

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490789 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.08

(51) Int. Cl. *A01H 1/00* (2006.01)
A01H 5/06 (2018.01)
A01H 6/06 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.23

(54) РАСТЕНИЕ МОРКОВЬ, УСТОЙЧИВОЕ К ТРОПИЧЕСКОЙ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДЕ

(86) PCT/EP2021/076245
(87) WO 2023/046288 2023.03.30
(71) Заявитель:
БЕЙО ЗАДЕН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Харсма Адриана Дорин, Катсниг
Диана, Зван Вилем Ари, Деккер Петер
Арнольдус, Схрейвер Альбертус
Йоханнес Мария (NL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к растениям моркови, устойчивым к тропическим галловым нематодам и содержащим первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам. Настоящее изобретение также относится к способам идентификации растений моркови, устойчивых к тропическим галловым нематодам: к способам получения растений моркови, устойчивых к тропическим галловым нематодам; и к средствам идентификации растений моркови, устойчивым к тропическим галловым нематодам.

202490789
A1

202490789

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580819EA/042

РАСТЕНИЕ МОРКОВЬ, УСТОЙЧИВОЕ К ТРОПИЧЕСКОЙ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДЕ

Настоящее изобретение относится к растениям моркови, содержащим один или два геномных фрагмента, обеспечивающих устойчивость к тропической галловой нематоды. Настоящее изобретение также относится к способам идентификации растений моркови, устойчивых к тропическим галловым нематодам, к способам получения растений моркови, устойчивым к тропическим галловым нематодам, и к средствам идентификации растений моркови, устойчивых к тропическим галловым нематодам. Настоящее изобретение также относится к семенам и к частям растений, а особенно к съедобным частям таких растений.

Морковь, или *Daucus carota*, представляет собой культурное растение семейства Umbelliferae (или Зонтичных), распространенное во многих частях света. Семейство Umbelliferae насчитывает более 3500 видов, включая виды, относящиеся к роду *Daucus*, различные другие культурные растения, например, тмин, сельдерей, кориандр, укроп, фенхель, петрушку и пастернак.

Дикая морковь, *Daucus carota* L., является эндемиком для большей части мира. Это растение имеет белый стержневой корень, который изначально съедобен, но после длительного роста становится деревянистым. Культурная морковь *Daucus carota*, а особенно *Daucus carota* ssp. *sativus* представляет собой корнеплод обычно оранжевого цвета, но известны также фиолетовые, красные, желтые и белые сорта.

В зонах умеренного климата, *Daucus carota* представляет собой двухлетнее растение, вегетативно разрастающееся в первый год после посева. После зимовки, растение зацветает на второй год выращивания. В тропических и субтропических районах, растение морковь имеет годовой жизненный цикл, и переход от вегетативного роста к генеративному происходит без яровизации.

Для рода *Daucus* описаны два типа мужской стерильности. У так называемого типа коричневых пыльников, эти пыльники дегенерируют и сморщиваются, прежде чем они смогут распространять пыльцу. У лепестковых растений, тычинки заменены структурами, напоминающими лепестки.

Мужская стерильность, наблюдаемая у культивируемой моркови, обычно обусловлена цитоплазматической мужской стерильностью, вызванной митохондриальными дефектами. Поскольку митохондрии передаются потомству только яйцеклетками, этот признак наследуется по материнской линии. Мужская стерильность является полезным признаком при селекции моркови, поскольку она обеспечивает 100% перекрестное опыление. В результате легко образуются гибриды *Daucus*. Более того, у моркови, гетерозис или гибридная сила, могут быть очень высокими.

Морковь выращивают из-за ее питательного стержневого корня. Основная часть этого корня состоит из внешней коры флоэмы и внутренней сердцевины ксилемы. Более

того, считается, что большая часть коры относительно сердцевины имеет высокое агрономическое качество. Стержневой корень богат каротином, а особенно бета-каротином, то есть, важным антиоксидантом, который может подвергаться метаболизму с образованием витамина А. Морковь также является источником пищевых волокон, витаминов С, В6 и К, а также антиоксиданта фалькаринола. Антиоксиданты (включая каротиноиды) изучались на предмет их способности предотвращать хронические заболевания.

Длина корня растений моркови варьируется от 5 до 40 см, а диаметр - от 1 до 10 см. Стержневые корни также бывают различной формы. В зависимости от цели применения, предпочтительными являются круглые, конические или более цилиндрические формы. Стержневой корень диких сортов имеет белый цвет, а культурная морковь обычно имеет оранжевый, а иногда красный, фиолетовый, черный или желтый цвет.

Морковь выращивают во всем мире. В 2011 году было произведено более 35 миллионов тонн моркови. Тем не менее, известно множество вредителей, которые угрожают урожаям по всему миру. К ним относятся бактериальные, грибковые, вирусные и вириодные заболевания, а также насекомые и нематоды-вредители. Основные бактериальные и грибковые заболевания вызываются, в частности, *Xanthomonas hortorum*, *Erwinia carotovora*, *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* и *Phytophthora* spp. Нематоды, такие как как *Heterodera carotae*, *Meloidogyne* spp. и *Pratylenchus* spp., наносят серьезный ущерб стержневому корню, что приводит к потере урожайности к получению продукта, непригодного для продажи. Эти потери урожайности привели к тому, что Компании и Государственные Институты разработали специальные программы по селекции с целью придания растениям моркови генетической устойчивости к этим различным патогенам.

Яванские галловые нематоды рода *Meloidogyne* являются примерами вредителей, оказывающих существенное влияние на выращивание моркови. Галловые нематоды наносят ежегодный ущерб приблизительно до 157 миллиардов долларов. Эти облигатные для растений паразиты распространены по всему миру и имеют широкий круг хозяев, включая многие важные овощные культуры, а особенно томаты, баклажаны, бамию, огурцы, дыни, морковь, тыквы, салат и перец. Род *Meloidogyne* включает более 90 видов, но наиболее экономически важными видами считаются *Meloidogyne arenararia*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne hapla*. Вид *Meloidogyne hapla* встречается преимущественно в регионах с более прохладным климатом, а *Meloidogyne arenararia*, *Meloidogyne javanica* и *Meloidogyne incognita* распространены в более теплых регионах, в частности в районах с тропическим и субтропическим климатом, и называются тропическими галловыми нематодами.

