

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391074** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.13

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12Q 1/6895 (2018.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.26

(54) **СПОСОБ ОТБОРА ИЛИ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЯ BRASSICA NAPUS, ОБЛАДАЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГРИБКОВОМУ ПАТОГЕНУ**

(31) **20204175.2**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.10.27**

Брейер Франк, Клойбер-Майтц

(33) **EP**

Моника, Оузунова Милена, Герц

(86) **PCT/EP2021/079733**

Андреас (DE)

(87) **WO 2022/090264 2022.05.05**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Зуйков С.А. (RU)

КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

(57) Изобретение относится к способу отбора или идентификации растения *V.napus* (рапс), обладающего устойчивостью к (*Phoma stem canker*) стеблевой язве *Phoma*, такой как устойчивость к грибковому патогену(ам) *L.maculans* и/или *L.biglobosa*, содержащему обнаружение в указанном растении *V.napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие по меньшей мере одного маркера, который находится на хромосомном интервале между SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 10. Настоящее изобретение также предлагает наборы праймеров для идентификации растения *V. napus*, обладающего устойчивостью к *Phoma stem canker*, такой как устойчивость к грибковому патогену(ам) *L.maculans* и/или *L.biglobosa*. Также предлагается использование маркера, определенного в настоящем документе, или последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-10, или набора праймеров по настоящему изобретению для отбора растения *V. napus*, обладающего устойчивостью к *Phoma stem canker*, такой как устойчивость к грибковому патогену(ам) *L.maculans* и/или *L.biglobosa*.

202391074

A1

A1

202391074

СПОСОБ ОТБОРА ИЛИ ИДЕНТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЯ *BRASSICA NAPUS*, ОБЛАДАЮЩЕГО УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГРИБКОВОМУ ПАТОГЕНУ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к области борьбы с грибковыми заболеваниями у *Brassica*, такой как *Brassica napus* (*B. napus*). Изобретение предлагает способ отбора или идентификации растений *Brassica*, таких как растения *B. napus*, обладающих устойчивостью к стеблевой язве Phoma (*Phoma stem canker*), вызываемой грибковым патогеном (патогенами) *Leptosphaeria maculans* (*L. maculans*) и/или *Leptosphaeria biglobosa* (*L. biglobosa*). Предлагаются средства обнаружения, такие как маркеры и праймеры для обнаружения присутствия, по меньшей мере, одного аллеля устойчивости у растений *Brassica*, таких как растения *B. napus*, или их частей, таких как ткани или семена. Изобретение также относится к способам получения растений *Brassica*, таких как растения *B. napus*, обладающих устойчивостью к *Phoma stem canker*, вызываемой грибковым патогеном (патогенами) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, а также к применению растений и семян и к способам по настоящему изобретению.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Phoma stem canker, также известная как черная ножка, вызываемая грибковым патогеном (патогенами) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, является основным заболеванием широкого спектра культур *Brassica*, включая *B. napus* L. (масличный рапс или канола) и *Brassica oleracea* (капуста), ежегодно приводящим к крупным экономическим потерям во всем мире, в частности в Европе, Австралии, Канаде и Северной Америке. *L. maculans* особенно опасен для *B. napus*, который используется во всем мире для производства растительного масла, биодизельного топлива и муки для рынков кормов для скота.

B. napus ($2n=38$, геном ААСС) представляет собой амфидиплоидный вид, возникший в результате спонтанной гибридизации *Brassica rapa* L. (син. *B. campestris*; $2n=20$, АА) и *Brassica oleracea* L. ($2n=18$, СС). *B. napus* содержит полные наборы хромосом этих двух диплоидных геномов.

Симптомы заражения *L. maculans* могут проявляться на семядолях, листьях, стручках и стеблях и включают прикорневые язвы на стеблях, небольшие серые поражения на листьях и корневую гниль. Большая часть потерь урожая была связана со стеблевой язвой.

Поражения листьев обычно развиваются после заражения аскоспорами, рассеянными ветром, и/или конидиоспорами, рассеянными водой (брызги). Симптомы на стеблях (или язвы) могут возникать в результате непосредственного заражения стеблей или в результате системного роста грибов из пораженных листьев, через сосудистую ткань в

стебель. Стеблевые язвы могут опоясывать стебель, что может привести к полеганию растений (изгибу стеблей вблизи уровня земли) и гибели растений. Менее серьезные язвы могут привести к ограничению поступления воды и питательных веществ, что, в свою очередь, может привести к сморщиванию семян и стручков. Заражение стручков может привести к преждевременному растрескиванию стручков и заражению семян.

Производство устойчивых к *Phoma stem canker* культур *Brassica*, таких как сорта *B. napus*, является одной из основных целей программ селекции культур по всему миру. Хотя для снижения потерь урожая, вызванных грибковой инфекцией, в настоящее время используются как химические способы борьбы, такие как распыление фунгицидов, так и культурные способы, такие как ротация севооборота, считается, что наиболее надежным и, вероятно, наиболее экологически безопасным способом борьбы на сегодняшний день является генетическая устойчивость. Генетическая устойчивость может быть обусловлена генами с устойчивостью, специфичной для расы (качественная устойчивость; R), и/или генами с устойчивостью, неспецифичной для расы (количественная устойчивость; QR).

Устойчивость, опосредованная геном R, обычно соответствует классической гипотезе "от гена к гену" и обладает основными аллельными эффектами, которые могут быть эффективно и точно испытаны на стадии семядоли. Однако последовательный ответ устойчивости может быть не обнаружен, когда растения выращивают в естественных полевых условиях, при постоянном воздействии поступающего инокулята от различных рас грибковых патогенов, таких как *L. maculans*. QR обычно контролируется несколькими генами с меньшим аллельным эффектом, однако эти QR-аллели могут вместе придавать более стабильную устойчивость на стадии взрослого растения в полевых условиях.

У видов *Brassica* было зарегистрировано около девятнадцати локусов устойчивости, и из них примерно одиннадцать генов (гены устойчивости к *L. maculans* (*Rlm*): *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7*, *Rlm9*, *Rlm 11* и *LepR1*, *LepR2*, *LepR3* и *LepR4*), как полагают, происходят из генома *A. B. napus* и *Brassica rapa*.

Отсутствие подходящей устойчивости, обнаруженной у *B. napus* (геном AACC), и постоянная угроза снижения устойчивости при широком применении устойчивого сорта в течение более длительных периодов времени вынуждают селекционеров искать альтернативные источники устойчивости. Основное внимание в исследованиях уделялось идентификации и передаче аллелей устойчивости от родственных видов *Brassica*, таких как *B. rapa* (AA), *B. oleracea* (CC), *B. nigra* (геном BB), *B. juncea* (геном AABB) и *B. carinata* (BVCC).

Одним из генетических подходов к обеспечению устойчивости было создание синтетических линий *B. napus* путем межвидовой гибридизации двух диплоидных видов

(геномы AA и CC) и последующего культивирования эмбрионов *in vitro* и удвоения хромосом. Устойчивость к черной ножке была введена в *B. napus*, таким образом путем получения синтетических растений *B. napus* из диких сортообразцов *B. rapa* (геном AA) [Крауч и соавт., (1994), Селекция растений 112: 265-278] и диких сортообразцов *B. atlantica* (геном CC) [Митен и Маграт (1992), Селекция растений 108: 60-68, и Митен и Херрон (1991), Материалы 8-го Международного конгресса по рапсу].

Среди серий синтетических линий *B. napus* с общим геномом C, но с разными геномами A две линии были обнаружены устойчивыми к изолятам грибов в ходе испытаний в теплице (испытания на семядоли и листья), однако синтетические линии, полученные от указанных линий и их гибридов F1 с сортами масличного рапса, показали высокую устойчивость к черной ножке в экспериментах в теплице. Только одна из этих линий также продемонстрировала устойчивость в полевых экспериментах в Англии и Австралии.

Кроме того, синтетические линии *B. napus*, описанные Краучем и Митеном (см. выше), не были коммерчески пригодны, поскольку они содержали высокие уровни глюкозинолатов, высокие уровни эруковой кислоты, имели низкую фертильность и страдали от самонесовместимости.

В другом примере сорт *B. napus* с открытым опылением Surpass400 был выведен на рынок компанией Pacific Seeds в 2000 году в Австралии. В то время он получил национальный рейтинг устойчивости к черной ножке 9,0 (Australia Blackleg Rating: ABR, Ассоциация канолы Австралии), что является самым высоким известным уровнем устойчивости. Surpass400 представляет собой синтетический *B. napus*, полученный в результате межвидового скрещивания дикого *B. rapa* ssp *sylvestris* с Сицилии и *B. oleracea* ssp *alboglabra*, и сообщалось, что у Surpass400 присутствовал основной доминантный аллель устойчивости к черной ножке на стадии прорастания.

Однако к началу 2003 года появились сообщения о снижении устойчивости Surpass400, указывающие на то, что всего за три года развился более вирулентный штамм гриба.

В другом примере генетической устойчивости Ю и соавт., Theor Appl Gent 2005 марта; 110(5):969-79 сообщалось о локусах устойчивости в популяциях *B. napus*. Первый локус был нанесен на карту в группе сцепления N02 и был обозначен как *LepR1*, а второй локус был нанесен на карту в группе сцепления N10 и был обозначен как *LepR2*. *LepR1* и *LepR2* были первоначально идентифицированы в запатентованных линиях скрещивания *B. napus* DHP95 и DHP96, соответственно. Третий локус, *LepR3*, был идентифицирован у сорта *B. napus* Surpass 400.

При постоянном риске нарушения генетической устойчивости в результате

изменений в популяции патогена, желательного селекционерам идентифицировать новые генетические источники и маркеры устойчивости, способы их переноса в сорта с высокими агрономическими показателями и способы повышения долговечности устойчивости.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично, на определении авторами изобретения гаплотипа устойчивости *LepRI* и маркеров, сцепленных с указанным гаплотипом.

До настоящего изобретения селекционерам было доступно только несколько простых повторов последовательностей (SSR) маркеров, ассоциированных с устойчивостью *LepRI* к грибковому патогену (патогенами) *L. maculans* и/или устойчивостью *L. biglobosa*. Применение этих SSR-маркеров для идентификации растений с устойчивостью было экономически неэффективным для селекционеров и зачастую приводило к тому, что растения имели плохие негативные агрономические и/или фенотипические свойства, вызванные сцепленным грузом.

Например, см. Фигуру 1, на которой показана генетическая карта, содержащая четыре SSR на хромосоме A02 и *LepRI*. Размер области-мишени *LepRI*, основываясь на общедоступном геномном справочнике Darmor v.4.1 на тот момент, составлял около 6 Мб.

Применение маркеров согласно настоящему изобретению позволяет уменьшить область-мишень *LepRI*, ассоциированную с устойчивостью, с примерно 6 Мб до примерно 90 т.о.

Таким образом, настоящее изобретение предлагает маркеры, которые позволяют отбирать и/или идентифицировать растения, обладающие устойчивостью к Phoma stem canker и сниженным сцепленным грузом. Преимущественно, настоящее изобретение позволяет получать и/или отбирать, или идентифицировать растения *B. napus*, обладающие устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, которые сохраняют коммерчески приемлемые агрономические и/или фенотипические свойства. Например, настоящее изобретение может обеспечить получение и/или отбор, или идентификацию растений, обладающих сниженными отрицательными агрономическими свойствами или вообще не обладающих отрицательными агрономическими свойствами, вызванными сцепленным грузом.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker, вызываемой грибковыми патогенами, такими как *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, содержащий обнаружение у указанного растения *B. napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного маркера, который

находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10.

Соответственно, указанный, по меньшей мере, один маркер может находиться на хромосомном интервале между SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 9.

Соответственно, указанный, по меньшей мере, один маркер может находиться на хромосомном интервале между SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 8.

Соответственно, указанный, по меньшей мере, один маркер может находиться на хромосомном интервале между SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 7.

Соответственно, указанный, по меньшей мере, один маркер может находиться на хромосомном интервале между SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6.

