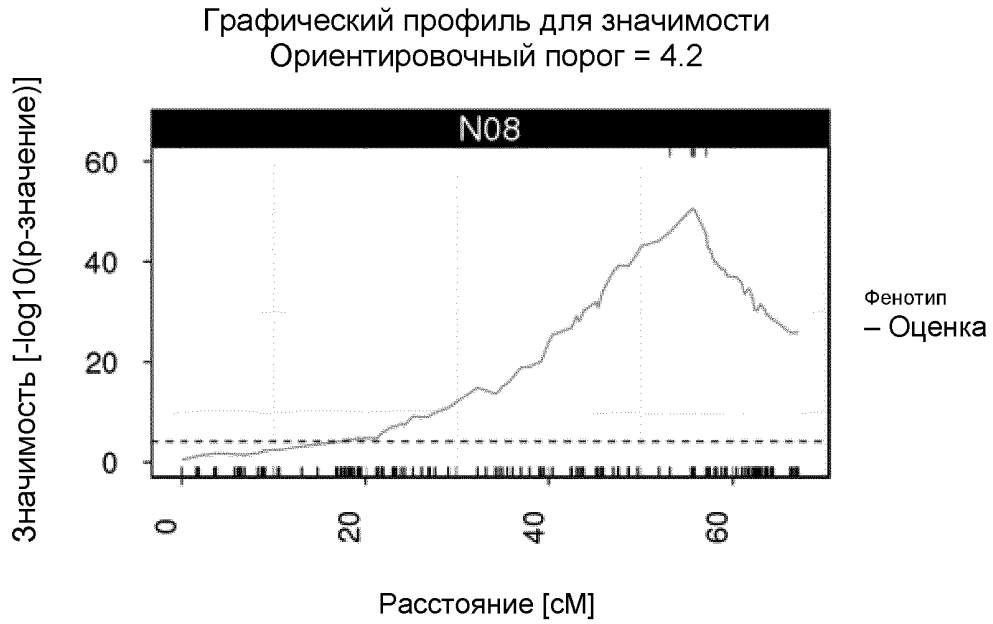
25. Способ получения растения *Brassica*, обладающего устойчивостью к киле, включающий введение локуса устойчивости к киле CrS в растение, не содержащее локус устойчивости к киле CrS, с использованием геномного редактирования.

26. Применение, по меньшей мере, одного маркера в пределах 10 сМ маркерного интервала от M4 до M5 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS.

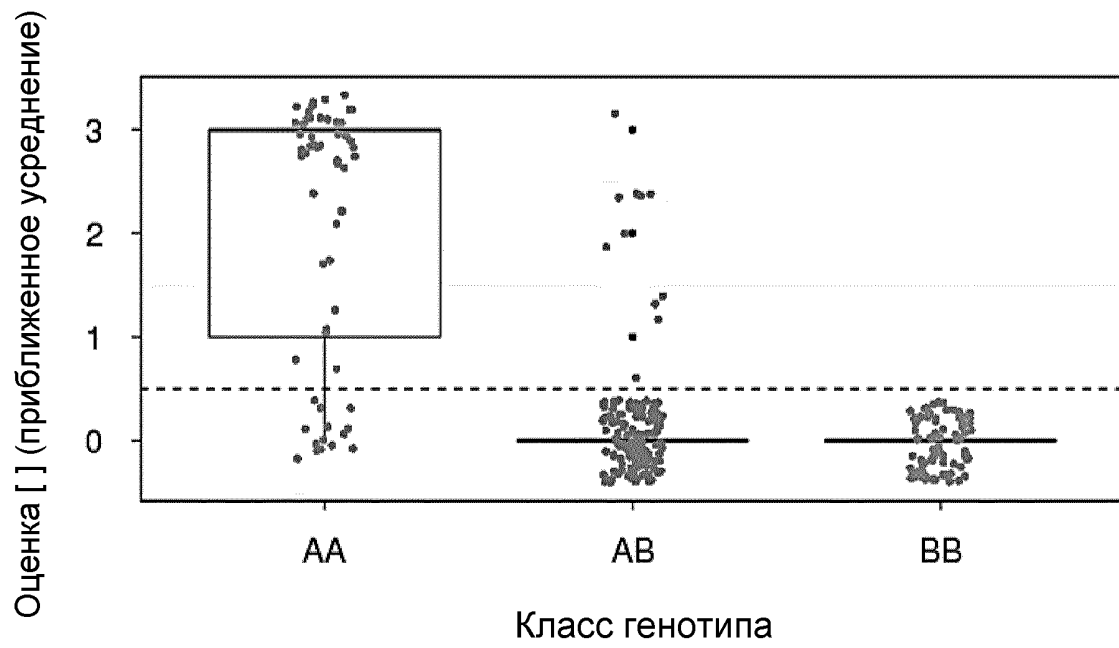
27. Применение маркеров M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10 и/или M11 для идентификации растения, содержащего локус устойчивости к киле CrS.