При заражении растения моркови тропическими галловыми нематодами, на стержневом и вторичных корнях образуются многочисленные галлы. Галлы представляют собой аномальные выросты тканей растений. Главный корень растения моркови может раздваиваться, и рост растения моркови замедляется. Растрескивание и раздвоение

корнеплода приводит к образованию моркови уродливой формы, которая хотя и является съедобной, но неприемлема для продажи. Степень растрескивания и раздвоения напрямую связана с давлением нематод и усугубляется при более теплой погоде, когда нематоды более активны. Потери урожайности и рынка сбыта могут быть значительными. Например, в южных регионах Индии зарегистрированы потери до 50%.

Использование нематицидов, вносимых в почву, является одним из эффективных подходов к предотвращению заражения *Meloidogyne* spp. Однако, этот подход является трудоемким и дорогостоящим. Более того, использование пестицидов становится все более ограниченным, а овощи, выращенные на органических удобрениях, становятся все более популярными.

Севообороты и нехимические методы борьбы, включая организмы биологической борьбы, могут уничтожать тропические галловые нематоды лишь в ограниченной степени из-за широкого круга хозяев нематод, включая множество сорняков. В результате, возможности севооборота ограничены.

Использование генетически устойчивых сортов моркови является наиболее эффективным способом предотвращения заражения тропическими галловыми нематодами. В описанных ранее публикациях рассматривается несколько видов растений моркови, устойчивых к *Meloidogyne javanica* и *Meloidogyne incognita*.

Например, на хромосоме 8 были картированы два локуса устойчивости, обеспечивающие устойчивость к *Meloidogyne javanica*. Первый локус был обозначен как локус Mj-1 и был обнаружен у сорта моркови Brasília, а в частности, у линии Br1252. Устойчивость, обеспечиваемая локусом Mj-1, почти полностью доминирует. Локус также обеспечивает частичную устойчивость к *Meloidogyne incognita*. Вторым локусом был обозначен Mj-2 и был обнаружен у китайского сорта Ping Ding, также известного как PI 652188. Локус Mj-2 имеет не полностью доминантный тип наследования. Предварительные результаты позволяют предположить, что этот локус может также обеспечивать некоторую устойчивость к *Meloidogyne incognita*.

Кроме того, в 2014 году, Парсонс и др. выявили устойчивость к *Meloidogyne incognita* у различных сортов моркови, а в частности, сорта Brasília из Бразилии (Br1091), Noms из Сирии и европейских сортов Scarlet Fancy x Favorite (SFF). У этих сортов, локусы устойчивости были выявлены на хромосомах 1, 2, 4, 8 и 9 (см. Таблицу 1). Эти локусы представляют собой локусы количественных признаков (QTL), каждый из которых в небольшой степени вносит свой вклад в общую устойчивость растения. В результате необходимо объединить несколько QTL, чтобы обеспечить эффективную устойчивость моркови к *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne javanica*. Однако, объединение этих множественных локусов устойчивости с помощью селекции является сложной задачей и, следовательно, трудоемкой и непрактичной.

Таблица 1. Локализация ранее зарегистрированных QTL на хромосоме, обеспечивающих устойчивость к *Meloidogyne incognita* или *Meloidogyne javanica*. При этом, не описано никаких QTL, сообщающих устойчивость к *Meloidogyne Arenaria*.

Источник	Chr	Pos. (cM)	1,5 LoD	Примечания
Brasilia	1	67	52-75	
	8	42	42-56	Совместно локализуется с локусом Mj-1
Homs	1	35	23-65	
	2	43	4-66	
	2	63	61-67	
	8	42	41-44	Совместно локализуется с локусом Mj-1
	9	4	4-22	
	9	10	4-13	
SFF	4	33	15-57	
	8	42	27-59	Совместно локализуется с Mj-1

Пояснения к используемым сокращениям: Chr=хромосома; Pos. означает геномные положения в сантиморганах (cM); и 1,5 LoD представляет собой интервал опоры 1,5-LOD (область, где показатель LOD находится в пределах 1,5 от максимального значения) и указывает на наиболее вероятную локализацию QTL.

Следовательно, существует потребность в новом геномно-кодируемом гене устойчивости, который придает устойчивость к тропическим видам галловых нематод *Meloidogyne incognita* как моногенный доминантно наследуемый признак. Предпочтительно, чтобы такой ген устойчивости сообщал устойчивость не только к *Meloidogyne incognita*, но и к множеству видов тропических галловых нематод, а в частности, *Meloidogyne arenaria* и *Meloidogyne incognita*, поскольку такую геномно закодированную устойчивость можно легко комбинировать с устойчивостью к *Meloidogyne javanica*, известной и описанной ранее, для получения растения моркови, устойчивого ко всем трем видам тропических галловых нематод. Наиболее предпочтительно, чтобы новый геномно кодируемый ген устойчивости придавал устойчивость ко всем трем видам тропических галловых нематод, то есть, к *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* и *Meloidogyne javanica*.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего изобретения, среди прочих, является создание растений моркови или растений *Daucus carota*, устойчивых к тропическим видам галловых нематод *Meloidogyne incognita*; более предпочтительно, к видам тропических галловых нематод *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne arenaria*; а наиболее предпочтительно, ко всем трем тропическим галловым нематодам *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne Arenaria* и *Meloidogyne javanica*.

Настоящее изобретение удовлетворяет вышеуказанной цели, среди прочих целей, изложенных в прилагаемой формуле изобретения.

В частности, эта цель, среди прочих, достигается, согласно первому аспекту, путем создания растения моркови, устойчивого к тропическим галловым нематодам и имеющего на хромосоме 4 первый геномный фрагмент, сообщающий устойчивость к тропическим

галловым нематодам, где указанный первый геномный фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23. Неопределенный артикль «а» или «an» может использоваться взаимозаменяемо в словосочетаниях «один или несколько» или «по меньшей мере один». Таким образом, артикль «а» означает один, два, три, четыре, пять, шесть или более или все. Предпочтительно, первый геномный фрагмент устойчивости к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4 содержит SEQ ID No. 9; более предпочтительно SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; более предпочтительно SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19 и SEQ ID No. 21; а наиболее предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23. Первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, не состоит из SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 24.