Соответственно, способ может содержать обнаружение, по меньшей мере, одного аллеля из следующих:

a) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 1 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га24982s01);

b) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 2 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74607s01);

c) аллель C/G в пределах SEQ ID No: 3 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74625s01);

d) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 4 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74605s01);

e) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 5 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74601s01);

f) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 6 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74589s02);

g) аллель C/T в пределах SEQ ID No: 7 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га74593s01);

h) аллель G/T в пределах SEQ ID No: 8 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га25028s01);

i) аллель A/G в пределах SEQ ID No: 9 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га25042s01); и/или

j) аллель G/T в пределах SEQ ID No: 10 (этот аллель также именуется в настоящем документе как га25063s01); Предпочтительно, чтобы был обнаружен нуклеотид или соответствующий аллель, который ассоциирован с устойчивостью. В связи с этим следует понимать, что способ согласно настоящему изобретению охватывает обнаружение, по меньшей мере, одного аллеля из следующих:

a) аллель у или аллель с в га24982s01 в соответствии с SEQ ID No: 1

- b) аллель у или аллель t в ra74607s01 в соответствии с SEQ ID No: 2
- c) аллель s или аллель g в ra74625s01 в соответствии с SEQ ID No: 3
- d) аллель у или аллель t в ra74605s01 в соответствии с SEQ ID No: 4
- e) аллель у или аллель t в ra74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5
- f) аллель у или аллель с в ra74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6
- g) аллель у или аллель с в ra74593s01 в соответствии с SEQ ID No: 7
- h) аллель k или аллель t в ra25028s01 в соответствии с SEQ ID No: 8
- i) аллель r или аллель g в ra25042s01 в соответствии с SEQ ID No: 9
- j) аллель k или аллель g в ra25063s01 в соответствии с SEQ ID No: 10

Этот способ может включать обнаружение

a) нуклеотида или аллеля с в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 1

b) нуклеотида или аллеля t в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 2

c) нуклеотида или аллеля g в положении аллеля или нуклеотида s, как указано в SEQ ID No: 3

d) нуклеотида или аллеля t в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 4

e) нуклеотида или аллеля t в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 5

f) нуклеотида или аллеля с в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 6

g) нуклеотида или аллеля с в положении аллеля или нуклеотида у, как указано в SEQ ID No: 7

h) нуклеотида или аллеля t в положении аллеля или нуклеотида k, как указано в SEQ ID No: 8

i) нуклеотида или аллеля g в положении аллеля или нуклеотида r, как указано в SEQ ID No: 9

j) нуклеотида или аллеля g в положении аллеля или нуклеотида k, как указано в SEQ ID No: 10.

Обнаружение может включать маркер, указанный выше (например, маркер ra24982s01 для обнаружения, как описано в пункте a) и так далее). Применение соответствующих праймеров - это возможность применения маркеров в контексте способа. Соответствующие праймеры, представляющие маркеры, раскрыты в настоящем документе в другом месте. Праймеры могут быть помечены, химически модифицированы или

дополнены, как описано в настоящем документе. Технические параметры в соответствии с этим пунктом могут быть применены в способе сельскохозяйственного культивирования и могут быть применены в способе борьбы с *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*.

Соответственно, указанный способ может содержать обнаружение в указанном растении *B. napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один маркер находится на первом хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на втором хромосомном интервале между SEQ ID No: 10 и ga74589s02 SEQ ID No: 6.

Соответственно,

а) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на первом хромосомном интервале между SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на втором хромосомном интервале между SEQ ID No: 9 и SEQ ID No: 6; и/или,

б) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на первом хромосомном интервале между SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на втором хромосомном интервале между SEQ ID No: 8 и SEQ ID No: 6; и/или,

в) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на первом хромосомном интервале между SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на втором хромосомном интервале между SEQ ID No: 7 и SEQ ID No: 6; и/или,

д) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на первом хромосомном интервале, определенном SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на втором хромосомном интервале, определенном SEQ ID No: 6.

Соответственно, указанное растение *B. napus* может быть получено путем интрогрессии LepR1 из растения-донора в растение-реципиент *B. napus* для получения интрогрессированного растения *B. napus*.

Соответственно, указанное растение-донор может обладать устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*.

Соответственно, указанное интрогрессированное растение *B. napus* может обладать устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*.

Соответственно, указанным растением-донором может быть *Brassica rapa* subsp. *sylvestris*.

Соответственно, указанное растение-донор может быть диким родственником *B. napus*.

Соответственно, указанное интрогрессированное растение *Brassica* выбирают для события рекомбинации на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10. Событие рекомбинации может нести локус устойчивости или аллель устойчивости согласно настоящему изобретению или может быть ответственно за обмен генетическим материалом в одной или обеих фланкирующих областях локуса устойчивости или аллеля устойчивости.

Соответственно, указанное интрогрессированное растение *Brassica* выбрано для события рекомбинации на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10 и не сохраняет второй хромосомный интервал, полученный от растения-донора.

В одном аспекте, указанное растение *B. napus* или его часть, отобранное или идентифицированное способом согласно настоящему изобретению, обладающее устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, не проявляет никаких негативных агрономических свойств, вызванных сцепленным грузом.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает набор праймеров для идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*), содержащий:

а) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga24982s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 11, или праймер, содержащий SEQ ID No: 12, и праймер, содержащий SEQ ID No: 13; и/или

б) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga74607s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 14, или праймер, содержащий SEQ ID No: 15, и праймер, содержащий SEQ ID No: 16; и/или

с) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga74625s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 17, или праймер, содержащий SEQ ID No: 18, и праймер, содержащий SEQ ID No: 19; и/или

д) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga74605s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 20, или праймер, содержащий SEQ ID No: 21, и праймер, содержащий SEQ ID No: 22; и/или

е) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga74601s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 23, или праймер, содержащий SEQ ID No: 24, и праймер, содержащий SEQ ID No: 25; и/или

ф) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие

маркера ga74589s02, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 26, или праймер, содержащий SEQ ID No: 27, и праймер, содержащий SEQ ID No: 28; и/или

g) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga74593s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 29, или праймер, содержащий SEQ ID No: 30, и праймер, содержащий SEQ ID No: 31; и/или

h) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga25028s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 32, или праймер, содержащий SEQ ID No: 33, и праймер, содержащий SEQ ID No: 34; и/или

i) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga25042s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 35, или праймер, содержащий SEQ ID No: 36, и праймер, содержащий SEQ ID No: 37; и/или

j) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga25063s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 38, или праймер, содержащий SEQ ID No: 39, и праймер, содержащий SEQ ID No: 40.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает применение растения, выбранного способом согласно настоящему изобретению, для получения масла из масличного рапса или жмыха из масличного рапса.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает применение, по меньшей мере, одного маркера, как описано в настоящем документе (например, как определено в любом из пунктов 1-13), или маркера, выбранного из SEQ ID No: 1-10, или набора праймеров согласно настоящему изобретению, для отбора растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (например, устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*). В одном аспекте, указанное растение *B. napus* или его часть, отобранное или идентифицированное способом согласно настоящему изобретению, обладающее устойчивостью к Phoma stem canker (грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*), не проявляет никаких негативных агрономических и/или фенотипических свойств, вызванных сцепленным грузом. В этом отношении, настоящее изобретение охватывает такие растения, которые несут локус устойчивости или аллель устойчивости согласно настоящему изобретению и обеспечивают тот же урожай (например, то же количество ядер или ту же масличную массу), что и растения, которые не несут локус устойчивости или аллель устойчивости. Кроме того, настоящее изобретение также охватывает способы идентификации и/или отбора такого растения, как описано в настоящем документе.

Способы отбора, обнаружения или идентификации, описанные в настоящем документе, могут начинаться с этапа предложения растения, части растения, растительной

ткани или семени и могут продолжаться последующим этапом выделения ДНК из этого растения, части растения, растительной ткани или семени. Последующий этап обнаружения, или идентификации, может быть проведен по выделенной ДНК. Для этого могут быть применены маркеры обнаружения или идентификации, как описано в настоящем документе. Предпочтительно, применяют, по меньшей мере, один, по меньшей мере два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять или, по меньшей мере, шесть маркеров, как раскрыто в настоящем документе. Этап обнаружения или идентификации может включать создание передаваемых электронным способом и/или сохраняемых в электронном виде данных, представляющих обнаружение или идентификацию присутствия соответствующей молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности, или присутствия ДНК, или участка генома, которые подразумевают устойчивость согласно настоящему изобретению растению, содержащему обнаруженный или идентифицированный генетический материал. Данные могут храниться на машиночитаемом носителе. Способ может включать этап отбора устойчивого растения, на котором был идентифицирован или обнаружен соответствующий генетический материал. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, отбираются только те растения, которые являются гомозиготными по соответствующему генетическому материалу, придающему устойчивость. Генетический материал, придающий устойчивость, может представлять собой аллель, обнаруживаемый с помощью маркеров и способов, раскрытых в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 - показывает генетическую карту SSRs, спроецированную на физическую карту Damog v.4.1.

Фигура 2 показано тонкое картирование области-мишени хромосомы A02 для локуса устойчивости LepRI. В= аллель, не являющийся LepR1, G= статус гетерозиготного аллеля. Здесь рамка указывает область-мишень, в которой расположен ген, на основе рекомбинант, показанных на фигуре, в сравнении с устойчивостью и восприимчивостью (RES/SUS). Маркеры, показанные в рамке, могут быть применены для отбора растений, обладающих устойчивостью к грибам. Номера RA относятся к номерам внутренней обработки.

Фигура 3 показывает баллы (A) *L. maculans* и (B) *L. biglobosa* на наборе линий, несущих различные типы устойчивости.

Фигуры 4-43 показывают последовательности SEQ ID Nos 1-40, как описано ниже.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID No: 1: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую

маркер ra24982s01.

SEQ ID No: 2: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74607s01.

SEQ ID No: 3: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74625s01.

SEQ ID No: 4: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74605s01.

SEQ ID No: 5: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74601s01.

SEQ ID No: 6: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74589s02.

SEQ ID No: 7: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra74593s01.

SEQ ID No: 8: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra25028s01.

SEQ ID No: 9: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra25042s01.

SEQ ID No: 10: представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую маркер ra25063s01.

SEQ ID No: 11: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra24982s01.

SEQ ID No: 12: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra24982s01.

SEQ ID No: 13: представляет собой праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra24982s01.

SEQ ID No: 14: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra74607s01.

SEQ ID No: 15: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74607s01.

SEQ ID No: 16: представляет собой праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74607s01.

SEQ ID No: 17: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra74625s01.

SEQ ID No: 18: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74625s01.

SEQ ID No: 19: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74625s01.

SEQ ID No: 20: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra74605s01.

SEQ ID No: 21: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74605s01.

SEQ ID No: 22: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74605s01.

SEQ ID No: 23: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra74601s01.

SEQ ID No: 24: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74601s01.

SEQ ID No: 25: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74601s01.

SEQ ID No: 26: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74589s02.

SEQ ID No: 27: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74589s02.

SEQ ID No: 28: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74589s02.

SEQ ID No: 29: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra74593s01.

SEQ ID No: 30: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra74593s01.

SEQ ID No: 31: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74593s01.

SEQ ID No: 32: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra25028s01.

SEQ ID No: 33: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra25028s01.

SEQ ID No: 34: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra25028s01.

SEQ ID No: 35: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra25042s01.

SEQ ID No: 36: представляет собой праймер для обнаружения аллеля

устойчивости ra25042s01.

SEQ ID No: 37: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra25042s01.

SEQ ID No: 38: представляет собой праймер для обнаружения аллеля устойчивости ra25063s01.

SEQ ID No: 39: представляет собой праймер для обнаружения чувствительного аллеля ra25063s01.

SEQ ID No: 40: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra25063s01.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Устойчивость

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker.

Другими словами, растение *B. napus* обладает устойчивостью к грибковым патогенам, которые вызывают Phoma stem canker. Растение *B. napus* устойчиво к заболеванию Phoma stem canker.

"Phoma stem canker", также известная как "Черная ножка", является экономически важным заболеванием крестоцветных, включая *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea* и *B. rapa*. Два грибковых патогена образуют видовой комплекс, вызывающий Phoma stem canker: *L. maculans*, который ассоциируется с язвами, повреждающими основание стебля; и *L. biglobosa*, которая зачастую ассоциируется с менее повреждающими поражениями верхней части стебля.

Изоляты *L. biglobosa* зачастую встречаются в ассоциации с *L. maculans*, но их можно обнаружить независимо друг от друга. Изоляты черной ножки могут быть охарактеризованы на основе испытаний на патогенность и молекулярно-филогенетического анализа (см., например, З. Зу и соавт., Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 1668), который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Изоляты *L. maculans* могут быть отнесены к различным группам патогенности (PG), в зависимости от их специфического взаимодействия с сортами *B. napus* Westar, Galcier и Quinta [Менгисту и соавт., (1991), Plant Disease 75:1279-1282]. Изоляты PG4 вызывают спорообразующие поражения у всех трех сортов, в то время как изоляты PG3 вызывают реакцию устойчивости на семядолях Quinta, а изоляты PG2 вызывают реакцию устойчивости на семядолях Quinta и Glacier. Изоляты PG1 являются непатогенными у этих хозяев. Изоляты PG2, PG3 и PG4 именуются как "высокоагрессивные", или "высоковирулентные", или "сильно патогенные" изоляты, а изоляты PG1 обычно

именуются как "неагрессивные" или "невирулентные", или "слабо патогенные". Высокоагрессивная группа также отличается от слабоагрессивной группы выработкой токсинов (изоляты Tox⁺ против изолятов Tox^o). Было обнаружено, что изоляты Tox^o вызывают некроз сердцевины, не сопровождающийся внешними симптомами, и далее подразделяются на три группы: NA1, NA2 и NA3, и было высказано предположение, что изоляты NA1 преобладают в Европе, а изоляты NA2 более важны в Канаде.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к *to L. maculans*. Другими словами, растение устойчиво к заражению *L. maculans*. В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к *to L. biglobosa*. Другими словами, растение устойчиво к заражению *L. biblobosa*.