28. Способ защиты группы культурных растений по п. 17 или 18 на поле, **отличающийся тем**, что борьбу с сорняками осуществляют путем внесения композиции, содержащей один или более гербицидно активных ингредиентов.

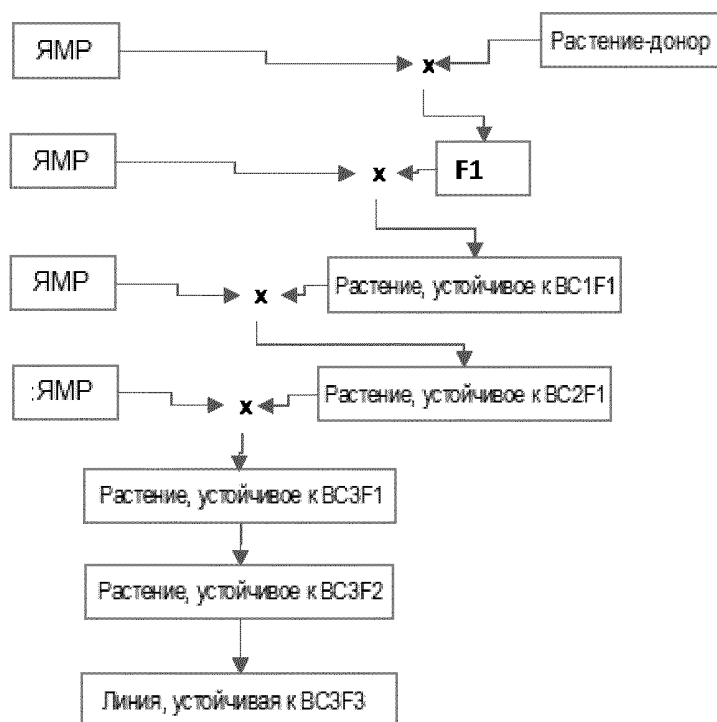
29. Способ по п. 28, **отличающийся тем**, что растения представляют собой растения по п. 18, а гербицид представляет собой глюфосинат или глюфосинат аммония или глифосат.