Тропическая галловая нематода определяется как группа, состоящая из трех видов тропических галловых нематод: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne Arenaria* и *Meloidogyne javanica*; предпочтительно *Meloidogyne incognita* и *Meloidogyne Arenaria*; а наиболее предпочтительно *Meloidogyne incognita*.

Морковь представляет собой растение вида *Daucus carota*; предпочтительно культурное растение морковь; а наиболее предпочтительно растение морковь, выращиваемое в коммерческих целях.

Альтернативно, эта цель, среди прочих, достигается путем получения устойчивого к тропическим галловым нематодам растения моркови, содержащего два геномных фрагмента, обеспечивающих устойчивость к тропическим галловым нематодам, где первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, расположен на хромосоме 4 и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23; и где второй геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, выбран из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39. Предпочтительно, первый геномный фрагмент с устойчивостью к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4 содержит SEQ ID No. 9; более предпочтительно SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; более

предпочтительно SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 11; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19 и SEQ ID No. 21; а наиболее предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23. Первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, не состоит из SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 22 и SEQ ID No. 24. Предпочтительно, второй геномный фрагмент с устойчивостью к тропическим галловым нематодам на хромосоме 8 содержит SEQ ID No. 31, более предпочтительно SEQ ID No. 31 и SEQ ID No. 33.; более предпочтительно SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 37; еще более предпочтительно SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39; а наиболее предпочтительно SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39.

Следовательно, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, растение морковь, устойчивое к тропическим галловым нематодам, содержит SEQ ID No. 9 и SEQ ID No. 31; более предпочтительно SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 31 и SEQ ID No. 33; более предпочтительно SEQ ID No.5, SEQ ID No.7, SEQ ID No.9, SEQ ID No.11, SEQ ID No. 31 и SEQ ID No. 33; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID № 31, SEQ ID № 33 SEQ ID No. 35 и SEQ ID No. 37; еще более предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39; а наиболее предпочтительно SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15 SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения, первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, получают, выделяют или продуцируют из растения моркови, репрезентативные семена которого депонированы в NCIMB (Национальной Коллекции промышленных, пищевых и морских бактерий); 5 NCIMB Limited, Ferguson Building; Craibstone Estate, Bucksburn Aberdeen, Scotland, AB21 9YA United Kingdom) 9 июня 2021 года под депозитарным номером NCIMB 43792.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения, растение морковь обладает цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС).

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления изобретения, растение морковь согласно изобретению представляет собой гибридное растение морковь, более предпочтительно стерильное гибридное растение морковь, а наиболее предпочтительно гибридное растение морковь с мужской стерильностью, например, цитоплазматической мужской стерильностью.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу идентификации геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, и обнаруженного в растении моркови согласно изобретению. Этот способ включает стадии выделения или получения геномной нуклеиновой кислоты растения моркови и идентификации в геномной нуклеиновой кислоте первого геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4 путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23.

Предпочтительно, способ согласно изобретению включает необязательную стадию дальнейшей идентификации в геномной нуклеиновой кислоте второго геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам на хромосоме 8, путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39.

Существует несколько распространенных методов генотипирования для обнаружения полиморфизма по одному нуклеотиду (SNP) в геномной последовательности, включая методы на основе ПЦР, прямую гибридизацию, анализ фрагментов и секвенирование. Примером метода, подходящего для обнаружения геномной последовательности, является выделение ДНК из доступного растительного материала (например, из кусочка листа растения или семени) с последующей амплификацией нуклеиновой кислоты, а именно, выделенной ДНК (например, с помощью ПЦР) и детектированием присутствия указанной геномной последовательности (например, путем секвенирования, оценки флуоресценции или визуализации и анализа методом ПЦР-амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения растения моркови согласно изобретению, включающему стадии:

а) получения растения моркови, не содержащего первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4 растения моркови;

б) скрещивания растения моркови с растением моркови, содержащим первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4 растения моркови; получения семян после указанного скрещивания и проращивания семян для получения растения моркови;

с) выделения геномной нуклеиновой кислоты из растения моркови и идентификации в геномной нуклеиновой кислоте геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4 растения моркови путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No.3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No.7, SEQ ID No.9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23.

Предпочтительно, способ согласно изобретению включает необязательную стадию дальнейшей идентификации в геномной нуклеиновой кислоте второго геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 8 растения моркови, путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 35, SEQ ID No. 37 и SEQ ID No. 39.

Настоящее изобретение также относится к способу получения растения моркови согласно изобретению, включающему стадии получения растения моркови, не содержащего первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4 указанного растения моркови; введения в указанное растение морковь первого геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, как было обнаружено в растении моркови согласно изобретению, где указанный геномный фрагмент не вводится посредством основного биологического процесса.

Мутагенез, трансформация с помощью *Agrobacterium* или CRISPR/Cas могут быть применены для введения первого геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, посредством неосновного биологического процесса.

Подходящие методы мутагенеза включают химический мутагенез (например, с использованием этилметансульфоната (EMS), N-метил-N-нитрозомочевина (MNU), N-этил-N-нитрозомочевина (ENU), азид натрия (NaN_3), метилнитрозогуанидина (MNNG), диэтилсульфоната (DES), TILLING или посредством мутагенеза путем генерации активных форм кислорода) и лучевой мутагенез (например, с использованием УФ-излучения или облучения ионными пучками). Мутагенез может приводить к одной или нескольким мутациям, локализованным в кодирующей последовательности (мРНК, кДНК или геномной последовательности) или в связанной некодирующей последовательности и/или регуляторной последовательности, регулирующей уровень экспрессии кодирующей последовательности. Наличие одной или нескольких мутаций (например, инсерции, инверсии, делеции и/или замены одного или нескольких нуклеотидов) может приводить к тому, что кодируемый белок будет иметь новую или измененную функциональность (усиление функции), пониженную функциональность (снижение функции) или у него будет отсутствовать функциональность (потеря функции), например, из-за усечения белка или наличия аминокислотной последовательности, в которой одна или несколько аминокислот будут удалены, встроены или заменены. Такие изменения могут приводить к

тому, что белок будет иметь другую трехмерную структуру или конформацию, будет нацеливаться на другой субклеточный компартмент, будет иметь один или несколько модифицированных каталитических доменов, и будет иметь модифицированную активность связывания с нуклеиновыми кислотами или белками и т.п.