"Устойчивость к патогенам", "устойчивость к грибам" и "устойчивость к болезням" означают, что растение избегает или проявляет уменьшенные симптомы болезни, которые являются результатом взаимодействия растения с патогеном. Другими словами, предотвращается возникновение болезней растений у патогенов и ассоциированных с ними симптомов заболевания, или уменьшаются симптомы заболевания, вызываемые патогеном, такие как, например, уменьшение стресса и ассоциированных с ним потерь.

Используемый в настоящем документе термин "устойчивость к грибам" относится к повышенной устойчивости или толерантности к грибковому патогену, по сравнению с растением, которое не содержит, по меньшей мере, один из описанных в настоящем документе маркеров. Устойчивость может варьироваться от повышения толерантности к воздействиям грибкового патогена (например, частичного ингибирования патогена) до полной устойчивости, такой, что присутствие грибкового патогена не влияет на растение.

Термин "устойчивость" растений, содержащих определенный ген устойчивости или маркеры, как описано в настоящем документе, относится к уменьшению ущерба, причиняемого заражению грибами, по сравнению с ущербом, причиняемым контрольным растениям. Ущерб может быть оценен, например, по количеству и размеру симптомов на листьях, по частоте и тяжести симптомов на стебле, полеганию растений из-за заражения стебля.

В частности, уменьшение ущерба проявляется в уменьшении потерь урожая, когда растения выращивают в полевых условиях под давлением болезней, по сравнению с контрольными растениями. Такое уменьшение потерь урожая может, например, быть связано с тем фактом, что заражение, размножение, распространение или выживание гриба уменьшаются или предотвращаются у растений с повышенной устойчивостью.

Повышенная устойчивость может также относиться к растениям, которые полностью устойчивы, т.е. к растениям, на которых не обнаружено симптомов заболевания, или к растениям, которые получили самые высокие баллы устойчивости в имеющемся оценочном количественном анализе на черную ножку, например, Хангура *и соавт.* (2003, Министерство сельского хозяйства, Западная Австралия, Farmnote № 6/2003, ISSN 0726-934X), который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Повышенная устойчивость также может быть оценена с помощью биоанализов, проводимых в контролируемых условиях, таких как камеры для выращивания, но в идеале она подтверждается в полевых испытаниях, поскольку оценки контролируемой среды могут не отражать полевых условий. Это может быть связано с тем фактом, что в биоанализах обычно испытывают небольшое количество единичных споровых изолятов гриба, в то время как в полевых условиях существует гораздо большая вариабельность популяции патогена.

В одном аспекте, устойчивость измеряют в полевых условиях. Соответственно, способы согласно настоящему изобретению могут отбирать или идентифицировать растение *B. napus*, обладающее повышенной устойчивостью к *Phoma stem canker*, при выращивании в поле или в полевых условиях.

Например, устойчивость может быть измерена с применением системы баллов PG2 или системы баллов преждевременного созревания (PMR), описанной в Примере 2.

Например, используя систему баллов PG2, описанную в Примере 2, растение *B. napus*, имеющее, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению, может иметь уменьшение балла PG2, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70% или, по меньшей мере, на 80%, по сравнению с контрольными растениями или эквивалентными растениями, которые чувствительны к заражению (например, которые не имеют, по меньшей мере, одного маркера согласно настоящему изобретению и не имеют локуса устойчивости *LepRI* или гена устойчивости).

Растение *B. napus*, идентифицированное с помощью настоящего изобретения, может иметь балл устойчивости примерно 6,0 - 9,0 при измерении с помощью австралийского балла черной ножки (ABR) (Маркрофт *и соавт.*, Aust. J. Exp. Agric. 42: 587-594, что включено в настоящий документ в качестве ссылки). Например, при оценке устойчивости по шкале от 1,0 до 9,0, где 1,0 является наиболее чувствительным, а 9,0 является наиболее устойчивым фенотипом, растение, у которого нет, по меньшей мере, одного маркера согласно настоящему изобретению, может иметь балл менее 5, например, примерно от 1,0 до 2,0, при этом растение согласно настоящему изобретению может иметь балл, по меньшей

мере, пять, например, от 5,0 до 10 или от 5,0 до 8,0.

В одном аспекте, растение *B. napus*, идентифицированное способом согласно настоящему изобретению, обладающее устойчивостью к *Phoma stem canker*, имеет агрономически приемлемый урожай. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, урожай измеряется как масса ядра (центнеров на гектар).

Когда способ согласно настоящему изобретению используется для отбора или идентификации растений из программы селекции, способ позволяет идентифицировать потомство, которое обладает устойчивостью к *Phoma stem canker*, и которое имеет агрономически приемлемый урожай. Например, способ может быть применен для отбора потомства, которое будет иметь урожай, сравнимый с растением-реципиентом, например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% урожая растения-реципиента (при выращивании в аналогичных полевых условиях).

В одном аспекте, интрогрессированное (или обратнокрещенное) растение *B. napus*, идентифицированное способом согласно настоящему изобретению и обладающее устойчивостью к *Phoma stem canker*, имеет, по меньшей мере, агрономически приемлемый урожай, а это означает, что его можно выгодно использовать в сельском хозяйстве.

Следует понимать, что условия окружающей среды, такие как местоположение, погодные условия и давление заболевания, а также индивидуальное восприятие человека, оценивающего симптомы заболевания, могут оказывать влияние на балл устойчивости к черной ножке. Следовательно, специалисту в данной области техники будет понятно, что различия в этих факторах в сравнительных испытаниях должны быть сведены к минимуму.

Любые другие баллы устойчивости, известные в данной области техники, могут быть применены в соответствии с этим изобретением для сравнения растений по настоящему изобретению с контрольными растениями.

Повышенная или улучшенная устойчивость к грибам может относиться к повышенному уровню устойчивости к определенному грибковому патогену (такому как *L. maculans* и/или *L. biglobosa*) или к более широкому спектру грибковых патогенов.

В частности, настоящее изобретение относится к растениям *B. napus*, которые устойчивы к заражению грибковыми патогенами (такими как *L. maculans* и/или *L. biglobosa*), или которые обладают повышенной устойчивостью к заражению *L. maculans* и/или *L. biglobosa* в результате локуса *LepRI*.

Соответственно, указанные растения обычно проявляют повышенную устойчивость по сравнению с эквивалентными растениями, которые восприимчивы к заражению *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, поскольку у них отсутствует локус устойчивости *LepRI*.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или

идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью, которая ассоциирована с локусом *LepRI* или вызвана им.

Используемый в настоящем документе термин "локус" представляет собой положение, которое ген занимает на хромосоме.

"Локус *LepRI*" относится к положению в группе сцепления A02/на хромосоме, где расположен "ген устойчивости" к Phoma stem canker. В это определение включен фрагмент (или сегмент) геномной ДНК хромосомы, на которой расположен локус устойчивости *LepRI*.

Локус *LepRI*, упомянутый в настоящем документе, расположен в пределах хромосомного интервала, который соответствует интервалу между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10, например, между SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 9, например, между SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 8, например, между SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 7, например, между SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6. Соответственно, локус *LepRI*, упомянутый в настоящем документе, расположен в пределах хромосомного интервала, который соответствует интервалу между ra24982s01 и ra25063s01, например, между ra74607s01 и ra25042s01, например, между ra74625s01 и ra25028s01, например, между ra74605s01 и ra74593s01, например, между ra74601s01 и ra74589s02.

Другими словами, локус устойчивости *LepRI*, упомянутый в настоящем документе, расположен в пределах хромосомного интервала, который соответствует положениям с 17985071 по 18087922 эталонного генома Darmor v.4.1.

Сборка последовательности эталонного генома *B. napus* "Darmor-*bzh* версии 4.1 была опубликована в 2014 году; см., например, Чалхуб *и соавт.*, 2014 Science 345: 950-953, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки.

Другие опубликованные сборки генома *B. napus* включают Darmor-*bzh* v.8.1 и Taridor (оба описаны Байером *и соавт.*, (2017) 1027 Plant Biotechnol. J. 15 1602-1610); ZS11 (Сан *и соавт.*, (2017) Plant J. 92 452-468); и зимний сорт Express 617 (Ли *и соавт.*, (2020) Front Plant Sci. 11: 496), все из которых включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Специалист в данной области техники способен определить, соответствует ли хромосомный интервал указанным интервалам, используя способы, имеющиеся в данной области техники, например, с помощью инструментов выравнивания последовательностей и сравнения.

Используемый в настоящем документе "ген устойчивости" относится к последовательности ДНК, которая придает или ассоциирована с повышенной устойчивостью растения, предпочтительно, растения *B. napus*, к Phoma stem canker, по сравнению с растением, лишенным гена (генов) устойчивости или имеющим

нефункциональную (или инактивированную) форму гена (генов).

"*LepRI*" представляет собой "локус устойчивости к Phoma stem canker", который сцеплен с маркерами на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10, например, сцеплен с маркерами ra24982s01, ra74607s01, ra74625s01, ra74605s01, ra74601s01, ra74589s02, ra74593s01, ra25028s01, ra25042s01 и ra25063s01.

В одном аспекте, локус устойчивости *LepRI* или ген устойчивости *LepRI* может быть перенесен из растения-донора в растение-реципиент, такое как различные разновидности *B. napus*, и даже в различные виды растений *Brassica*, например, *B. juncea*, например, с применением молекулярных маркеров настоящего изобретения. Соответственно, перенос локуса или гена устойчивости *LepRI* может повысить устойчивость растения-реципиента к Phoma stem canker.

Растение *B. napus*, имеющее, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению, может обладать повышенной устойчивостью к Phoma stem canker, по сравнению с сопоставимым растением, таким как растение *B. napus*, у которого нет, по меньшей мере, одного маркера согласно настоящему изобретению.

Не желая ограничиваться теорией, описанные в настоящем документе маркеры сцеплены с локусом устойчивости *LepRI* или геном устойчивости *LepRI*; таким образом, растение *B. napus*, имеющее, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению, содержит локус устойчивости *LepRI* или ген устойчивости *LepRI* и обладает повышенной устойчивостью к Phoma stem canker, по сравнению с сопоставимым растением, таким как *B. napus*, которое не имеет, по меньшей мере, одного маркера согласно настоящему изобретению, и которое не содержит локус устойчивости *LepRI* или ген устойчивости *LepRI*.

Маркер

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker, содержащий обнаружение у указанного растения *B. napus* или его части (например, ткани или семени) наличие или отсутствие, по меньшей мере, одного маркера, описанного в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе "маркер" относится к молекулярному маркеру, который представляет собой измеримую генетическую характеристику с фиксированным положением в геноме, которая обычно наследуется менделевским способом, и которая может быть применена для картирования интересующего признака.

Природа маркера зависит от используемого молекулярного анализа и может быть обнаружена на уровне ДНК, РНК или белка.

Доступны многочисленные типы маркеров, включая, но не ограничиваясь ими, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP); микросателлиты, которые также называются SSR; маркерные экспрессируемые последовательности (EST) и SSR, полученные из последовательностей EST; полиморфизмы длин рестрикционных фрагментов (RFLP); случайная амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD) и полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP). Олигонуклеотиды или праймеры могут применяться в качестве маркеров при условии, что они могут быть применены для получения детектируемого сигнала (как, например, продукт амплификации). Кроме того, маркеры, праймеры и олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут быть соединены с флуоресцентным красителем для генерирования сигнала флуоресценции, например, при возбуждении светом соответствующей длины волны. Флуоресцентным красителем может быть флуорохром. Олигонуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут быть соединены с другими соединениями, которые подходят для генерации сигнала. Такие маркеры, праймеры или олигонуклеотиды не встречаются в природе и также не могут быть выделены из природы. Для получения таких меченых олигонуклеотидов выполняется следующее: ДНК может быть помечена биоортогонально. Для этого ДНК может быть помечена *in vivo* или *in vitro* аналогами нуклеозидов, которые, например, впоследствии могут быть соединены с флуорофором в результате реакции Штаудингера. В дополнение к этому, ДНК также может быть получена химическим путем посредством флуорофоров. Маркеры, праймеры и олигонуклеотиды могут быть помечены с помощью синтеза фосфорамидита с помощью флуорофоров, которые, например, применяются в QPCR (количественная ПЦР), секвенирования ДНК и гибридизации *in situ*. Кроме того, ДНК может быть сгенерирована ферментативно в ходе полимеразной цепной реакции (PCR) с помощью флуоресцентных нуклеотидов или помечена с помощью лигазы, или терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. ДНК также может быть обнаружена косвенно с помощью биотинилирования и флуоресцентного авидина. Для соединений, в качестве флуорофоров, помимо прочего, применяются флуоресцеин, флуоресцентные лантаниды, наночастицы золота, углеродные нанотрубки или квантовые точки. Одним из наиболее часто используемых флуоресцентных веществ является FAM (карбоксифлуоресцеин). Следовательно, настоящее изобретение охватывает олигонуклеотиды и, в частности, праймеры, которые обладают FAM-маркированием. FAM, предпочтительно, присутствует в виде 6-FAM, при этом – в зависимости от желаемой длины волны излучения и возбуждения – могут, однако, также применяться и другие

варианты FAM, например, 5-FAM. Примерами дополнительных флуоресцентных маркеров являются AlexaFluor, ATTO, Dabcyl, HEX, Rox, TET, Texas Red и Yakima Yellow. В зависимости от области применения праймеры или олигонуклеотиды могут быть снабжены модификациями оснований или сахарофосфатным остовом. Среди них, среди прочего, аминок-dT, азид-dT, 2-аминопурин, 5-Br-dC, 2'-дезоксиинозин (INO), 3'-дезоксид-А, С, G, 5-Met-dC, 5-OH-Met-dCN6-Met-dA и другие. Если необходимо применить методы картирования, соответствующие праймеры, олигонуклеотиды определяются применяемым методом картирования.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению является SNP-маркером (SNP - однонуклеотидный полиморфизм). SNP-маркеры обнаруживают нуклеотидные замены в одной паре оснований. SNP являются наиболее распространенными из молекулярных маркеров, поэтому обладают потенциалом для обеспечения высочайшего разрешения генетической карты. SNP могут быть проанализированы с еще более высокой производительностью, чем SSR, требуют небольшого количества ДНК и являются относительно недорогими системами. Доступно несколько методов генотипирования SNP, включая, но не ограничиваясь ими, гибридизацию, удлинение праймера, лигирование олигонуклеотидов, расщепление нуклеазами, минисеквенирование и кодируемые сферы.

