



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84548 (13) C2

(51) МПК (2006)

A01H 5/00

A01H 1/00

A01H 5/10

C12N 15/09

C12Q 1/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) РОСЛИНА КАПУСТИ BRASSICA OLERACEA, СТИЙКА ДО ЗАХВОРЮВАННЯ КИЛОЮ

1

2

(21) a200501635

(22) 25.07.2003

(24) 10.11.2008

(86) PCT/EP2003/008197, 25.07.2003

(31) 0217406.8

(32) 26.07.2002

(33) GB

(46) 10.11.2008, Бюл.№ 21, 2008 р.

(72) ЛІНДЕРС ЕНРИО ГЕРАРДУС АЛЬБЕРТУС,  
ТЖЕРТЕС ПЕТЕР, ДЕ ХААС ЙОХАННЕС МАРИЯ,  
ХУАНГ ЦІА-ЧЕНГ, CN/NL

(73) СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ

(56) WO0055340, 21.09.2000

JP9117284, 06.05.1997

CHIANG M S ET AL: "TRANSFER OF RESISTANCE  
TO RACE 2 OF PLASMIDIOPHORA-BRASSICAE  
FROM BRASSICA-NAPUS TO CABBAGE  
BRASSICA-OLERACEA-SSP-CAPITATA 5. THE  
INHERITANCE OF RESISTANCE" EUPHYTICA, vol.  
32, no. 2, 1983, pages 479-484,

MATSUMOTO ETSUO ET AL: "Linkage analysis of  
RFLP markers for clubroot resistance and  
pigmentation in Chinese cabbage (Brassica rapa ssp.  
pekinensis)" EUPHYTICA, vol. 104, no. 2, 1998,  
pages 79-86,

LANDRY B S ET AL: "A GENETIC MAP FOR  
BRASSICA-OLERACEA BASED ON RFLP  
MARKERS DETECTED WITH EXPRESSED DNA  
SEQUENCES AND MAPPING OF RESISTANCE  
GENES TO RACE 2 OF PLASMIDIOPHORA-  
BRASSICAE WORONIN" GENOME, vol. 35, no. 3,  
1992, pages 409-420,

LANDRY B.S.: "A GENETIC MAP FOR BRASSICA-  
OLERACEA BASED ON RFLP MARKERS  
DETECTED WITH EXPRESSED DNA SEQUENCES  
AND MAPPING OF RESISTANCE GENES TO RACE  
2 OF PLASMIDIOPHORA- BRASSICAE WORONIN"  
GENOME, vol. 35, no. 3, 1992, pages 409-420

(57) 1. Рослина *B. oleracea*, стійка до захворюван-  
ня килію, де ознаку стійкості одержують зі стійких  
до кили рослин *B. гара* і де ознака стійкості до ки-  
лі є моногенною та домінантною.

2. Рослина за п.1, де ураження захворюванням  
цієї рослини *B. oleracea* відповідає балу 2 або ни-  
жче при оцінці ураження, яке викликається захво-  
рюванням, за 1-9-бальною шкалою, або балу 1  
або нижче при оцінці ураження, що викликається  
захворюванням, за 0-5-бальною шкалою.

3. Рослина за п.1, де ураження захворюванням  
цієї рослини *B. oleracea* відповідає балу 1 при оцін-  
ці ураження, яке викликається захворюванням, за  
1-9-бальною шкалою, або балу 0 при оцінці ура-  
ження, яке викликається захворюванням, за 0-5-  
бальною шкалою.

4. Рослина за п.1, де рослина *B. oleracea* являє  
собою броколі, білокачанну капусту, цвітну капу-  
сту, брюссельську капусту, капусту кормову (браун-  
коль), савойську капусту або червонокачанну ка-  
пусту.

5. Рослина за п.1, де генетичний фактор, що обу-  
мовлює стійкість, зчеплений з молекулярним мар-  
кером, який можна одержувати за допомогою ПЛР-  
ампліфікації.