Альтернативно, устойчивость согласно изобретению может быть сообщена растительной клетке путем трансформации (например, с использованием *Agrobacterium tumefaciens*). Геномные фрагменты могут быть амплифицированы с помощью ПЦР-амплификации на больших диапазонах, синтезированы *de novo* или выделены из гелей или колонок (например, после расщепления рестрикирующими ферментами). Полученные фрагменты могут быть повторно собраны (например, в дрожжах) или введены в экспрессионный вектор, а затем трансформированы в клетки растения моркови для интеграции или рекомбинации с геномом растения моркови. Фрагмент может быть введен в одну стадию или путем проведения серии трансформаций, что в конечном итоге позволит получить растение моркови, обладающее устойчивостью согласно изобретению.

Альтернативно, система CRISPR/Cas9 может быть использована для сообщения растению моркови устойчивости к тропическим галловым нематодам путем обеспечения надежных и точных целевых модификаций генома, а также скрининга на основе CRISPR, например, с использованием объединенных библиотек рРНК с полным охватом и распределением по всему геному моркови и мутагенеза всего генома.

Согласно своему второму аспекту, настоящее изобретение также относится к семени, из которого может быть выращено растение согласно изобретению.

Семена могут быть покрыты материалом для покрытий, окрашены, промыты, отполированы, покрыты специальной коркой, гранулированы, загрунтованы или подвергнуты комбинированной обработке. Семена с покрытием имеют относительно тонкий слой полимера, наносимого на семя; и к этому полимеру можно добавить фунгициды или инсектициды для защиты семян от почвенных патогенов и повреждения насекомыми. Дополнительно можно добавить краситель. Этот дополнительный цвет дает фермеру возможность проверить правильность глубины посева семян. В качестве альтернативы можно добавить и другие полезные соединения в качестве микроэлементов или полезных микроорганизмов, способствующих росту молодых саженцев. Инкрустированные семена не только покрывают полимером с добавлением или без добавления дополнительных веществ, как описано выше, но они также могут иметь гладкую поверхность. Это облегчает сев, а дополнительный вес обеспечивает более точный прямой посев семян. Полировка удаляет внешний слой семени, и семя принимает более округлую форму. Полировка и промывка способствуют прорастанию семян. При гранулировании, семена покрывают большим количеством материала, например, глины, связанной с полимером, для получения круглых гранул правильной формы. Эта гранула, помимо наличия описанных выше защитных веществ, может быть сконструирована таким образом, что она будет расплавляться или расщепляться после поглощения воды. Грунтовка или предварительное прорастание представляет собой обработку, при которой

семенам дают достаточно влаги, чтобы инициировать прорастание зародыша внутри семени. Это приводит к более быстрому появлению всходов, более высокой скорости всходов и лучшему росту. Считается, что грунтовка приводит к улучшению корневой системы и к более быстрому росту.

Согласно своему третьему аспекту, настоящее изобретение дополнительно относится к растительной клетке, к протопласту, к органу растения, к ткани растения, к съедобным частям, пыльце, микроспорам, завязям, семяпочкам, яйцеклеткам, каллусу, суспензионной культуре, соматическим зародышам, эмбрионам, или к частям растений согласно изобретению, устойчивым к тропическим галловым нематодам. Части растения включают, но не ограничиваются ими, побег, стебель, ствол, листья, цветки, соцветия, корни, плоды и черенки.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23, для идентификации или обеспечения первого геномного фрагмента, сообщающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, как было обнаружено в растении моркови, репрезентативные семена которого были депонированы под депозитарным номером NCIMB 43792. Неопределенный артикль «а» или «an» может также использоваться как «один или несколько» или «по меньшей мере один». Таким образом, артикль «а» означает один, два, три, четыре, пять, шесть или более или все. Последовательности нуклеиновой кислоты тесно связаны с первым геномным фрагментом, обеспечивающим устойчивость к тропическим галловым нематодам, и могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров, например, при селекции с использованием молекулярных маркеров. Селекция с помощью молекулярных маркеров значительно повышает эффективность и точность селекции растений и включает несколько современных стратегий селекции, включая селекцию с помощью маркеров, возвратное скрещивание с помощью маркеров, рекуррентную селекцию с помощью маркеров и полногеномную селекцию или геномную селекцию.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, которые совместно сегрегируют с первым геномным фрагментом, обеспечивающим устойчивость к тропическим галловым нематодам, и которые указаны под депозитарным номером NCIMB 43792, где эти последовательности нуклеиновой кислоты выбраны из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 21 и SEQ ID No. 23.

Настоящее изобретение также подробно описано в нижеследующих примерах.

Примеры

Пример 1. Мутагенез растений моркови для сообщения им устойчивости к тропическим галловым нематодам.

Неспецифический мутагенез с последующим прямым скринингом представляет собой подходящий метод выявления мутантных растений моркови, устойчивых к тропическим галловым нематодам. Мутагенизированная библиотека может быть создана путем обработки семян в стадии мутагенеза, а предпочтительно, неспецифического мутагенеза. Такая стадия может включать, помимо прочего, обработку пула из 100000-200000 семян химическим мутагеном или смесью химических мутагенов, например, 0,25% EMS, в течение 16 часов при комнатной температуре; альтернативно может быть использовано облучение (например, гамма-излучение от радиоактивного источника кобальта-60). Предпочтительно, создают только слегка мутагенизированную библиотеку (где менее 1% всех генов содержат мутацию в кодирующей области). Тем не менее, стадия мутагенеза будет приводить к потере всхожести некоторых семян. В отличие от облучения, которое может приводить к мутациям, варьирующимся от замен или делеций одного основания до крупных делеций, EMS вызывает преимущественно неспецифические точковые мутации в результате замены нуклеотидов, а особенно, алкилирования гуанина.