Процесс или способ, описанный выше, касающийся полимеразной цепной реакции (ПЦР), может включать два аллель-специфичных прямых праймера (или их применение), и при этом этап обнаружения включает метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), при этом, присутствие, отсутствие или вид флуоресценции определяется датчиком. Сигнал датчика может быть преобразован в электронном виде и/или сохраняемые в электронном виде данные, представляющие обнаружение присутствия молекулы нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности. Кроме того, данные, передаваемые в электронном виде и/или сохраняемые в электронном виде, могут храниться на машиночитаемом носителе. Видом флуоресценции может быть ее цвет / длина волны или конкретный краситель, ответственный за флуоресценцию (например, FAM или HEX). Определение флуоресценции датчиком может представлять собой считывание конечной точки флуоресценции.

Под терминами "гибридизация" или "гибридизирование" следует понимать процесс, при котором одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты связывается с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени, то есть, образует с ней пары оснований. Стандартные методы гибридизации описаны, например, в работе Сэмбрук и соавт., Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство, 3-е изд.,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк, 2001. Предпочтительно следует понимать, что, по меньшей мере, 60% - более предпочтительно, по меньшей мере, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% и, особенно предпочтительно, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% - оснований молекулы нуклеиновой кислоты образуют спаривание оснований с цепью нуклеиновой кислоты, которая комплементарна в максимально возможной степени. Возможность такого отжига зависит от жесткости условий гибридизации. Термин "жесткость" относится к условиям гибридизации. Высокая жесткость присутствует, когда спаривание оснований усложняется; низкая жесткость присутствует, если спаривание оснований упрощается. Например, жесткость условий гибридизации зависит от концентрации соли или ионной силы и температуры. В целом, жесткость может быть увеличена путем повышения температуры и/или уменьшения содержания соли. Под термином "жесткие условия гибридизации" следует понимать такие условия, при которых гибридизация преимущественно происходит только между гомологичными молекулами нуклеиновых кислот. Термин "условия гибридизации", таким образом, относится не только к условиям, преобладающим при фактическом добавлении нуклеиновых кислот, но также и к условиям, преобладающим на следующих этапах промывки. Например, жесткие условия гибридизации представляют собой условия, при которых, преимущественно, гибридизируются только те молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют, по меньшей мере, 70% - предпочтительно, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей. Жесткими условиями гибридизации являются, например: гибридизация в 4 x SSC при температуре 65 °C и последующая повторная промывка в 0,1 x SSC при температуре 65 °C в общей сложности в течение приблизительно 1 часа. Гибридизация предпочтительно происходит в жестких условиях. Последовательности, которые гибридизируются в жестких условиях с локусом устойчивости, являются частью изобретения.

SNP могут быть применены для описания гаплотипа для любого конкретного генотипа. SNP-маркером может быть, например, маркер KASPAR, как описано в настоящем документе в другом месте.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению является SNP-маркером (SNP - однонуклеотидный полиморфизм).

SSR - это относительно короткие участки tandemно повторяющейся ДНК длиной 6 п.о. или менее. Полиморфизмы возникают из-за различия в количестве повторяющихся единиц. Изменение длины повтора может быть обнаружено путем создания ПЦР-праймеров для консервативных неповторяющихся фланкирующих областей. SSR хорошо

подходят для картирования и MAS (маркерная селекция), поскольку они мультиаллельны, кодоминантны, воспроизводимы и поддаются автоматизации с высокой производительностью. Оценка или маркерный генотип основаны на относительном размере амплифицированного фрагмента.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер согласно настоящему изобретению является FLP-маркером. (FLP - полиморфизм длины фрагментов)

Могут быть сгенерированы различные типы FLP-маркеров. Как правило, амплификационные праймеры применяются для генерации полиморфизмов длины фрагмента. Такие FLP-маркеры подобны SSR-маркерам, за исключением того, что область, амплифицируемая праймерами, обычно не является областью с высокой степенью повторов. Однако амплифицированная область, или ампликон, будет обладать достаточной вариабельностью среди зародышевой плазмы, зачастую из-за вставок или делеций, так что фрагменты, генерируемые амплификационными праймерами, могут быть различимы среди полиморфных индивидуумов.

Чтобы маркеры были полезными, они должны обнаруживать различия или полиморфизмы в контролируемой популяции. Для молекулярных маркеров это означает различия на уровне ДНК из-за различий в полинуклеотидных последовательностях (например, SSR, RFLP, SNP). Геномная вариабельность может иметь любое происхождение, например, вставки, делеции, дубликации, повторяющиеся элементы, точечные мутации, события рекомбинации или наличие и последовательность транспонируемых элементов. Молекулярные маркеры могут быть получены из геномных или экспрессируемых нуклеиновых кислот (например, EST). EST, как правило, хорошо сохраняются внутри вида, в то время как другие области ДНК (обычно некодирующие) имеют тенденцию накапливать полиморфизм и, следовательно, могут быть более вариабельными у индивидуумов одного и того же вида. Ряд молекулярных маркеров *Brassica* известен в данной области техники и опубликован или доступен из различных источников, таких как Информационный портал *Brassica* Института Эрлхэма.

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает зонды молекулярных маркеров для применения в способах согласно настоящему изобретению.

"Зонд молекулярного маркера" представляет собой последовательность или молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть применена для идентификации присутствия маркера или маркерного локуса, например, зонд нуклеиновой кислоты, который комплементарен последовательности маркерного локуса.

В некоторых аспектах, маркерный зонд относится к зонду любого типа, который способен различать (*то есть*, генотип) конкретный аллель, который присутствует в

маркерном локусе. Нуклеиновые кислоты "комплементарны", когда они специфически гибридизируются в растворе, например, в соответствии с правилами спаривания оснований по Уотсону-Крику.

Сообщается, что маркер "сцеплен" с геном, локусом или признаком или "ассоциирован с ним", если маркер и ген, локус или признак имеют большую ассоциацию в наследовании, чем можно было бы ожидать от независимого распределения, например, маркер и локус могут косегрегировать в сегрегирующей популяции и расположены на одной и той же хромосоме.

"Сцепление" относится к генетическому расстоянию маркера от локуса (или двух локусов, или двух маркеров друг от друга). Чем теснее сцепление, тем меньше вероятность того, что произойдет событие рекомбинации, которое отделит маркер от гена или локуса. Генетическое расстояние (расстояние на генетической карте) рассчитывается по частотам рекомбинации и выражается в сантиморганах (сМ).

Локусы или гены обычно считаются генетически сцепленными, если частота рекомбинации между ними составляет менее примерно 50%, как определено на карте одного мейоза. Они становятся все более сцепленными, если частота рекомбинации составляет примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или менее, как определено на карте одного мейоза. По меньшей мере два гена физически сцеплены (или синтеничны), если было продемонстрировано, что они находятся на одном участке ДНК, таком как хромосома. Генетически сцепленные гены будут физически сцеплены (или синтеничны), но точное физическое расстояние (количество нуклеотидов), возможно, еще не продемонстрировано.

Используемый в настоящем документе термин "тесно сцепленный" относится к генетически сцепленным маркерам в пределах 15 сМ или менее, включая, без ограничения, 12 сМ или менее, 10 сМ или менее, 8 сМ или менее, 7 сМ или менее, 6 сМ или менее, 5 сМ или менее, 4 сМ или менее, 3 сМ или менее, 2 сМ или менее, 1 сМ или менее и 0,5 сМ или менее, как определено на генетической карте.

Используемый в настоящем документе термин "хромосомный интервал" относится к непрерывному линейному отрезку геномной ДНК, который находится в *planta* на одной хромосоме, обычно определяемому со ссылкой на два маркера. Предпочтительно, чтобы интервал действительно включал два фланкирующих маркера.

В одном аспекте, хромосомный интервал относится к последовательности, содержащей любые два из SEQ ID Nos: от 1 до 10, и последовательность между указанными последовательностями.

Например, хромосомный интервал может полностью охватывать SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10 и все последовательности между SEQ ID No:1 и SEQ ID NO: 10. Соответственно, хромосомный интервал может полностью охватывать SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6 и все последовательности между SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6.

В одном аспекте, хромосомный интервал относится к аллелям в пределах любых двух SEQ ID Nos: от 1 до 10 и последовательности между указанными аллелями.

Например, хромосомный интервал может охватывать аллель ra24982s01 и аллель ra25063s01 и последовательность между указанными аллелями. Соответственно, хромосомный интервал может полностью охватывать аллель ra74601s01 и аллель ra74589s02 и все последовательности между указанными аллелями.

Используемый в настоящем документе термин "событие рекомбинации" относится к возникновению рекомбинации между гомологичными хромосомами и относится к конкретному местоположению хромосомы, где произошла такая рекомбинация (например, рекомбинация хромосомного интервала, внутреннего по отношению к конечным точкам хромосомы, будет иметь событие рекомбинации на каждом конце хромосомного интервала).

В контексте настоящего изобретения хромосомный интервал находится между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10. Интервал может включать SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10 и любую последовательность между ними. Интервал может охватывать аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 1 (ra24982s01), и аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 10 (ra25063s01), и любую последовательность между ними.

Соответственно, хромосомный интервал может находиться между SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 9. Интервал может охватывать SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 9 и любую последовательность между ними. Интервал может охватывать аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 2 (ra74607s01), и аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 9 (ra25042s01), и любую последовательность между ними.

Соответственно, хромосомный интервал может находиться между SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 8. Интервал может охватывать SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 8 и любую последовательность между ними. Интервал может охватывать аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 3 (ra74625s01), и аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 8 (ra25028s01), и любую последовательность между ними.

Соответственно, хромосомный интервал может находиться между SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 7. Интервал может охватывать SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 7 и любую последовательность между ними. Интервал может охватывать аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 4 (ra74605s01), и аллель, идентифицированный в SEQ

ID No: 7 (ra74593s01), и любую последовательность между ними.

Соответственно, хромосомный интервал может находиться между SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6. Интервал может охватывать SEQ ID No: 5 и SEQ ID No: 6 и любую последовательность между ними. Интервал может охватывать аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 5 (ra74601s01), и аллель, идентифицированный в SEQ ID No: 6 (ra74589s02), и любую последовательность между ними.

Соответственно, хромосомный интервал может быть определен с помощью SEQ ID No: 5.

Соответственно, хромосомный интервал может быть определен с помощью SEQ ID No: 6.

Соответственно, по меньшей мере один маркер может быть тесно сцеплен с любым из SEQ ID Nos: 1-10. Соответственно, по меньшей мере, один маркер может быть тесно сцеплен с ra74601s01, аллелем, идентифицированным в SEQ ID No: 5, и/или ra74589s02, аллелем, идентифицированным в SEQ ID No: 6.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер может находиться на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10; и быть тесно сцепленным с

SEQ ID No: 5, или ra74601s01, аллелем, идентифицированным в SEQ ID No: 5 и/или тесно сцепленным с SEQ ID No: 6, или ra74589s02, аллелем, идентифицированным в SEQ ID No: 6.

В одном аспекте, маркер является или сцеплен (например, тесно сцеплен), по меньшей мере, с одним из следующих аллелей:

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

при этом аллель, выделенный жирным шрифтом, представляет собой аллель, ассоциированный с устойчивостью к Phoma stem canker.

Таким образом, предпочтительный аллель - это аллель, выделенный жирным шрифтом выше.

Соответственно, маркер, описанный в настоящем документе, может обнаруживать, по меньшей мере, один из следующих аллелей:

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

Предпочтительный аллель - это аллель, выделенный жирным шрифтом выше.

Соответственно, способ согласно настоящему изобретению может содержать обнаружение, по меньшей мере, аллеля **C/T** ra74601s01 и/или аллеля **C/T** ra74589s02.

В одном аспекте, способ согласно настоящему изобретению может содержать обнаружение более одного маркера, например, по меньшей мере, двух маркеров, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти маркеров.