6. Рослина за п.1, де генетичний фактор, що обу-  
мовлює стійкість, зчеплений з молекулярним мар-  
кером, який можна одержувати за допомогою ПЛР-  
ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ  
ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2).

7. Рослина за п.5, де генетичний фактор, що обу-  
мовлює стійкість, знаходиться на відстані 10 сМ  
від молекулярного маркера.

8. Рослина за п.5, де генетичний фактор, що обу-  
мовлює стійкість, знаходиться на відстані 6 сМ від  
молекулярного маркера.

9. Рослина за п.1, де ознаку стійкості одержують з  
F1-гібрида "Parkin" китайської капусти.

10. Рослина *B. oleracea*, що несе локус, який обу-  
мовлює стійкість до захворювання килію, де озна-  
ка стійкості є моногенною та домінантною.

11. Рослина *B. oleracea*, стійка до захворювання  
килію, причому,

а) рослина є гомозиготною за ознакою стійкості і  
цю рослину, гомозиготну за ознакою стійкості,  
схрещують з рослиною-"тестером", гомозиготною  
за моногенною та домінантною ознакою стійкості

(13) C2

(11) 84548

(19) UA

до захворювання килою, і покоління рослин першої генерації, отримане в результаті схрещування, розщеплюється у співвідношенні 1:0 за ознакою стійкості до захворювання килою, і

б) відбувається самозапилення рослин покоління першої генерації, і отримане покоління рослин другої генерації розщеплюється в співвідношенні 1:0 за ознакою стійкості до захворювання килою, де рослина-“тестер” являє собою рослину, що виведена з лінії CFL66, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, і яка несе моногенну та домінуючу ознаку стійкості до кили, яка властива лінії CFL667, або нащадка або предка лінії CFL667, що несе моногенну та домінуючу ознаку стійкості до кили, яка властива лінії CFL667.

12. Рослина *B. oleracea*, стійка до захворювання килою, причому, рослина є гетерозиготною за ознакою стійкості і цю рослину, гетерозиготну за ознакою стійкості, схрещують з рослиною-“тестером”, гетерозиготною за моногенною та домінуючою ознакою стійкості до захворювання килою, і покоління рослин першої генерації, отримане в результаті схрещування, розщеплюється в співвідношенні 3:1 за ознакою стійкості до захворювання килою, де рослина-“тестер” являє собою рослину, виведену з лінії CFL66, що депонована в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, або нащадка або предка лінії CFL667, що несе моногенну та домінуючу ознаку стійкості до кили, що властива лінії CFL667, або рослину, виведену з лінії CFL667, що депонована в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, та яка несе моногенну та домінуючу ознаку стійкості до кили, що властива лінії CFL667.

13. Рослина за п.12, причому, рослини з покоління першої генерації додатково схрещують із зазначеною рослиною, гетерозиготною за ознакою стійкості, і отримане покоління рослин другої генерації розщеплюється в співвідношенні 5:1 за ознакою стійкості до захворювання килою.

14. Рослина за одним з пп.1-13, де ця рослина *B. oleracea* є гомозиготною за зазначеною ознакою стійкості.

15. Рослина за одним з пп.1-13, де ця рослина *B. oleracea* є гетерозиготною за зазначеною ознакою стійкості.

16. Рослина за одним з пп.1-13, де ця рослина *B. oleracea* є інбредною або дигаметоїдною.

17. Рослина за одним з пп.1-13, де ця рослина *B. oleracea* є гібридною.

18. Рослина за п.16 або 17, де ця рослина *B. oleracea* має цитоплазматичну чоловічу стерильність.

19. Насіння рослини за одним з пп.1-18.

20. Плід або частина рослини за одним з пп.1-18.

21. Частина рослини за одним з пп.1-18, де ця частина являє собою пилок, насінний зачаток або ембріон.