Мутагенизированные семена можно высевать и размножать в поле с применением стандартных методов. Из мутагенизированных семян образуются растения, каждое из которых имеет определенный набор мутаций. Растения можно собирать в бассейнах и снова высевать жизнеспособные семена (популяцию F1). Для получения популяции F1S1, семена можно собрать с растений F1 после самоопыления. Поскольку мутации будут сегрегироваться в популяции F1S1, то устойчивость этой популяции можно оценить и использовать для картирования устойчивости к тропическим галловым нематодам.

Пример 2. Общий протокол оценки устойчивости

Четырехнедельные растения моркови пересаживают в горшки, наполненные мелким белым песком. Через неделю после пересадки, растения проверяют на устойчивость к тропической галловой нематоды путем впрыскивания 1 мл среды для инокуляции, содержащей 2000-2500 яиц тропической галловой нематоды/мл, рядом с корневой системой на глубину 0,5 см. Растения не поливают в течение 48 часов после инокуляции, чтобы предотвратить смыв яиц тропических галловых нематод.

Через восемь-десять недель после инокуляции, растения оценивают на тяжесть заражения тропическими галловыми нематодами. Растения выкорчевывают, и корневую систему промывают водопроводной водой, чтобы удалить почву и мелкий белый песок. После промывки, растения помещают на пять минут в 10%-ный раствор кармина для окрашивания. Впоследствии, количество галлов подсчитывают под микроскопом. Максимальное количество галлов, подсчитанное на одно растение, составляет 50. Затем тщательно проверяют, чтобы удостовериться, что восприимчивые контрольные растения действительно демонстрируют ожидаемые симптомы заражения тропическими галловыми нематодами, а устойчивые контрольные растения не обнаруживают заражения. Для каждого образца рассчитывают среднее количество галлов (AVG), а также стандартное отклонение (STD), и процент растений только с 2 галлами или менее ($\% \leq 2$) или 5 галлами

или менее ($\% \leq 5$) означает, что все эти указанные значения соответствуют уровню устойчивости.

Пример 3. Результаты оценки устойчивости к тропической галловой нематоды

Таблица 2. Несколько источников устойчивости были протестированы на различных популяциях, включая источники, описанные в литературе. Mi-WU-1 представляет собой популяцию *Meloidogyne incognita*, полученную от группы нематологов Университета Вагенингена. MAU представляет собой популяцию *Meloidogyne Arenari*, полученную из Северной Америки. Для каждого условия тестировали минимум 10 растений.

	Популяция	AVG	STD	$\% \leq 2$	$\% \leq 5$
Sus 1	Mi-WU-1	50,0	0,0	0%	0%
Sus 2	Mi-WU-1	42,1	13,8	0%	0%
Res	Mi-WU-1	2,4	2,8	50%	88%
SFF	Mi-WU-1	7,3	7,6	32%	56%
Homs	Mi-WU-1	12,5	11,4	15%	32%
Sus 1	MAU	16,0	8,5	0%	13%
Sus 2	MAU	35,6	11,2	0%	0%
Res	MAU	0,2	0,7	94%	100%
SFF	MAU	0,6	0,7	100%	100%
Homs	MAU	0,2	0,4	100%	100%

Объяснение используемых сокращений: AVG - среднее количество подсчитанных галлов на растение под микроскопом; STD - стандартное отклонение количества галлов, подсчитанных на одно растение под микроскопом; $\% \leq 2$ - процент растений, у которых было 2 или менее галлов; $\% \leq 5$ - процент растений, у которых было 5 или менее галлов.

Пример 4: Молекулярная характеристика геномной ДНК и картирование генов устойчивости

С применением генетического ресурса устойчивости, называемого здесь Res, была создана популяция F1S1 путем скрещивания источника устойчивости с линией моркови sus 1, после чего полученное растение F1 подвергалось самоопылению.

По меньшей мере 2000 семян было собрано из поколения F1S1, полученного в результате скрещивания сорта моркови с отличительным источником устойчивости и линии sus 1. Для проведения QTL-картирования, 240 растений после этого скрещивания были протестированы с изолятом Mi-WU-1. Материал листьев каждого отдельного растения использовали для выделения ДНК и последующего маркерного анализа.

С использованием маркеров SNP, охватывающих весь геном, был обнаружен QTL на хромосоме 4 (C4). Этот QTL определяется маркерами SNP, перечисленными в Таблице ниже.

Таблица 3. SNP для детектирования геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4. Геномное положение каждого SNP определяли с использованием опубликованной сборки генома PRJNA268187 *Daucus carota* Ver2.

SNP	ID	Хромосома	Положение на хромосоме (п.о.)	Аллель, связанный с устойчивостью	Альтернативный аллель
1	9847	4	10231839	G	A
2	6624	4	10367643	C	A
3	9848	4	10375226	A	G
4	9849	4	10503519	C	T
5	6873	4	10507269	C	T
6	9850	4	10627267	A	G
7	6524	4	10667421	A	G
8	8738	4	10674185	T	C
9	2281	4	10705926	T	G
10	8363	4	10734365	C	T
11	9851	4	10753940	T	G
12	7147	4	10957339	A	G

Таблица 4. Последовательности для выявления устойчивости к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4. Геномное положение каждого SNP определяли с использованием опубликованной сборки генома PRJNA268187 *Daucus carota* Ver2. Коды оснований нуклеотидов соответствуют коду Международного Союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) (см. Таблицу 5).

SEQ ID No.	SNP	Геномное положение SNP*	Последовательность нуклеиновой кислоты
1	1	CHR4_10231839	TGTTTGAGACTCWACTCTTCTCCTTTAC CAACGAAAGTTTTATTTGTGA[G]CAATC TTTCATGTCAAACCTAGCAAGTACCTTC TCAATATGGCTCTTTTA
2	1	CHR4_10231839	TGTTTGAGACTCWACTCTTCTCCTTTAC CAACGAAAGTATTTATTTGTGA[A]CAAT CTTTCATGTCAAACCTAGCAAGTACCTT CTCAATATGGCTCTTTTA
3	2	CHR4_10367643	TCCTATCTCTCTCCTCCTCACAATCCTT CCCATTCT[C]CACTCCTTACCAGCCATA CCAGACCCAACCACA
4	2	CHR4_10367643	TCCTATCTCTCTCCTCCTCACAATCCTT CCCATTCT[A]CACTCCTTACCAGCCATA CCAGACCCAACCACA
5	3	CHR4_10375226	ATTATACTTATACTTGTTTAAATATGTG GTAACCTTTGGGTGCCAATCACT[A]GAGC AAATTTTTATGTAAAAGTTGTCAAAAAT ACAAACAAGRGAGAGAA
6	3	CHR4_10375226	ATTATACTTATACTTGTTTAAATATGTG GTAACCTTTGGGTGCCAATCACT[G]GAGC AAATTTTTATGTAAAAGTTGTCAAAAAT