Не желая ограничиваться теорией, можно использовать, по меньшей мере, два маркера, которые фланкируют *LepRI* или гаплотип, описанный в настоящем документе. Например, по меньшей мере, один маркер может находиться выше, и, по меньшей мере, один маркер может находиться ниже *LepRI* или гаплотипа, как описано в настоящем документе.

Таблица 1. Физические положения генома маркеров, раскрытых в настоящем документе, относительно *Darmon* в.4.1.

Название маркера	Направление	Физическое положение генома на основе <i>Darmon</i> в.4.1	Аллель устойчивости / Чувствительный аллель Y
ra24982s01	F	17261239	C / T
ra74607s01	R	17643282	T / C
ra74625s01	F	17712460	G / C
ra74605s01	F	17869714	T / C
ra74601s01*	F	17985071	T / C

ra74589s02*	F	18087922	C / T
ra74593s01	F	18184032	C / T
ra25028s01	F	18255015	T / G
ra25042s01	R	18335590	G / A
ra25063s01	F	18698483	G / T

* указывает, что этот маркер является диагностическим для гаплотипа устойчивости.

В одном аспекте, способ согласно настоящему изобретению содержит обнаружение в указанном растении *B. napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 10 и SEQ ID No: 6.

В другом аспекте,

a) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 2 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 9 и SEQ ID No: 6; и/или,

b) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 3 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 8 и SEQ ID No: 6; и/или,

c) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 4 и SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 7 и SEQ ID No: 6; и/или,

d) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале, определенном SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале, определенном SEQ ID No: 6.

На генетической карте сцепление одного молекулярного маркера с геном, локусом или другим маркером измеряется как частота рекомбинации. Например, отсутствие точной пропорциональности между cM и физическим расстоянием может привести к вариации в частотах рекомбинации для разных хромосомных областей; некоторые области являются "горячими точками" рекомбинации, в то время как в других происходят редкие события рекомбинации.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер может иметь частоту рекомбинации примерно 50% или менее (например, примерно 40% или менее, например, примерно 30% или менее, например, примерно 20% или менее, например, примерно 10% или менее) с ra74601s01 или SEQ ID No: 5 и/или ra74589s02 или SEQ ID No: 6.

В одном аспекте, по меньшей мере, один маркер может быть расположен в пределах

750 т.п.о. или менее от ga74601s01 или SEQ ID No: 5, или ga74589s02, или SEQ ID No: 6, например, 700 т.п.о. или менее, 650 т.п.о. или менее, 600 т.п.о. или менее, 550 т.п.о. или менее, 500 т.п.о. или менее, 450 т.п.о. или менее, 400 т.п.о. или менее, 350 т.п.о. или менее, 300 т.п.о. или менее, 250 т.п.о. или менее, 200 т.п.о. или менее, 150 т.п.о. или менее, 100 т.п.о. или менее, 50 т.п.о. или менее, когда расстояние соответствует эквивалентным физическим положениям генома на A02 Dargmoг в.4.1.

Выравнивания последовательностей или контиги также могут быть применены для поиска последовательностей выше или нисходящих по потоку от конкретных маркеров, описанных здесь. Эти новые последовательности, тесно сцепленные с описанными в настоящем документе маркерами, затем используются для обнаружения и разработки функционально эквивалентных маркеров в соответствии с настоящим изобретением.

Например, различные физические и/или генетические карты могут быть выровнены для определения местоположения эквивалентных маркеров, не описанных в рамках данного раскрытия, но которые находятся в пределах аналогичных хромосомных областей согласно настоящему изобретению.

Информацию о выравнивании генетических и физических карт *Brassica* и ассоциированных с ними инструментов можно найти на веб-странице *Brassica Genome* [Хургобин, Б., *и соавт.*, Plant biotechnology journal 2018, 16, 1265-1274 (2011); Nature Genetics 43: 1035-1040 Маршалл *и соавт.*, Plant Methods 6:19 (2010); Голич *и соавт.*, Nature Communications 7:13390 (2016)], на которой размещены базы данных по геному *Brassica*, а также на веб-сайте *Brassica Database (BRAD)* и в базе данных PlantGDB.

Коммерческие признаки

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к растениям *B. napus*, обладающим устойчивостью к Phoma stem canker и обладающим коммерчески желательными признаками.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения, которое обладает устойчивостью к Phoma stem canker, и которое обладает коммерчески желательными признаками.

Следовательно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, способы и применение настоящего изобретения относятся к повышению устойчивости к Phoma stem canker при сохранении характеристик и/или других коммерчески желательных признаков коммерческого растения *B. napus* (например, урожай).

Термин "коммерчески желательные признаки" будет включать такие признаки, как урожайность, высота зрелого растения (например, уменьшенная высота растения может быть выгодна для уменьшения риска полегания), кондиционное зерно, количество

пригодных для сбора стручков, содержание масла в семенах, сухая масса семян, количество листьев, качество масла, абиотическая толерантность к стрессу (например, к засухе), устойчивость к осыпанию, толерантность к гербицидам и/или толерантность к биотическому стрессу (например, к насекомым, бактериям или грибам).

Предпочтительно выход представляет собой массу ядер. Предпочтительно, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения, которое обладает устойчивостью к *Phoma stem canker*, и которое имеет массу ядер, составляющую, по меньшей мере, 20 центнеров на гектар или, по меньшей мере, 22 центнеров на гектар, предпочтительно, 24 центнеров на гектар, более предпочтительно, 26 центнеров на гектар. Масса ядер относится к урожаю, производимому взрослым растением на момент сбора урожая.

Коммерческие растения *B. napus* (растения, пригодные для коммерческого выращивания) обычно содержат более низкие уровни эруковой кислоты и более низкие уровни глюкозинолатов, чем дикорастущие растения. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации растения, которое обладает устойчивостью к *Phoma stem canker*, и которое имеет низкие уровни эруковой кислоты и/или глюкозинолатов. Предпочтительно, чтобы уровни эруковой кислоты составляли менее 2% по отношению к общему содержанию масла. Предпочтительно, чтобы уровень глюкозинолатов составлял менее 25 пмоль на грамм кукурузы при содержании влаги 9%.

В одном аспекте, растение обладает коммерчески желательными признаками "канолы".

Используемый в настоящем документе термин "канола" относится к масличному растению рода *Brassica* (*B. napus*, *Brassica rapa* или *Brassica juncea*), масло из семян которого содержит менее 2% эруковой кислоты по его профилю жирных кислот, а твердый компонент содержит менее 30 микромолей любого одного или любой смеси 3-бутенилглюкозинолат, 4-пентенилглюкозинолат, 2-гидрокси-3-бутенилглюкозинолат и 2-гидрокси-4-пентенилглюкозинолат на грамм воздушно-сухого твердого вещества, не содержащего масла.

В одном аспекте, растение *B. napus* производит масло (после измельчения семян), содержащее менее 2% эруковой кислоты (от общего количества жирных кислот в масле).

В одном аспекте, твердый компонент семян содержит менее 30 микромолей любого одного или любой смеси 3-бутенилглюкозинолата, 4-пентенилглюкозинолата, 3-гидрокси-3-бутенилглюкозинолата и 2-гидрокси-4-пентенилглюкозинолата на грамм воздушно-сухого, не содержащего масла твердого вещества.

Селекция

Молекулярные маркеры могут быть применены в различных применениях селекции растений. Одним из основных применений является повышение эффективности обратного скрещивания и интрогрессии генов с применением маркерной селекции (MAS). Молекулярный маркер, который демонстрирует сцепление с локусом, влияющим на желаемый фенотипический признак, предоставляет инструмент для отбора признака в популяции растений. Это может быть полезно, когда фенотип трудно поддается анализу, например, признаки устойчивости к болезням или признак, который измеряется на поздней стадии, например, характеристики масла семян. Маркерные анализы более эффективны, чем полевое фенотипирование, и позволяют анализировать гораздо большие популяции, тем самым увеличивая вероятность обнаружения рекомбинанта с сегментом-мишенью из донорской линии, введенного в линию-реципиент. Чем теснее сцепление, тем более полезным является маркер, поскольку менее вероятно возникновение рекомбинации между маркером и геном, вызывающим признак.

Когда локус или ген интрогрессирован посредством MAS, вводится не только сам ген, но и фланкирующие области. Обычно это называется "сцепленным грузом". Эти фланкирующие области могут нести дополнительные гены, которые могут кодировать коммерчески или агрономически нежелательные признаки. Этот "сцепленный груз" также может привести к снижению урожайности или другим негативным агрономическим характеристикам даже после многократных циклов обратного скрещивания с элитной линией. Это также иногда называют "задержкой урожая". Размер фланкирующей области может быть уменьшен путем дополнительного обратного скрещивания, хотя это не всегда успешно, поскольку селекционеры не имеют контроля над размером области или рекомбинации. При классической селекции обычно выбираются только случайные рекомбинации, которые способствуют уменьшению размера донорского сегмента. Однако с помощью маркеров можно отобрать редких индивидуумов, которые подверглись рекомбинации вблизи области-мишени (например, локус *LepRI*). Когда местоположение области-мишени известно, ряд фланкирующих маркеров, окружающих мишень, как описано в настоящем документе, может быть применен для отбора для рекомбинаций в популяции различных размеров.

Ключевыми этапами для MAS являются: (i) Определение популяции, в пределах которой будет определена ассоциация маркер-признак, которая может быть сегрегирующей популяцией или случайной, или структурированной популяцией; (ii) мониторинг сегрегации или ассоциации полиморфных маркеров относительно признака и определение сцепления или ассоциации с применением статистических методов; (iii) определение

набора желательных маркеров на основе результатов статистического анализа и (iv) применение и/или экстраполяция этой информации на текущий набор селекционной зародышевой плазмы для принятия решений об отборе на основе маркеров. В протоколах отбора с помощью маркеров могут использоваться различные типы маркеров, например: маркеры SNP, SSR и FLP.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает маркеры для MAS растений *B. napus*, обладающих устойчивостью к Phoma stem canker. В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает наборы праймеров для MAS растений *B. napus*, обладающих устойчивостью к Phoma stem canker.

Другие аспекты настоящего изобретения включают способы идентификации растений *B. napus*, которые недавно предоставили или усилили устойчивость к Phoma stem canker путем обнаружения маркеров, которые были интрогрессированы в указанное растение.

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает способ отбора или идентификации интрогрессированного растения, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker, и которое обладает коммерчески желательными признаками.

Соответственно, маркеры согласно настоящему изобретению могут быть применены для отбора или идентификации интрогрессированных растений, обладающих устойчивостью к Phoma stem canker, при снижении или предотвращении любых негативных агрономических характеристик, которые могут быть вызваны сцепленным грузом.

Способ согласно настоящему изобретению может быть применен для отбора или идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker, при этом указанное растение *B. napus* было получено путем процесса интрогрессии *LepRI* из растения-донора в растение-реципиент *B. napus* для получения интрогрессированного растения *B. napus*.

Процесс "интрогрессии" зачастую называют "обратным скрещиванием", когда процесс повторяется, по меньшей мере, два раза.

Используемый в настоящем документе термин "растение-донор" относится к растению, которое содержит, по меньшей мере, один из описанных в настоящем документе маркеров, и которое обладает устойчивостью к Phoma stem canker. Растение-донор содержит желаемый ген или локус, подлежащий интрогрессии в растение-реципиент.

Используемый в настоящем документе термин "растение-реципиент" относится к растению, в которое интрогрессируется ген или локус.

Первоначальное скрещивание дает начало поколению F1; термин "BC1" затем относится ко второму применению реципиента или рекуррентного родителя, "BC2"

относится к третьему применению рекуррентного родителя и так далее.

Соответственно, способ согласно настоящему изобретению может уменьшить или устранить сцепленный груз у растения-донора и может привести к получению агрономически полезной линии или сорта, или к получению растения, которое может быть применено в программе селекции (например, линия DH).

Соответственно, растением-донором может быть *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* (AA genome).

Растением-реципиентом может быть любое растение *B. napus*, для которого желательно повысить устойчивость к Phoma stem canker.

В одном аспекте, растением-реципиентом может быть элитная линия или элитный сорт.

Используемый в настоящем документе термин "элитная линия" или "элитный сорт" представляет собой превосходящую в агрономическом отношении линию или сорт, которая была получена в результате многих циклов селекции и отбора для получения превосходных агрономических характеристик. "Элитная инбредная линия" - это элитная линия, которая является инбредной, и которая, как было показано, полезна для получения достаточно высокоурожайных и агрономически подходящих гибридных сортов ("элитный гибридный сорт"). Существует множество элитных линий и сортов, которые известны специалистам в данной области техники селекции *Brassica*. Аналогичным образом, "элитная зародышевая плазма" - это превосходная с агрономической точки зрения зародышевая плазма, обычно получаемая из растения с превосходными агрономическими характеристиками и/или способная дать начало растению с превосходными агрономическими характеристиками, такому как существующая или недавно разработанная элитная линия *Brassica*.