22. Застосування моногенної та домінуючої ознаки стійкості до кили для надання рослині *B. oleracea* стійкості до зазначеного захворювання.

23. Застосування за п.22, де зазначену ознаку стійкості одержують з F1-гібрида “Parkin” китайської капуста.

24. Спосіб одержання рослини *B. oleracea*, що несе моногенну та домінуючу ознаку стійкості до кили, який полягає в тому, що:

а) одержують рослину *B. гала*, стійку до кили;

б) схрещують рослину *B. гала* з рослиною *B. oleracea*,

в) здійснюють вивільнення ембріона, отриманого в результаті схрещування на стадії б);

г) здійснюють регенерацію рослини з ембріона, отриманого на стадії в);

д) відбирають рослину, отриману на стадії г), що має стійкість до кили;

е) здійснюють зворотне схрещування рослини, отриманої на стадії д) з рослиною *B. oleracea*.

25. Спосіб за п.24, в якому додатково здійснюють інтрогресію ознаки стійкості в елітну інбредну лінію *B. oleracea*.

26. Спосіб за п.25, у якому додатково схрещують зазначену інбредну лінію з іншою інбредною лінією *B. oleracea* з одержанням гібрида.

27. Рослина *B. oleracea*, яку одержують за допомогою способу за будь-яким з пп.24-26.

28. ДНК-фрагмент, ампліфікований з геному рослин роду *Brassica*, де ДНК-фрагмент складається з 640 пар основ і представлений SEQ ID NO:2, де ДНК-фрагмент дозволяє виявляти присутність домінуючої та моногенної ознаки стійкості до кили в рослині роду *Brassica*.

29. Застосування ДНК-фрагмента за п.28 для ідентифікації рослини роду *Brassica*, стійкої до кили.

30. Застосування праймера O20 (SEQ ID NO:1) для ідентифікації стійкості до кили для виявлення в геномі рослини роду *Brassica* ДНК-фрагмента, що складається з 400 пар основ, де ДНК-фрагмент дозволяє виявляти присутність домінуючої та моногенної ознаки стійкості до кили в рослині роду *Brassica*.

31. Застосування праймера Y13 (SEQ ID NO:2) для виявлення в геномі рослини роду *Brassica* ДНК-фрагмента, що складається з 640 пар основ.

32. Застосування праймера O20 або Y13 для ідентифікації рослини роду *Brassica*, стійкої до кили.

33. Застосування за одним з пп.29-32, де рослина роду *Brassica* являє собою *B. oleracea*.

34. Набір для виявлення моногенної та домінуючої ознаки стійкості до кили в рослині *B. oleracea*, що містить олігонуклеотид, представлений у SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2.

35. Спосіб перенесення моногенної та домінуючої ознаки стійкості до кили в рослину *B. oleracea*, що має чутливість або недостатній рівень стійкості до захворювання, який полягає в тому, що:

а) схрещують рослину *B. oleracea* за п.1 з рослиною *B. oleracea*, що має чутливість до кили;

б) відбирають рослину, що несе ДНК-фрагмент, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2) при наступних умовах ампліфікації:

ДНК	мкл (розведена ДНК зі стандартного міні-препарату)	
Праймер (10 мкМ)	1,0 мкл	
дНТФ (2,5 мМ)	2,0 мкл	
10-кратний буфер Platinum Taq	2,5 мкл (200 мМ Трис-НСl рН 8,4, 500 мМ КCl, що не містить MgCl <sub>2</sub> )	
MgCl <sub>2</sub> (50 мМ)	0,75 мкл	
Platinum Taq (BRL/life)	0,2 мкл (5 од./мкл)	
Стерильна вода	мкл (залежно від кількості застосовуваної ДНК), кінцевий об'єм 25 мкл	
Програма ПЛР		
3 хв. 94°C		1 цикл, ПЛР цикл (Perkin Elmer 9600)
Рівень 0:00 94°C	0,10	
Рівень 0:00 36°C	0,30	
Рівень 0: 45 72°C	1,05	
3 хв. 94°C		40 циклів, ПЛР цикл (Perkin Elmer 9600)
Рівень 0: 00 94°C	0,10	
Рівень 0: 00 36°C	0,30	
Рівень 0: 45 72°C	1,05	
5 хв. 72°C		

де рослина, отримана на стадії б), є стійкою до кили.