			ACAAACAAAGRGAGAGAA
7	4	CHR4_10503519	CTTCACAACACTATTTACHAAGTAATTTAA AACTTCTTTAATCTGTGAAGCT[C]GATA TCTTATTGCTTTTAACTCCTATAACCCG ACWTTCTCAACATATTTCT
8	4	CHR4_10503519	CTTCACAACACTATTTACHAAGTAATTTAA AACTTCTTTAATCTGTGAAGCT[T]GATA TCTTATTGCTTTTAACTCCTATAACCCG ACWTTCTCAACATATTTCT
9	5	CHR4_10507269	CGACCAATGATATCAGTTTTTTTCGACG ATAATAATCT[C]GGGTCGTTAGAATTGG ATTCTCTCTGGACTTGA
10	5	CHR4_10507269	CGACCAATGATATCAGTTTTTTTCGACG ATAATAATCT[T]GGGTCGTTAGAATTGG ATTCTCTCTGGACTTGA
11	6	CHR4_10627267	TTATATACTGTATAAAAACAATGATTAGT GCAACAAAAATTAGTGATAGTC[A]TAG TTATAAATACTGGTAAGGAACTAGTTT TTAGTTTGTATTTAAGAGT
12	6	CHR4_10627267	TTATATACTGTATAAAAACAATGATTAGT GCAACAAAAATTAGTGATAGTC[G]TAG TTATAAATACTGGTAAGGAACTAGTTT TTAGTTTGTATTTAAGAGT
13	7	CHR4_10667421	ATCCGTCAATTAGAAAAAGTTAAAAAA CACTCTCTCT[A]GACACCCATTCTCATT TGAAGCAACACGTGATG
14	7	CHR4_10667421	ATCCGTCAATTAGAAAAAGTTAAAAAA CACTCTCTCT[G]GACACCCATTCTCATT TGAAGCAACACGTGATG
15	8	CHR4_10674185	GCTACAACCTTTTATCTTTTTTCAGTCTTTA CATGAAGTAMTAGCCGTAAAT[T]TTKC AAGCCAAAGGTGCAACACATTGTAGAC TCGACAATATCTTTCACTC
16	8	CHR4_10674185	GCTACAACCTTTTATCTTTTTTCAGTCTTTA CATGAAGTAMTAGCCGTAAAT[C]TTKC AAGCCAAAGGTGCAACACATTGTAGAC TCGACAATATCTTTCACTC
17	9	CHR4_10705926	CACTTGTCCTGAAGAATGTCAAGGCAA ATATTCCATACTGGTCAACATT[T]GGAT GGAAGCACATTGTCTCAAACCTCACTTG GGGAGGCTTGAAAGGATA
18	9	CHR4_10705926	CACTTGTCCTGAAGAATGTCAAGGCAA ATATTCCATACTGGTCAACATT[G]GGAT GGAAGCACATTGTCTCAAACCTCACTTG GGGAGGCTTGAAAGGATA

19	10	CHR4_10734365	TAAGGCTTGCRTTGGMTTAAARAGTTGC AGCATCGACGTATCAGTGTCAA[C]TTTT GGGAATCCGTGTAGAGGAGTTACAAAG AGTTTAGCAGTAGAAGCWT
20	10	CHR4_10734365	TAAGGCTTGCRTTGGMTTAAARAGTTGC AGCATCGACGTATCAGTGTCAA[T]TTTT GGGAATCCGTGTAGAGGAGTTACAAAG AGTTTAGCAGTAGAAGCWT
21	11	CHR4_10753940	ATGACACCAACACGGTGAAAGTCAGTG TATCTGGCCTTTTGGAGGTGGAT[T]TGA AGGTGACTCCAATAAAAAGAAAAGGAAA ACAAGGTGCACAACCTACCAG
22	11	CHR4_10753940	ATGACACCAACACGGTGAAAGTCAGTG TATCTGGCCTTTTGGAGGTGGAT[G]TGA AGGTGACTCCAATAAAAAGAAAAGGAAA ACAAGGTGCACAACCTACCAG
23	12	CHR4_10957339	CCATACCCATTCTTTTCAAATGAAAATG CAAAACAGA[A]GTCCTCCAGTAGCTCTC TACCTGCATTTGACAA
24	12	CHR4_10957339	CCATACCCATTCTTTTCAAATGAAAATG CAAAACAGA[G]GTCCTCCAGTAGCTCTC TACCTGCATTTGACAA

* CHR4=хромосома 4

Таблица 5. Коды оснований нуклеотидов согласно коду Международного Союза теоретической и прикладной химии (IUPAC).

Символ	Нуклеотидное основание
A	Аденин
C	Цитозин
G	Гуанин
T	Тимин
N	А или С или G или Т
M	А или С
R	А или G
W	А или Т
S	С или G
Y	С или Т
K	Г или Т
V	Не Т
H	Не G
D	Не С

В	Не А
---	------

Пример 5: *QTL на C4 не относится к аллелю устойчивости на хромосоме 4, ранее обнаруженной в SFF*

Несколько отдельных растений линии SFF были использованы для скрещивания с линией моркови sus 1. Эти отдельные растения также были самоопыляемыми. Потомство проверяли на устойчивость. Самоопыление отдельных растений SFF все еще демонстрировало уровень устойчивости, тогда как все гибриды были полностью восприимчивыми.

Напротив, когда аналогичные скрещивания были сделаны с растениями Res, то потомство самоопылений показало высокий уровень устойчивости. Кроме того, гибриды, полученные путем скрещивания с восприимчивыми линиями моркови sus 1 и sus 2, все еще демонстрировали определенный уровень устойчивости.

Из этих тестов стало ясно, что ранее описанный QTL на C4, полученный из SFF, не обеспечивает какого-либо уровня устойчивости, если он присутствует в гетерозиготной форме, в отличие от QTL, полученного из Res.