В настоящем документе представлен способ выращивания растений рода *Brassica* или вида *Brassica napus*, включающий

- (i) получение устойчивого растения или семени с помощью одного из способов отбора или идентификации, описанных в настоящем документе
- (ii) посадку растения или семени, полученных на этапе (i), и
- (iii) культивирование растения или семени,

при этом способ противодействует заражению культурных растений *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*. Посадка на этапе (ii) может происходить на участке, зараженном *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно характеризуется тем, что количество применяемых фунгицидов уменьшено по сравнению с посадкой растения или семени, не обладающих устойчивостью согласно настоящему изобретению. Поскольку

споры грибов могут сохраняться на сельскохозяйственном поле или в почве в течение длительного периода, в другом предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа способ повторяют в течение 2, 3, 4 или даже 5 лет на том же участке (например, на том же поле). Культивирование на этапе (iii) должно происходить в условиях, которые позволяют растению расти и/или семенам прорасти и впоследствии расти. Это означает, что растение или семя следует поместить в подходящий субстрат (например, почву), при этом субстрат содержит достаточное количество воды (например, 10-35% г/г), и при этом подходящий источник света (например, солнечный свет) запускает фотосинтез в течение, по меньшей мере, части дня. (например, 8-18 часов в сутки). В предпочтительном варианте осуществления способа согласно настоящему изобретению, растение или семя, полученные на этапе (i), являются гомозиготными по устойчивости. Способ и каждое его осуществление могут необязательно включать этап (iv) - сбор растения или растительного материала, такого как, например, семена. Приведенный выше способ выращивания может быть частью способа получения масла канолы. Способ получения масла канолы включает этапы (i) - (iv) и дополнительный этап (v) экстракции масла из семян, собранных на этапе (iv).

Растения

Используемый в настоящем документе термин "растение или его часть" включает растение или любую его часть, такую как растительная ткань, корни, листья, стебель, соцветие, незрелые стручки, стенки стручка и семена.

В Европе сорта озимого типа выращивают как однолетние сидеральные культуры в севообороте с зерновыми культурами и сидеральными культурами. Сорта озимого типа, как правило, более сильные, чем летние сорта, и менее чувствительны к неурожаю.

Термин "озимый" или "озимого типа", используемый в настоящем документе, относится к культурам, которым требуется яровизация для начала процесса цветения.

Примерами сортов озимого типа являются Darmor-bzh.

Термин "яровой" или "ярового типа", используемый в настоящем документе, относится к культурам, которым не требуется яровизация для начала процесса цветения.

В Канаде и Австралии выращивают яровые сорта, которые не являются зимостойкими и не требуют яровизации.

В одном аспекте, растение *B. napus* является интрогрессированным или обратнокрещенным растением.

В одном аспекте, растение-донор является сортом ярового типа.

В одном аспекте, растение-реципиент относится к сорту озимого типа.

Например, маркеры, описанные в настоящем документе, могут быть применены для

внесения устойчивости к Phoma stem canker (*LepRI* на хромосоме A02) от ярового сорта в сорт озимого типа. Маркеры, описанные в настоящем документе, могут быть применены для минимизации сцепленного груза источника яровой культуры из хромосомы A02.

НАБОР

Настоящее изобретение также относится к набору праймеров для идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*).

Соответственно, набор может содержать праймеры, способные идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного из маркеров, описанных в настоящем документе.

Соответственно, набор может содержать праймеры, способные идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного из следующих маркеров:

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

Соответственно, набор праймеров может содержать, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, по меньшей мере, шесть, по меньшей мере, семь, по меньшей мере, восемь, по меньшей мере, девять, по меньшей мере, десять наборов праймеров, как определено в пунктах а)-j) выше.

В одном аспекте, набор праймеров способен идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, ra74601s01.

В одном аспекте, набор праймеров способен идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, ra74589s02.

Соответственно, набор праймеров может содержать праймеры, способные идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного из следующих маркеров:

- a) ra24982s01 и ra25063s01;
- b) ra74607s01 и ra25042s01;

- c) ra74625s01 и ra25028s01;
- d) ra74605s01 и ra74593s01;
- e) ra74601s01 и ra74589s02.

Соответственно, набор праймеров может содержать, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или все пять наборов праймеров, как определено в пунктах а)-е) выше.

В одном аспекте, набор праймеров способен идентифицировать присутствие или отсутствие, по меньшей мере, ra74601s01 и ra74589s02.

Настоящее изобретение также относится к набору праймеров для идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*), содержащего, по меньшей мере, одно из следующего.

а) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra24982s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 11, или праймер, содержащий SEQ ID No: 12, и праймер, содержащий SEQ ID No: 13; и/или

б) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74607s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 14, или праймер, содержащий SEQ ID No: 15, и праймер, содержащий SEQ ID No: 16; и/или

с) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74625s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 17, или праймер, содержащий SEQ ID No: 18, и праймер, содержащий SEQ ID No: 19; и/или

д) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74605s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 20, или праймер, содержащий SEQ ID No: 21, и праймер, содержащий SEQ ID No: 22; и/или

е) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74601s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 23, или праймер, содержащий SEQ ID No: 24, и праймер, содержащий SEQ ID No: 25; и/или

ф) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74589s02, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 26, или праймер, содержащий SEQ ID No: 27, и праймер, содержащий SEQ ID No: 28; и/или

г) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra74593s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 29, или праймер, содержащий SEQ ID No: 30, и праймер, содержащий SEQ ID No: 31; и/или

h) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ra25028s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 32, или праймер,

содержащий SEQ ID No: 33, и праймер, содержащий SEQ ID No: 34; и/или

i) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga25042s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 35, или праймер, содержащий SEQ ID No: 36, и праймер, содержащий SEQ ID No: 37; и/или

j) набор праймеров, способных идентифицировать присутствие или отсутствие маркера ga25063s01, содержащий праймер, содержащий SEQ ID No: 38, или праймер, содержащий SEQ ID No: 39, и праймер, содержащий SEQ ID No: 40.

Соответственно, набор праймеров может содержать, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, по меньшей мере, пять, по меньшей мере, шесть, по меньшей мере, семь, по меньшей мере, восемь, по меньшей мере, девять, по меньшей мере, десять наборов праймеров, как определено в пунктах а)-j) выше.

В одном аспекте, набор праймеров предназначен для идентификации растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker и обладающего коммерчески желательными признаками. Изобретение, кроме того, относится к паре праймеров, упомянутых в контексте набора. Предпочтительно, пара этих праймеров представляет собой пару, как определено в пунктах а)-j) выше. Праймер может представлять собой олигонуклеотид и/или маркер, предпочтительно молекулярный маркер.

ПРИМЕНЕНИЕ

В одном аспекте, настоящее изобретение предлагает применение, по меньшей мере, одного маркера, как описано в настоящем документе, или последовательности, выбранной из SEQ ID Nos: 1-10, или набора праймеров, как описано в настоящем документе, для отбора растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как, устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* *u/um* *L. biglobosa*).

Соответственно, способ может содержать отбор растения *B. napus*, имеющего маркер, ассоциированный с устойчивостью к Phoma stem canker (такой как грибковый патоген (патогены) *L. maculans* *u/um* *L. biglobosa*), как описано в настоящем документе.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к применению, по меньшей мере, одного маркера, как описано в настоящем документе, или, по меньшей мере, одной последовательности, выбранной из SEQ ID Nos: 1-10, или набора праймеров, согласно настоящему документу, для отбора растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* *u/um* *L. biglobosa*).

Соответственно, применение может представлять собой применение, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере,

девяти или десяти маркеров, как описано в настоящем документе (таких как маркеры SEQ ID Nos: 1-10), для отбора растения *B. napus*, обладающего устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*).

В одном аспекте, применение согласно настоящему изобретению представляет собой применение, по меньшей мере, га74601s01 или SEQ ID No: 5.

В одном аспекте, применение согласно настоящему изобретению представляет собой применение, по меньшей мере, га74589s02 или SEQ ID No: 6.

В одном аспекте, применение согласно настоящему изобретению представляет собой применение, по меньшей мере, га74601s01 или SEQ ID No: 5 и га74589s02 или SEQ ID No: 6.

Настоящее изобретение также предлагает применение растения, выбранного способом согласно настоящему изобретению, для получения масла из масличного рапса или жмыха из масличного рапса.

В одном аспекте, способ получения масла из масличного рапса или жмыха из масличного рапса содержит обнаружение в указанном растении *B. napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного маркера, как описано в настоящем документе (например, который находится на хромосомном интервале между SEQ ID No: 1 и SEQ ID No: 10).

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать извлечение ДНК из растительной ткани и проведение анализа указанной ДНК на присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного маркера, как определено в настоящем документе.

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать выращивание растения или растений, идентифицированных как имеющие маркер, ассоциированный с устойчивостью к Phoma stem canker (такой как устойчивость к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*).

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать переработку семян рапса для получения масла.

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать производство рапсовой муки.

Считается, что эруковая кислота и глюкозинолаты могут быть нежелательны в кормах для животных. Например, государственное регулирование ограничивает содержание в масле канола эруковой кислоты максимум до 2% по массе в США и 5% в ЕС.

Как описано в настоящем документе, растения, отобранные способами по

настоящему изобретению, могут содержать более низкие уровни эруковой кислоты и более низкие уровни глюкозинолатов по сравнению с другими растениями *B. napus*, обладающими устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *L. maculans* и/или *L. biglobosa*, такими как дикорастущие растения *Brassica*. Следовательно, растения *B. napus*, полученные способами согласно настоящему изобретению, могут обладать более высокой питательной ценностью, чем прессованные жмыхи из масличного рапса для корма животных.

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать получение растения, которое после измельчения семян дает масло, содержащее менее 5% (например, менее 4%, например, менее 3%, например, менее 2%, например, менее 1%) эруковой кислоты от общего количества жирных кислот в масле.

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать получение растения, которое после измельчения семян дает масло, содержащее менее 5% (например, менее 4%, например, менее 3%, например, менее 2%, например, менее 1%) эруковой кислоты от общего количества жирных кислот в масле.

Соответственно, способ или применение согласно настоящему изобретению может содержать получение растения, в котором содержание алифатических глюкозинолатов в сухой, обезжиренной жмыховой муке находится на уровне менее 30 мкмоль/г.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Разработка интрогрессионной линии элитного селекционного материала, несущего устойчивый аллель/гаплотип локуса устойчивости к черной ножке *LepRI* и набор диагностических маркеров для отбора устойчивого аллеля/гаплотипа

Ранее была описана моногенная устойчивость локуса *LepRI* к черной ножке. Была создана приблизительная генетическая карта, состоящая из 4 SSR на основе хромосомы A02 (см. Фигуру 1). Размер области-мишени *LepRI* на тот момент, согласно общедоступному геномному справочнику Darmor v.4.1, составлял примерно 6,5 Мб.

Авторы настоящего изобретения стремились разработать интрогрессионную линию элитного селекционного материала, несущего устойчивый аллель/гаплотип локуса устойчивости к черной ножке *LepRI* и набор диагностических маркеров для отбора устойчивого аллеля/гаплотипа.

BC2S1 (поколение 2 обратного скрещивания, первое самоопыление) (09T11R1-13) было основой для программы обратного скрещивания, в ходе которой ген устойчивости к черной ножке интегрировался в элитный материал для зимнего восстановления, стараясь минимизировать сцепленный груз ярового источника на хромосоме A02.

20 полученных семян 09T11R1-13, все еще сегрегирующих по признаку

устойчивости, были на первом этапе самоопылены в теплице для размножения материала. Полученные семена проверяли в испытании семядолей на устойчивость к черной ножке с применением изолята T12aD34, типичного полевого изолята немецкой черной ножки. Для проведения испытания отдельные растения инокулировали на их двух семядолях двумя каплями (по одной на каждую половину семядоли) инокулята расы T12aD34. Примерно через 10 дней симптомы были оценены по шкале 1-6 (1-3 = устойчивые, 4-6 = чувствительные).

В этом испытании на устойчивость потомство одного индивида могло быть полностью устойчивым (самоопыленное растение, гомозиготное по *LepRI*), полностью чувствительным (самоопыленное растение, не несущее *LepRI*) или сегрегирующим в плане устойчивости (самоопыленное растение, гетерозиготное по *LepRI*). Растения, имеющие балл устойчивости 1 (полностью устойчивые, без симптомов заболевания), были отобраны и скрещены с элитными восстановительными линиями KWS.

В результате BC0 все растения могли быть гетерозиготными (растение-донор, гомозиготное по *LepRI*) или сегрегирующими на гетерозиготные и не несущие (растение-донор, гетерозиготное по *LepRI*) растения.

Из-за того, что устойчивость *LepRI* является доминирующей, растение, проявляющее устойчивость, может быть гомозиготой или гетерозиготой, несущей ген устойчивости. Если BC0 будет сгенерирован просто случайно у растения, полученного в результате этого испытания, следующее поколение может быть полностью гетерозиготным (отобранное растение = гомозигота по *LepRI*) или сегрегирующим (отобранное растение = гетерозигота).

Поэтому растительный материал был повторно испытан в испытании на семядоли, и устойчивые гетерозиготные растения были отобраны для получения BC1 (поколение 1 обратного скрещивания). Испытание на семядоли с BC2 по BC4 (поколения 2 и 4 обратного скрещивания) повторяли, отбирая устойчивые гетерозиготные растения. После BC4 материал поступил в программу прямой селекции для выведения ДН (двойных гаплоидных) линий и испытания их характеристик в интенсивных испытаниях GCA- (общая способность к комбинированию) и испытаниях SCA- (специальная способность к комбинированию).