36. Спосіб за п.35, в якому додатково шляхом зворотного схрещування вводять ознаку стійкості в рослину *B. oleracea*, що має чутливість або недостатній рівень стійкості до кили.

37. Спосіб ідентифікації рослини *B. oleracea*, стійкої до кили, який полягає в тому, що:

а) одержують зразок з рослини *B. oleracea*;

б) виявляють у зазначеному зразку ДНК-фрагмент, який одержують за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2), де розглянута на б) стадії рослина *B. oleracea* має стійкість до кили.

38. Спосіб відбору стійкої до кили рослини *B. oleracea* з популяції рослин *B. oleracea*, який полягає в тому, що:

а) одержують популяцію рослин *B. oleracea*;

б) одержують зразок з рослини, що входить у цю популяцію;

в) виявляють у цьому зразку ДНК-фрагмент, одержуваний за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2),

де розглянута на стадії б) рослина *B. oleracea* має стійкість до кили.

Даний винахід відноситься до рослин, стійких до захворювань, насамперед, до рослин *Brassica oleracea*, стійких до захворювання килою.

Кила являє собою широко розповсюджене захворювання, що є серйозною проблемою в багатьох зонах вирощування представників роду *Brassica* [див., наприклад, огляд Dixon, Grower April 29, 1999, стор.28-29]. Збудником хвороби є одноклітинний організм *Plasmodiophora brassicae*. Симптоми хвороби включають неправильне формування листя з вираженим розбуханням (килою), що, зрештою, приводить до гниття. Хвороба приводить також до карликовості через уповільнений ріст та до в'янення листя при стресі, викликаному нестачею води. Застосування хімічних засобів захисту рослин для боротьби з хворобою є неефективним. Таким чином, для захисту культури від захворювання важливою є вискоелективна генетична стійкість.

Рід капустяних (*Brassica*) включає декілька видів, що представляють комерційний інтерес, таких як *B. гара* (капуста китайська, пак-хой, турнепс (або ріпа городня)), *B. парус* (призначена для одержання олії капуста, бруква), *B. juncea* (гірчиця), *B. пігра* (гірчиця чорна) та *B. oleracea* (цвітна капуста, брокколі, капуста городня, брюссельська капуста, савойська капуста, капуста кормова (городня, бра-

унколь, кольрабі, та інші). Хоча підвиди видів, що відносяться до роду *Brassica*, як правило, мають статеву сумісність, статева сумісність не завжди має місце у випадку різних видів роду *Brassica*. Наприклад, *B. гара* та *B. oleracea* мають різне число хромосом (10 хромосом і 9 хромосом, відповідно) і тому не мають статевої сумісності. Це дуже в значній мірі утруднює перенос ознаки від одного виду роду *Brassica* до іншого.

Для представників роду *Brassica* описано кілька видів, які можна використовувати для переносу ознаки стійкості до кили [див., наприклад, Bradshaw та ін., Ann. Appl. Biol. 130, 1997, стор.337-348; Gowers, Euphytica 31, 1982, стор.971-976]. У деяких випадках стійкість є моногенною, у деяких випадках полігенною, у деяких випадках домінантною, а у деяких випадках рецесивною. Моногенна домінантна стійкість виявлена у *B. гара* та *B. парус*, наприклад, моногенна домінантна стійкість виявлена у китайської капусти *B. гара* [Yoshikawa, Japan Agricultural Research Quarterly, т.17, №1, 1983, стор.6-11]. Встановлено, що F1-гібриди китайської капусти, які мають таку стійкість, добре захищені від кили, хоча невелике число штамів ("рас") збудника кили можуть пригнічувати цю стійкість. Ймовірно, що такі раси преважують в Азії, а не в Європі.