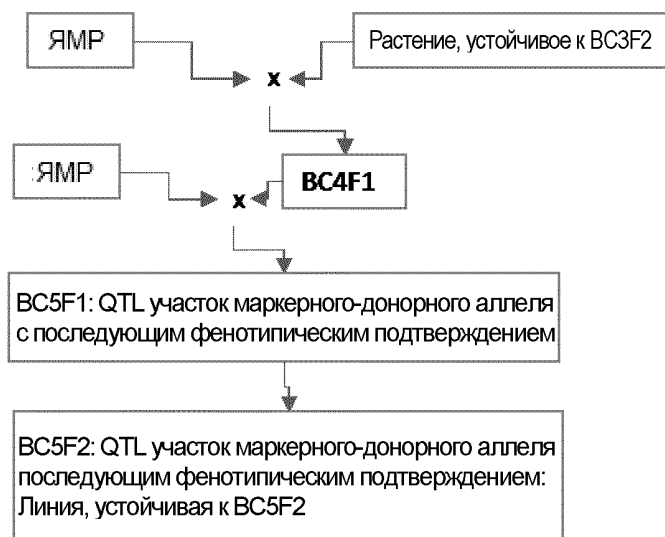
Фигура 1



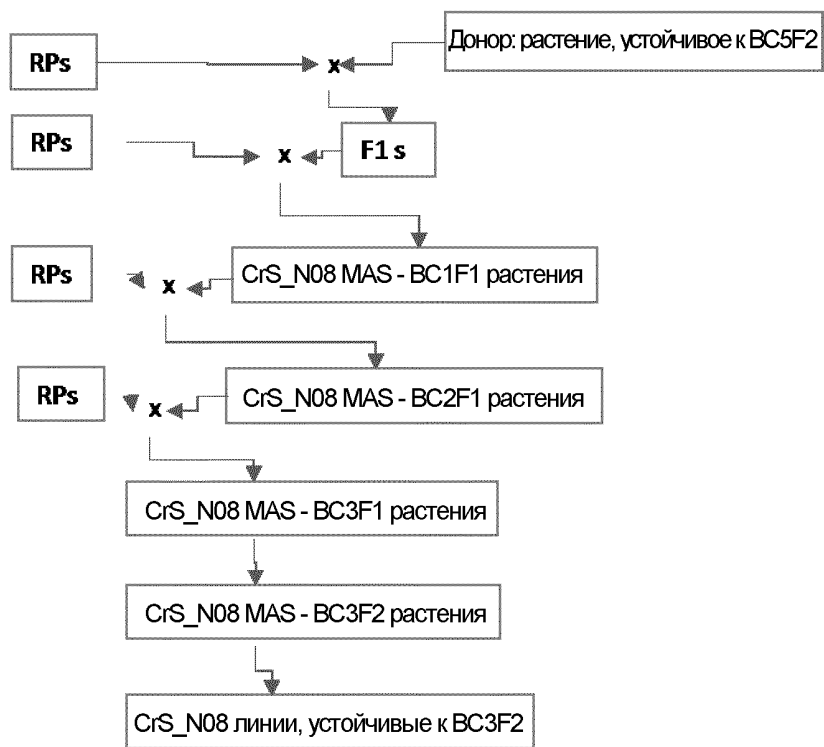
Фигура 2



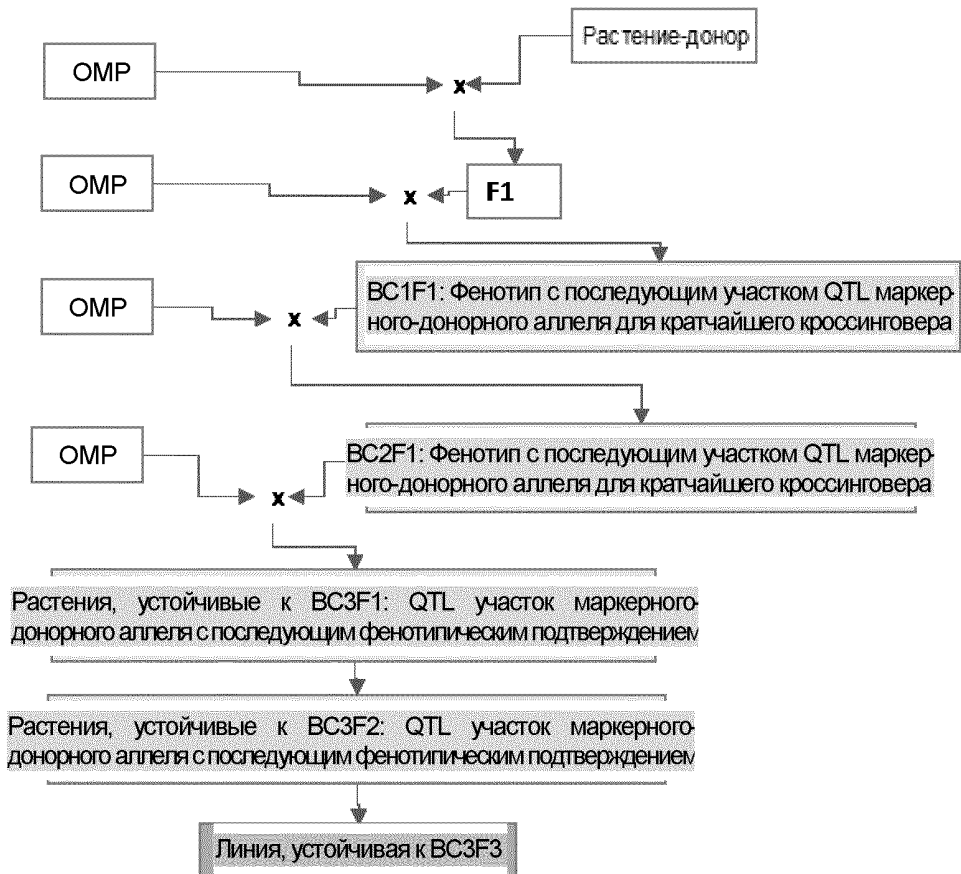
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6