В BC2S1 (в 2012 году) был осуществлен первый подход внутреннего генетического картирования, подтверждающий локус устойчивости A02. В последующие годы дальнейшие генетические анализы и QTL-картирование в различных поколениях BC-/BCS-/ДН (ДН= двойной гаплоид), выполненные авторами изобретения, сократили область-мишень до 90 т.п.о. на основе физического картирования маркеров в эталонном геноме

Darmog в.4.1 (см. Фигуру 2).

Эта область-мишень в настоящее время включает 21 ген в эталоне Darmog. Уменьшение размера мишени было основано на улучшении плотности маркеров на карте и скрининге на наличие рекомбинантов. В первые два года было размещено несколько новых производителей SSR, а затем маркеры, выбранные из общедоступного i60k, Illumina CHIP, преобразовали RD-LS-MS в маркеры KASPAR.

Последние разработки маркеров начались на основе данных повторного секвенирования Illumina Xten линии DH, несущей область-мишень *LepR1*. На сегодняшний день общий набор из 115 маркеров KASPAR и 33 маркеров XT-CHIP (28 перекрываются) применяется для анализа области-мишени, включая фланкирующие области (4 Мб, 1620 млн п.о. на физической карте Darmog в.4.1). С помощью двух маркеров (ra74589s02 и ra74601s01) авторы настоящего изобретения идентифицировали диагностический гаплотип, охватывающий область размером примерно 110 т.п.о.

Пример 2 - Линии LepR1 демонстрируют баллы улучшенной устойчивости по сравнению с чувствительными линиями и линиями, несущими только количественную устойчивость.

Чтобы показать ценность нового локуса устойчивости для селекции масличного рапса, были проанализированы различные полевые испытания. Подмножество линий DH со следующей устойчивостью: *LepR1*, *LepR2* и *Rlm3* было испытано в полевых испытаниях O18-RA W/PH1 с баллом PG2.

Для подсчета баллов примерно 20 растений каждого генотипа были срезаны у основания корня, и процент зараженной корневой ткани оценивали с помощью баллов от 1 до 9 в качестве основы для индекса заболевания PG2. Краткое изложение результатов приведено в Таблице 2, ниже, демонстрирующей явное улучшение балла PG2 у *LepR1*, несущих линии DH, по сравнению с чувствительными линиями, такими как Capitol.

Таблица 2: Баллы PG2 в испытании O18-RAW/PH1

Генотип	Количество линий	Средний балл PG2
Capitol	3	2,76
Express	3	0,98
Exquisite	3	0,88
Rlm3, несущий DH	127	0,89
LepR2, несущий линию DH	47	0,52
LepR1, несущий линию DH	86	0,51

Кроме того, линии DH, несущие различные гены моногенной устойчивости, испытывали в течение трех лет на устойчивость к *L. maculans* и *L. biglobosa* (см. Фигуру 3А и Фигуру 3В).

LepRI демонстрирует лучшие баллы устойчивости к обоим патогенам по сравнению с чувствительными линиями и линиями, несущими только количественную устойчивость. Уровень заболевания в линиях *LepRI* также относительно низок по сравнению с линиями *Rlm7*- (частично нарушенными) или *Rlm3*.

Применяя внутренний подход "Фиксированный эффект" в геномном прогнозировании, можно оценить эффект моногенной устойчивости по сравнению с количественной устойчивостью. Для фиксированных эффектов обычно требуется, чтобы маркер был как можно ближе сцеплен с признаком.

Это было выполнено для селекционного материала в 2018 году. Был применен признак PMR, где устойчивость к черной ножке является одним из основных компонентов. PMR в основном обусловлен болезнями, а на европейских полях основной причиной является черная ножка. Поэтому ожидалось, что более низкие значения PMR будут коррелировать с *LepRI*.

Отрезок PMR в программе селекции составил 5,8. Линии DH, несущие устойчивость *LepRI*, демонстрируют снижение балла на 0,68. Таким образом, линии, включающие устойчивость *LepRI*, можно применять в качестве сортов, устойчивых к черной ножке, и применять в коммерческих целях в качестве сельскохозяйственных линий.

Для сравнения, линии *Rlm7* снижают отрезок всего на 0,2, демонстрируя, что устойчивость больше не является сильной, поскольку в Европе наблюдается первый убыток. Дальнейшие испытания, проведенные в 2019 году, дали аналогичные результаты.

Все публикации, упомянутые в приведенном выше описании, включены в данный документ в качестве ссылки. Специалистам в данной области техники будут очевидны различные модификации и вариации описанных способов и систем изобретения, не выходящие за рамки объема и сущности изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно излишне ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Несомненно, предполагается, что различные модификации описанных способов осуществления настоящего изобретения, очевидные для специалистов в области молекулярной биологии, клеточной иммунологии или смежных областях, входят в объем следующей формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ отбора или идентификации растения *Brassica napus*, обладающего устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*, содержащий обнаружение у указанного растения *Brassica napus* или его части присутствие или отсутствие, по меньшей мере, одного маркера, который находится на хромосомном интервале или в пределах него между га24982s01 в соответствии с SEQ ID No: 1 и га25063s01 в соответствии с SEQ ID No: 10.

2. Способ по п. 1, в котором указанный, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале или в пределах него между га74607s01 в соответствии с SEQ ID No: 2 и га25042s01 в соответствии с SEQ ID No: 9.

3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором указанный, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале или в пределах него между га74625s01 в соответствии с SEQ ID No: 3 и га25028s01 в соответствии с SEQ ID No: 8.

4. Способ по любому из пунктов 1-3, в котором указанный, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале или в пределах него между га74605s01 в соответствии с SEQ ID No: 4 и га74593s01 в соответствии с SEQ ID No: 7.

5. Способ по любому из пунктов 1-4, в котором указанный, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале или в пределах него между га74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5 и га74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6.

6. Способ по любому из пунктов 1-5, который содержит обнаружение, по меньшей мере, одного из следующих аллелей:

- a) аллель у или аллель с в га24982s01 в соответствии с SEQ ID No: 1
- b) аллель у или аллель t в га74607s01 в соответствии с SEQ ID No: 2
- c) аллель s или аллель g в га74625s01 в соответствии с SEQ ID No: 3
- d) аллель у или аллель t в га74605s01 в соответствии с SEQ ID No: 4
- e) аллель у или аллель t в га74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5
- f) аллель у или аллель с в га74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6
- g) аллель у или аллель с в га74593s01 в соответствии с SEQ ID No: 7
- h) аллель k или аллель t в га25028s01 в соответствии с SEQ ID No: 8
- i) аллель r или аллель g в га25042s01 в соответствии с SEQ ID No: 9
- j) аллель k или аллель g в га25063s01 в соответствии с SEQ ID No: 10

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, который содержит обнаружение в указанном растении *Brassica napus* или его части (такой как ткань или семя) присутствие или отсутствие, по меньшей мере, двух маркеров, при этом, по меньшей мере, один маркер находится на хромосомном интервале или в пределах него между га24982s01 в

соответствии с SEQ ID No: 1 и ra74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra25063s01 в соответствии с SEQ ID No: 10 и ra74589s02 в соответствии SEQ ID No: 6.

8. Способ по п. 7, в котором

a) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra74607s01 в соответствии с SEQ ID No: 2 и ra74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra25042s01 в соответствии с SEQ ID No: 9 и ra74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6; и/или

b) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra74625s01 в соответствии с SEQ ID No: 3 и ra74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra25028s01 в соответствии с SEQ ID No: 8 и ra74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6; и/или

c) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra74605s01 в соответствии с SEQ ID No: 4 и ra74601s01 в соответствии с SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него между ra74593s01 в соответствии с SEQ ID No: 7 и ra74589s02 в соответствии с SEQ ID No: 6; и/или

d) по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него, определенном ra74601s01, в соответствии с SEQ ID No: 5, и, по меньшей мере, один из указанных маркеров находится на хромосомном интервале или в пределах него, определенном ra74589s02, в соответствии с SEQ ID No: 6.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором растение *Brassica napus* имеет геном ААСС и получено путем интрогрессии LepR1 из растения-донора в растение-реципиент *Brassica napus* для получения интрогрессированного растения *Brassica napus*.

10. Способ по п. 9, в котором растением-донором является *Brassica rapa* subsp. *sylvestris*, имеющее геном АА.

11. Способ по п. 10, в котором интрогрессированное растение *Brassica* отбирают для события рекомбинации на хромосомном интервале или в пределах него между ra24982s01 в соответствии с SEQ ID No: 1 и ra25063s01 в соответствии с SEQ ID No: 10 и не сохраняют второй хромосомный интервал, полученный от растения-донора.

12. Способ по любому из пунктов 1-11, в котором указанное растение *Brassica napus* или его часть не проявляют никаких ассоциированных негативных агрономических и/или фенотипических свойств.

13. Пара праймеров для идентификации растения *Brassica napus*, обладающего устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*, отличающаяся тем, что пара праймеров выбрана из группы, состоящей из:

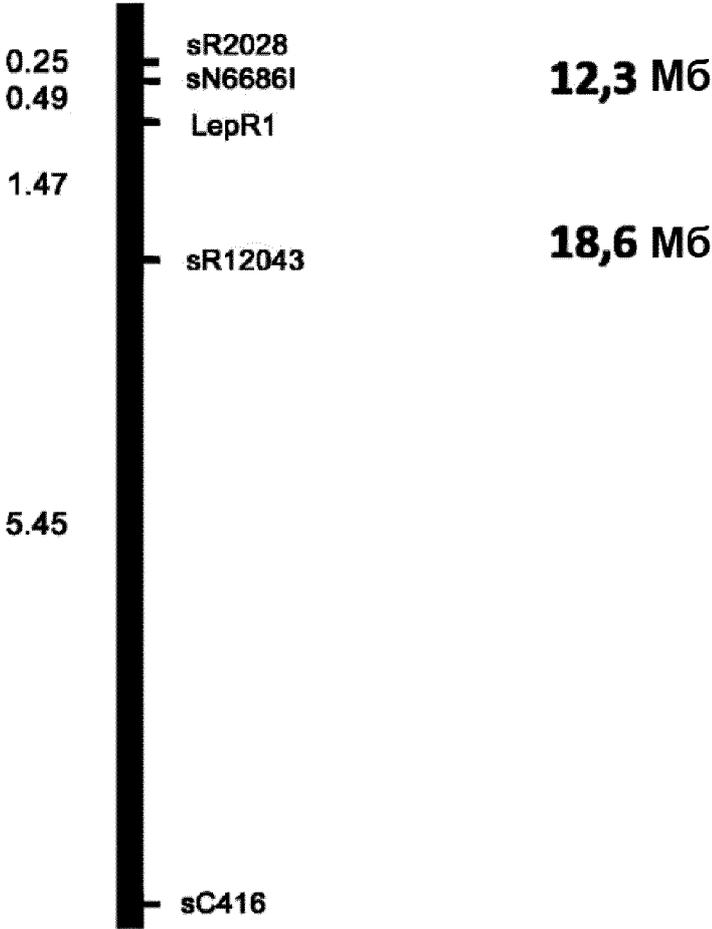
- a) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 11 и SEQ ID No: 12; и/или
- b) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 13 и SEQ ID No: 14; и/или
- c) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 15 и SEQ ID No: 16; и/или
- d) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 17 и SEQ ID No: 18; и/или
- e) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 19 и SEQ ID No: 20; и/или
- f) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 21 и SEQ ID No: 20; и/или
- g) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 23 и SEQ ID No: 24; и/или
- h) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 25 и SEQ ID No: 26; и/или
- i) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 27 и SEQ ID No: 28; и/или
- j) пары праймеров, содержащих SEQ ID No: 29 и SEQ ID No: 30; и/или

14. Применение растения, выбранного по любому из пунктов 1-12, для получения масла из масличного рапса или жмыха из масличного рапса.

15. Применение, по меньшей мере, одного маркера, выбранного из SEQ ID No: 1-10, или пары праймеров по пункту 13, для отбора растения *Brassica napus*, обладающего устойчивостью к грибковому патогену (патогенам) *Leptosphaeria maculans* и/или *L. biglobosa*.