На противагу цьому, у тих представників роду *Brassica*, наприклад, *B. oleracea*, які можна розглядати як джерела ознаки стійкості, відомі тільки випадки полігенної рецесивної стійкості [див., наприклад, Voorgrips, Euphytica 83, 1995, стор.139-146]. Доведено, що такі представники *B. oleracea*, які можна розглядати як джерела ознаки стійкості, не тільки не мають достатнього рівня стійкості до кили, але цю ознаку також дуже важко переносити від одних ліній *B. oleracea*, що мають комерційне значення, до інших. Це дуже сильно утруднює та подовжує селекцію за ознакою стійкості.

Таким чином, існує нагальна потреба в одержанні рослин *B. oleracea*, що мають підвищену стійкість до кили, які легко відбирати та переносити в лінії *B. oleracea*, що мають комерційне значення.

Таким чином, проблемою, на вирішення якої спрямований даний винахід, є незадовільна стійкість до захворювання килою у представників *B. oleracea*. Для підвищення стійкості до хвороби у *B. oleracea* у даному винаході запропонований перенос моногенної домінантної ознаки стійкості до кили від капусти китайської (*B. gara*) до броколі *B. oleracea*, а потім до інших підвидів *B. oleracea*, таких, як капуста городня білокачанна, цвітна капуста та брюссельська капуста. Для подолання статевої несумісності між *Я гора* та *B. oleracea* ознаку стійкості до кили переносили за допомогою міжвидової гібридизації з використанням методу "порятунку" ембріона, з наступними повторними зворотними схрещуваннями та оцінками ураження захворюванням усіх поколінь беккросів. Отримані рослини *B. oleracea* характеризувалися високим рівнем стійкості до кили. Ця стійкість була стабільною, піддавалася переносу в інші покоління та переносу в чутливі рослини *B. oleracea* або такі, що мають недостатній рівень стійкості.

Таким чином, у даному винаході описані стійкі до кили рослини *B. oleracea*, включаючи насіння та матеріал, одержаний від зазначених рослин, та їх потомство, де стійкість до кили є моногенною та домінантною. У даному винаході описані також способи одержання стійких до кили рослин *B. oleracea*, способи переносу стійкості до кили в чутливі рослини *B. oleracea* або такі, що мають недостатній рівень стійкості. У даному винаході описані також молекулярні маркери, пов'язані з генетичним фактором, що обумовлює стійкість до кили.

Важлива перевага даного винаходу в порівнянні з існуючими методами надання стійкості до кили у *B. oleracea* полягає в тому, що стійкість, запропоновану в даному винаході, легко переносити від одних рослин *B. oleracea* в інші та у сорти, що мають комерційний інтерес. Стійкі рослини через те, що вони не уражуються захворюванням, дають більш високі врожаї. Крім того, при вирощуванні рослин *B. oleracea*, запропонованих у даному винаході, необхідне застосування істотно менших кількостей хімічних засобів захисту рослин від кили або хімічних засобів захисту рослин не вимагається взагалі.

Таким чином, у даному винаході запропоновано:

Рослина *B. oleracea*, стійка до захворювання килою, більш конкретно до захворювання килою, що викликається патогеном *Plasmidiophora brassicae*. У конкретному варіанті здійснення винаходу стійкість до захворювання килою є моногенною та домінантною. Бажане ураження рослини *B. oleracea* відповідає балу 2 або менше при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 1-9-бальною шкалою, переважно відповідно до методу, описаного у прикладі 2. Бажане ураження рослини *B. oleracea* відповідає балу 1 при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 1-9-бальною шкалою, переважно відповідно до методу, описаного у прикладі 2. Бажано, коли ураження рослини *B. oleracea* відповідає балу 1 або менше при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 0-5-бальною шкалою, переважно відповідно до методу, описаного у прикладі 2. Бажано, коли ураження рослини *B. oleracea* відповідає балу 0 при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 1-5-бальною шкалою, переважно відповідно до методу, описаного у прикладі 2. Відповідно до іншого кращого варіанта здійснення винаходу рослина *B. oleracea* має стійкість до зараження через кореневі волоски. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу рослина *B. oleracea* являє собою броколі, білокачанну капусту, цвітну капусту, брюссельську капусту, капусту кормову (браунколь), капусту савойську або капусту червонокочанну. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу рослина *B. oleracea* є гомозиготною або гетерозиготною за ознакою стійкості до кили. Ще в одному кращому варіанті здійснення винаходу стійкість до кили генетично зчеплюють з молекулярним маркером. Переважно молекулярний маркер можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації. Бажано, коли генетичний фактор, що обумовлює стійкість, знаходиться на відстані 10сМ (сантиморганід) від молекулярного маркера, бажано на відстані менше 6сМ, більш бажано менше 5сМ, ще більш бажано менше 3с, найбільш бажано менше 1,5сМ. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу генетичний фактор стійкості до кили зчеплений з молекулярним маркером, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2). У наступному кращому варіанті здійснення винаходу стійкість можна одержувати зі стійкої до кили рослини *B. gara*, переважно з F1-гібрида капусти китайської "Parkin". В іншому кращому варіанті здійснення винаходу стійкість до кили, запропоновану в даному винаході, можна одержувати з лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу стійкість виводять або одержують з лінії CFL667 або з нащадка або предка лінії CFL667, що несе зазначену ознаку стійкості. Ще в одному кращому варіанті здійснення винаходу рослина є інбредною або гібридною. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу рослина є дигаплоїдною. Ще в одному кращому варіанті здійснення винаходу рослина має цитоплазматичну чоловічу стерильність (ЦЧС). У наступному кращому варіанті здійснення даного винаходу рослина *B. oleracea*

має локус, що обумовлює стійкість до кили. Бажано, коли локус знаходиться на відстані 10 сантиморганід (сМ) від молекулярного маркера, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2), бажано 6сМ, більш бажано 5сМ, ще більш бажано 3сМ, найбільш бажано на відстані 1,5сМ від зазначеного молекулярного маркера. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу локус, що зумовлює стійкість, відповідає локусу, який є присутнім у лінії CFL667, депонованій в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, та переважно косегрегується з локусом, що обумовлює стійкість, який є присутнім у лінії CFL667. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу локус, що обумовлює стійкість до кили, можна одержувати з лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, або з нащадка або предка лінії CFL667, що несе цю ознаку стійкості. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу локус, що зумовлює стійкість, виводять або одержують з лінії CFL667 або з нащадка або предка лінії CFL667, що несе ознаку стійкості.

Крім того, у даному винаході запропоновані:

- насінний матеріал описаної вище рослини, включаючи його потомство, де насінний матеріал або потомство має стійкість, запропоновану в даному винаході;

- плід описаної вище рослини; частина описаної вище рослини, включаючи пилок, насінний зачаток та ембріон зазначеної рослини.

У даному винаході запропоновано також:

Рослину *B. oleracea*, що має стійкість до захворювання килою, причому, коли рослина є гомозиготною за ознакою стійкості і цю рослину, гомозиготну за ознакою стійкості, схрещують з рослиною-"тестером", що є гомозиготною за моногенною та домінантною ознакою стійкості до захворювання килою, то покоління рослин першої генерації, отримане в результаті цього схрещування, розщеплюється в співвідношенні 1:0 за ознакою стійкості до захворювання килою. У кращому варіанті здійснення винаходу, коли це покоління рослин першої генерації є таким, що самозапильється, то покоління рослин, яке утворилося, другої генерації розщеплюється в співвідношенні 1:0 за ознакою стійкості до захворювання килою. У кращому варіанті здійснення винаходу рослина-"тестер" являє собою рослину, що виведена з лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, і яка несе моногенну та домінантну ознаку стійкості до кили, притаманну зазначеній лінії CFL667 або нащадку або предку лінії CFL667, які несуть моногенну та домінантну ознаку стійкості до кили, властиву лінії CFL667. У кращому варіанті здійснення винаходу рослину-"тестер" виводять з рослини лінії CFL667 або рослини-нащадка лінії CFL667 шляхом клітинного злиття. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу рослина-"тестер" має чоловічу фертильність.