Таблица 6. Несколько самоопылений SFF и Res, а также скрещивания с восприимчивыми линиями моркови были протестированы на популяции *Meloidogyne incognita*, полученной от группы нематологов Университета Вагенингена (Mi-WU-1).

<i>Название</i>	<i># растений</i>	<i>AVG</i>	<i>STD</i>	<i>% ≤ 2</i>	<i>% ≤ 5</i>
Res*Res	6	1,8	0,8	83%	100%
Sus 1*Sus 1	8	50,0	0,0	0%	0%
Sus 2*Sus 2	8	42,1	13,8	0%	0%
Sus 1*Res (C4)	235	15,1	9,6	2%	15%
SFF*SFF	10	8,0	4,1	10%	20%
Sus 1*SFF	14	50,0	0,0	0%	0%

Объяснение используемых сокращений: # растений означает количество протестированных растений, AVG - среднее количество подсчитанных галлов на растение под микроскопом; STD - стандартное отклонение количества галлов, подсчитанных на одно растение под микроскопом; % ≤ 2 - процент растений, у которых было 2 или менее галлов; % ≤ 5 - процент растений, у которых было 5 или менее галлов.

Пример 6: *QTL на C4 можно комбинировать с QTL на C8 для дальнейшего повышения устойчивости.*

Ранее в литературе было описано несколько форм устойчивости к *Meloidogyne javanica* и *Meloidogyne incognita* (например, Parsons *et al.* 2015). Поскольку QTL на хромосоме 8 (C8), обозначаемый как Mj-1, был описан как моногенный доминантный признак, который придает устойчивость к *Meloidogyne javanica* и частичную устойчивость, то растения, имеющее геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам на C4 и C8, были объединены и протестированы на устойчивость, чтобы определить, дает ли это еще более надежную устойчивость к тропическим галловым нематодам.

Испытания показали, что устойчивость к тропическим галловым нематодам была дополнительно улучшена за счет объединения QTL на C4 и C8.

Таблица 7. Растения моркови с QTL на C4, C4 и C8 и только на C8 тестировали на устойчивость к галловой нематоды. Mi-WU-1 представляет собой популяцию *Meloidogyne incognita*, полученную от группы нематологов Университета Вагенингена. MAU представляет собой популяцию *Meloidogyne Arenaria*, происходящую из Северной Америки.

ID	Локус	Изолят	# растений	AVG	STD	% ≤2	% ≤5
Y9380	C4	Mi-WU-1	89	0,8	2,9	93	99
Y9381	C4,C8	Mi-WU-1	24	0,1	0,4	100	100
Y9383	C8	Mi-WU-1	176	23,0	16,1	4	10
Y9380	C4	MAU	68	1,9	3,7	74	97
Y9381	C4,C8	MAU	18	0,2	0,7	95	100
Y9383	C8	MAU	176	7,0	9,3	42	61

Объяснение используемых сокращений: # растений - количество протестированных растений, AVG - среднее количество подсчитанных галлов на растение под микроскопом; STD - стандартное отклонение количества галлов, подсчитанных на одно растение под микроскопом; % ≤2 - процент растений, у которых было 2 или менее галлов; % ≤5 - процент растений, у которых было 5 или менее галлов.

Маркеры SNP использовали для обнаружения геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам на C8, а также для идентификации и получения растений, несущих этот фрагмент, обеспечивающий такую устойчивость.

Таблица 8. SNP для обнаружения геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам на на хромосоме 8. Геномное положение каждого SNP определяли с использованием опубликованной сборки генома PRJNA268187 *Daucus carota* Ver2.

SNP	ID	Хромосома	Положение на хромосоме (п.о.)	Аллель, связанный с устойчивостью	Альтернативный аллель
13	7136	8	17676345	C	G
14	6692	8	17781631	G	A
15	4421	8	17968674	C	A
16	6419	8	18836406	G	C
17	5095	8	21101599	T	C
18	4255	8	21235813	A	G
19	5020	8	21254357	T	C
20	4441	8	21422127	C	T

Таблица 9. Последовательности для выявления устойчивости к тропическим галловым нематодам на хромосоме 8. Геномное положение каждого SNP определяли с использованием опубликованной сборки генома PRJNA268187 *Daucus carota* Ver2. Коды оснований нуклеотидов соответствуют коду Международного Союза теоретической и

прикладной химии (IUPAC) (см. Таблицу 5).

SEQ ID No.	SNP	Геномное положение SNP*	Последовательность нуклеиновой кислоты
25	13	CHR8_17676345	AAACATTAAACTTGGCGGATGATGATA TATATAATGC[C]GTGCTACTTGTTGCAG CTGCTTATAATCACTTT
26	13	CHR8_17676345	AAACATTAAACTTGGCGGATGATGATA TATATAATGC[G]GTGCTACTTGTTGCAG CTGCTTATAATCACTTT
27	14	CHR8_17781631	GATCGAAGGGGGTGC GGCCAGAGGTCT TTGCCCCGAGC[G]TATGCCGTGTCTTCTC CTCGTACTTGTCCCTT
28	14	CHR8_17781631	GATCGAAGGGGGTGC GGCCAGAGGTCT TTGCCCCGAGC[A]TATGCCGTGTCTTCTC CTCGTACTTGTCCCTT
29	15	CHR8_17968674	CTCTCGGRACCCACACCAATTACCCTAC GAACTTTCTC[C]TCGAAGAGTACTACAC ATGTTTTTGCTGCCTCA
30	15	CHR8_17968674	CTCTCGGRACCCACACCAATTACCCTAC GAACTTTTCTC[A]TCGAAGAGTACTACA CATGTTTTTGCTGCCTCA
31	16	CHR8_18836406	GAGAATCTGCCGTACGGCGTGTTC AAG CCTGACGAAT[G]TTCGGCACCTCGACCT GGCGTTGCTATCGGRGA
32	16	CHR8_18836406	GAGAATCTGCCGTACGGCGTGTTC AAG CCTGACGAAT[C]TTCGGCACCTCGACCT GGCGTTGCTATCGGRGA
33	17	CHR8_21101599	GCCAAAGGCTACTACAAAGTGGTTGCA AGTTTCAAAA[T]TGATGCACAAGGGTG CTGTGTCAAGTGAAGATC
34	17	CHR8_21101599	GCCAAAGGCTACTACAAAGTGGTTGCA AGTTTCAAAA[C]TGATGCACAAGGGTG CTGTGTCAAGTGAAGATC
35	18	CHR8_21235813	GAAAATATCATCGCCACGAGATAATTTT TGCTGATCA[A]CAAAGACTTGAGAGTA ACATTCGACTTCCCGTG
36	18	CHR8_21235813	GAAAATATCATCGCCACGAGATAATTTT TGCTGATCA[G]CAAAGACTTGAGAGTA ACATTCGACTTCCCGTG
37	19	CHR8_21254357	TTTTACATAGTTACAATTAGAAATTCAG ATCCCCACCT[T]TTAGACTCCAACCTCT CCGGCTAACTTCAAAGG
38	19	CHR8_21254357	TTTTACATAGTTACAATTAGAAATTCAG ATCCCCACCT[C]TTAGACTCCAACCTCT CCGGCTAACTTCAAAGG