Физическое положение
Darmor в.4.1 (M6)

N2



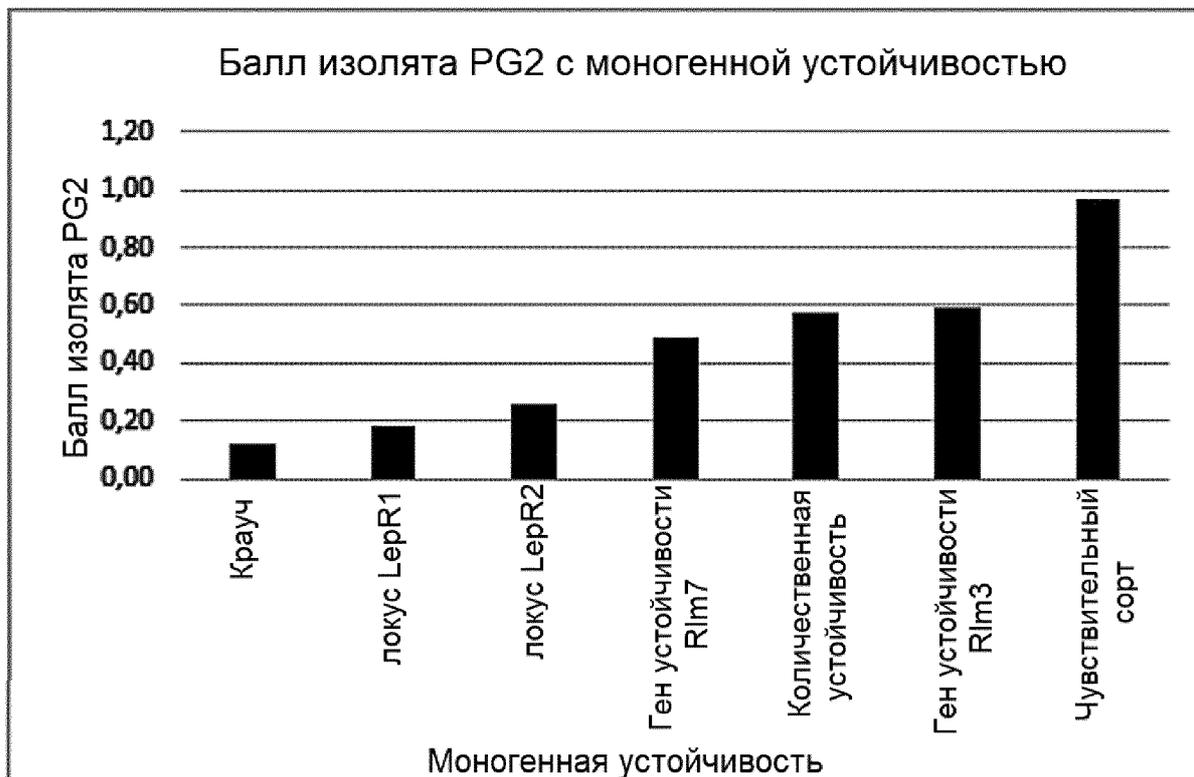
Фиг. 1

PRPLTNR	Балл	Тип	Darmor (п.о.)	ra74605s01	ra74620s01	ra74618s01	ra74603s01	ra74601s01	ra74614s01	ra74599s01	ra74589s02	ra74586s01	ra74586s02	ra74585s01	ra74584s01	ra74584s02
RA18605_00002	1	RES	17869714	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
RA18605_00041	1	RES	17887362	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
RA18605_00075	1	RES	17923080	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B
RA18605_00079	1	RES	17954649	B	B	B	B	H	H	H	H	H	B	B	B	B
RA18605_00080	1	RES	17985071	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B
RA18605_00089	1	RES	18010147	B	B	B	B	B	H	H	H	H	H	H	H	H
RA18605_00001	4	SUS	18073068	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RA18605_00018	4	SUS	18087922	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B	B
RA18605_00030	4	SUS	18097681	H	H	H	H	H	H	B	B	B	B	B	B	B
			18100495													
			18107211													
			18109283													
			18109633													

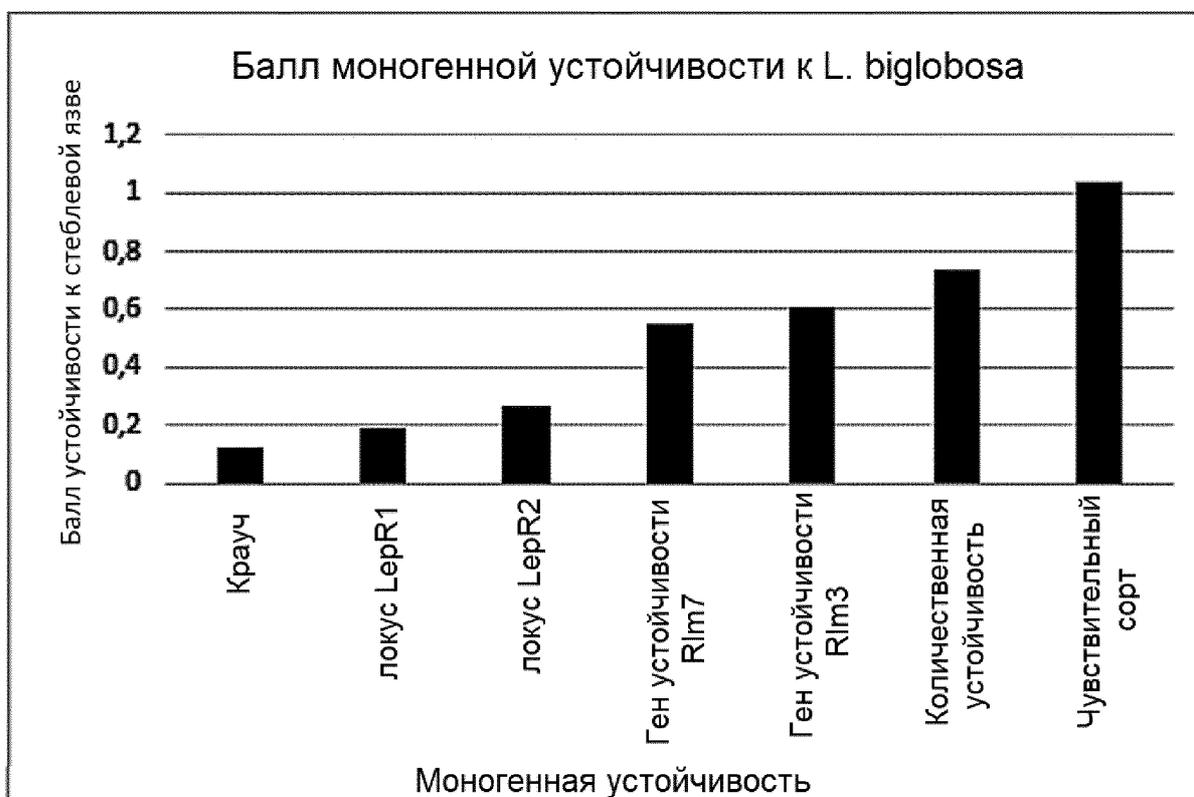
Фигура 2: Тонкое картирование области-мишени A02 для LepR1 с точностью до 90 000 п.о.

Фиг. 2

A.



B.



Фиг. 3

SEQ ID No: 1: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra24982s01:
CGTACCGATTGAGACTGAAACATCCTTATATGCATCCGAGTGTCCATTCT [C/T] AGGCCTCAAAGAT
AAGCACTGACCAAATACTCCTCTGAAAGCTTAACTCT

Фиг. 4

SEQ ID No: 2: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74607s01:
TTGGTGTТАCTAATTTTTKCTGAGCAGTCGGTAAATTAGTCGCTAATAAGT [C/T] GGCCATTTTTCTA
TAAAATCTAAGCGATATCTTCCATACATTTCTGCTCA

Фиг. 5

SEQ ID No: 3: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74625s01:
TATTTTTGTGGAATCTTCCCTAAAAGAATTACAGTGTAAATTTGTAGTAT [C/G] ATCAATACATTGG
ATATTTTGATWTAATCAAAAACACTAGGTGATAACCC

Фиг. 6

SEQ ID No: 4: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74605s01:
TCYACATTTSGGCAAGACTATCCACCTGAATGTTTTAGAGAGCTTGCTTT [C/T] GAAGTGGTAACTW
ACCATACTCCTTTTAGTCTTAATKTTTTGGGTTGGTG

Фиг. 7

SEQ ID No: 5: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74601s01:
TGGTCTCCATTGACGTAAGGAGATCAAGAAAAAGCTATGAGTCTAAATTG [C/T] СТАТСАТGTCAAG
CTCTTTCACGAACCGATTCAAACAAGAATTTGATCT

Фиг. 8

SEQ ID No: 6: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74589s02:
GTAGAGATATGTGGCCTTCAAAGTGTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGA [C/T] TAAAACAAGTAAA
CAACTTCATAGTTTTCTTATGCCAGTTTTATGATATG

Фиг. 9

SEQ ID No: 7: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra74593s01:
AACGAAAACAMAATTTTTATAGAGGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAG [C/T] СААТАGТAAACAG
ATCGAGATCAAAAACCTAATCCCCTTTCGTCAТTAT

Фиг. 10

SEQ ID No: 8: is представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra25028s01:
TTTGTTCATATATCTTCTATTTSATATATGATGTGGTACACATATAGACT [G/T] AATGTTACSTTTG
ATTTTAATGAGTTCAATCTCCAAGGCAAGTAGTAATC

Фиг. 11

SEQ ID No: 9: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra25042s01:
ТААТТССАТТТGTCTCGTGTGTTTTСТАТТУGGACACRAATGTGTATTACC [A/G] СТААССАТАТАСТ
CAGTACTCAAAATCCGTTCAТGAATTTCTTCAСАТАС

Фиг. 12

SEQ ID No: 10: представляет собой нуклеотидную последовательность маркера ra25063s01:
TTTGAGATGAAGATATGGGTТАСАAGТАAGATТААТССААСААСGGTATC [G/T] TGGAGCAAGTTTT
TAGAAGTGGATATGAGACCATTCAТTACTGGTTGTAA

Фиг. 13

SEQ ID No: 11: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra24982s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATGCATCCGAGTGTCCATTCTC

Фиг. 14

SEQ ID No: 12: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra24982s01:
GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATATGCATCCGAGTGTCCATTCTT

Фиг. 15

SEQ ID No: 13: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra24982s01:
AGAGGAGTATTTGGTCAGTGCTTATCTTT

Фиг. 16

SEQ ID No: 14: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74607s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGCTTAGATTTTATAGAAAAATGGCCG

Фиг. 17

SEQ ID No: 15: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74607s01:
GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATCGCTTAGATTTTATAGAAAAATGGCCA

Фиг. 18

SEQ ID No: 16: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74607s01:
CTGAGCAGTCCGTAATTAGTCGCTA

Фиг. 19

SEQ ID No: 17: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74625s01
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAAAGAATTACAGTGTAATTTGTAGTATC

Фиг. 20

SEQ ID No: 18: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74625s01
GAAGGTCCGAGTCAACGGATTCTAAAAGAATTACAGTGTAATTTGTAGTATG

Фиг. 21

SEQ ID No: 19: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74625s01:
YGC GCGGGTTATCACCTAGTGTTT

Фиг. 22

SEQ ID No: 20: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74605s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAATGTTTTAGAGAGCTTGCTTTC

Фиг. 23

SEQ ID No: 21: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74605s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCCTGAATGTTTTAGAGAGCTTGCTTTT

Фиг. 24

SEQ ID No: 22: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74605s01:
GACTAAAAGGAGTATGGTWAGTTACCACTT

Фиг. 25

SEQ ID No: 23: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74601s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCAAGAAAAGCTATGAGTCTAAATTGC

Фиг. 26

SEQ ID No: 24: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74601s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGATCAAGAAAAGCTATGAGTCTAAATTGT

Фиг. 27

SEQ ID No: 25: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74601s01:
CGGTTCGTGAAAGAGCTTGACATGAT

Фиг. 28

SEQ ID No: 26: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74589s02:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGAC

Фиг. 29

SEQ ID No: 27: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74589s02:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACTCAATTTCTGGCCATTGATGAT

Фиг. 30

SEQ ID No: 28: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74589s02:
CGCGTCTTCATATCATAAACTGGCATAA

Фиг. 31

SEQ ID No: 29: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra74593s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAGC

Фиг. 32

SEQ ID No: 30: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra74593s01:
GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTGGTAGAAAATGAAATCACTTATGGAGAGT

Фиг. 33

SEQ ID No: 31: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra74593s01:

GGGATTAGGTTTTTTGATCTCGATCTGTT

Фиг. 34

SEQ ID No: 32: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra25028s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATATGATGTGGTACACATATAGACTG

Фиг. 35

SEQ ID No: 33: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra25028s01:
GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTATATATGATGTGGTACACATATAGACTT

Фиг. 36

SEQ ID No: 34: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra25028s01:
CTACTTGCCTTGGAGATTGAACTCATTA

Фиг. 37

SEQ ID No: 35: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra25042s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATTTTGAGTACTGAGTATATGGTTAGT

Фиг. 38

SEQ ID No: 36: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y ra25042s01:
GAAGGTGCGGAGTCAACGGATTTTGAGTACTGAGTATATGGTTAGC

Фиг. 39

SEQ ID No: 37: представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия ra25042s01:
GCTAATTCCATTTGTCTCGTGTGTTTCTA

Фиг. 40

SEQ ID No: 38: представляет собой праймер для обнаружения аллеля X ra25063s01:
GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGTAAGATTAATCCAACAACGGTATCG

Фиг. 41

SEQ ID No: 39: представляет собой праймер для обнаружения аллеля Y га25063s01:
GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAGTAAGATTAATCCAACAACGGTATCT

Фиг. 42

SEQ ID No: 40 представляет собой общий праймер для обнаружения присутствия или отсутствия га25063s01:
ACCAGTAATGAATGGTCTCATATCCACTT

Фиг. 43