39	20	CHR8_21422127	TACAACCTCGATGCCTTATATATCACGAAA AAGAACTCTT[C]AAGGCAGAAGCAAAA TATTGGAATGAAATAATA
40	20	CHR8_21422127	TACAACCTCGATGCCTTATATATCACGAAA AAGAACTCTT[T]AAGGCAGAAGCAAAA TATTGGAATGAAATAATA

* CHR8=хромосома 8

Пример 7: Сообщение растению моркови устойчивости к тропическим галловым нематодам с использованием *Agrobacterium*.

Трансформацию растений с использованием системы *Agrobacterium tumefaciens* обычно проводят для получения растений, устойчивых к патогенам, путем введения в растения генов устойчивости. Система *Agrobacterium tumefaciens* также может быть использована для введения геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропическим галловым нематодам согласно изобретению. Такой фрагмент выделяют из гелей или из колонок после рестрикционного расщепления растения моркови, содержащего первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам. Расщепленный фрагмент может быть введен в одну стадию или при проведении серии трансформаций с использованием *Agrobacterium tumefaciens* в клетки растения моркови. После трансформации, стабильные трансформанты, обладающие устойчивостью согласно изобретению, будут выбраны путем проведения теста на заболевание или путем определения присутствия геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость, с использованием молекулярных маркеров.

Информация о депозите:

Образцы семян упомянутых выше источников устойчивости были депонированы в NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, AB21 9YA) 9 июня 2021 года под номером NCIMB 43792.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение морковь, устойчивое к тропическим галловым нематодам и содержащее на своей хромосоме 4 первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, где указанный первый геномный фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23.

2. Растение морковь по п. 1, дополнительно содержащее второй геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, на своей хромосоме 8, где указанный второй геномный фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 и 39.

3. Растение морковь по п. 1 или 2, где первый геномный фрагмент, обеспечивающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, получают, выделяют или продуцируют из растения моркови, репрезентативные семена которого депонированы под депозитарным номером NCIMB 43792.

4. Растение морковь по любому из пп. 1-3, где указанное растение морковь обладает цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС).

5. Растение морковь по любому из пп. 1-4, где указанное растение морковь представляет собой гибридное растение.

6. Растение морковь по любому из пп. 1-5, где указанное растение морковь представляет собой растение морковь, репрезентативные семена которого депонированы под депозитарным номером NCIMB 43792.

7. Способ идентификации геномного фрагмента, сообщающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, где указанный способ включает стадии:

а) выделения или получения геномной нуклеиновой кислоты растения моркови;

б) идентификации в указанной геномной нуклеиновой кислоте геномного фрагмента, сообщающего устойчивость к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4, путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23; и

с) необязательно, дополнительной идентификации в указанной геномной нуклеиновой кислоте второго геномного фрагмента, сообщающего устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 8, путем обнаружения последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 и 39.

8. Способ получения растения моркови, устойчивого к тропическим галловым нематодам, включающий стадии:

а) получения растения моркови, не содержащего первый геномный фрагмент, сообщающий устойчивость к тропическим галловым нематодам на хромосоме 4 указанного растения моркови;

б) скрещивания указанного растения моркови с растением морковью по любому из

пп.1-6;

с) получения семян от указанного скрещивания и проращивания указанных семян для получения растения моркови;

д) выделение геномной ДНК из указанного растения моркови и идентификации в геноме указанного растения моркови последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23; и

е) необязательно, дополнительной идентификации в геноме указанного растения моркови последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 и 39.

9. Способ получения растения моркови, устойчивого к тропическим галловым нематодам, по любому из пп. 1-6, где указанный способ включает стадии:

а) получения растения моркови, не содержащего первый геномный фрагмент, сообщающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, на хромосоме 4 указанного растения моркови; и

б) введения в указанное растение морковь первого геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропической галловой нематоде, и обнаруженного в растении моркови, репрезентативные семена которого депонированы под депозитарным номером NCIMB 43792, где указанный геномный фрагмент не вводят посредством основного биологического процесса.

10. Способ по п. 9, где указанный способ такого обеспечения устойчивости включает стадию мутагенеза, трансформации с помощью *Agrobacterium* или CRISPR/Cas.

11. Семена растения моркови по любому из пп. 1-6, содержащие первый геномный фрагмент, сообщающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, где указанный первый геномный фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23; и, предпочтительно, второй геномный фрагмент, сообщающий устойчивость к тропическим галловым нематодам, где указанный второй геномный фрагмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No. 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 и 39.

12. Семена по п.11, где указанные семена были отполированы, покрыты материалом для покрытий, покрыты коркой, гранулированы или загрунтованы.

13. Части растений, а предпочтительно съедобные части, каллус, суспензионная культура или клоны растения моркови по любому из пп. 1-6.

14. Применение последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23, для идентификации или получения первого геномного фрагмента, обеспечивающего устойчивость к тропической галловой нематоде, и обнаруженного в растении моркови, репрезентативные семена которого депонированы под депозитарным номером NCIMB 43792.

15. Последовательность нуклеиновой кислоты, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 и 23.