Рослину *B. oleracea*, що має стійкість до захворювання килою, причому, коли вказана рослина є гетерозиготною за фактором стійкості і цю

рослину, гетерозиготну за ознакою стійкості, схрещують з рослиною-"тестером", яка є гетерозиготною за моногенною та домінантною ознакою стійкості до захворювання килою, то покоління першої генерації, отримане в результаті цього схрещування, розщеплюється в співвідношенні 3:1 за ознакою стійкості до захворювання килою. У кращому варіанті здійснення винаходу, коли ці рослини з покоління першої генерації додатково схрещують із зазначеною рослиною, гетерозиготною за ознакою стійкості, то покоління, що утворилося, другої генерації розщеплюється в співвідношенні 5:1 за ознакою стійкості до захворювання килою. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу рослина-"тестер" являє собою рослину лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, або нащадка або предка лінії CFL667, що володіють моногенною та домінантною ознакою стійкості до кили, яка властива лінії CFL667, або рослину, що виведена з лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, і яка володіє моногенною та домінантною ознакою стійкості до кили, що властива лінії CFL667. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу оцінка потомства індивідуальних рослин дозволяє встановити, що отримане покоління другої генерації розщеплюється в співвідношенні 3:1, 1:0 або 1:1 за ознакою стійкості в залежності від генетичного статусу індивідуальних рослин з покоління першої генерації (гетерозиготні, гомозиготні за ознакою стійкості або гомозиготні за ознакою чутливості, відповідно). В іншому кращому варіанті здійснення винаходу ознака стійкості до кили є моногенною, переважно моногенною та домінантною. У кращому варіанті здійснення винаходу рослина *B. oleracea* є гомозиготною за ознакою стійкості. У наступному кращому варіанті здійснення винаходу рослина *B. oleracea* є гетерозиготною за ознакою стійкості.

У даному винаході запропоновані також:

- насінний матеріал описаної вище рослини, включаючи її потомство, де насінний матеріал або потомство має стійкість, запропоновану в даному винаході;

- плід описаної вище рослини; частина описаної вище рослини, включаючи пилок, насінний зачаток та ембріон зазначеної рослини.

У даному винаході запропоновано також:

Застосування моногенної та домінантної ознаки стійкості до кили, запропонованої в даному винаході, для надання стійкості до цього захворювання рослині *B. oleracea*. Переважно ознаку стійкості можна одержувати з рослини *B. gara*, переважно з F1-гібрида капусти китайської "Parkin".

У даному винаході запропонований також:

Спосіб одержання рослини *B. oleracea*, яка несе моногенну та домінантну ознаку стійкості до кили, який полягає в тому, що а) одержують рослину *B. гара*, стійку до кили; б) схрещують зазначену рослину *B. гара* з рослиною *B. oleracea*, в) "рятують" ембріони, отримані в результаті схрещування, зазначеного на стадії б); г) регенерують рослину з ембріона, отриманого на стадії в); д) відбирають рослину, отриману на стадії г), що має

стійкість до кили; е) здійснюють зворотне схрещування рослини, отриманої на стадії д), з рослиною *B. oleracea*. У кращому варіанті здійснення винаходу спосіб додатково передбачає інтрогресію ознаки стійкості в елітні інбредні рослини *B. oleracea*. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу спосіб передбачає також схрещування зазначеної інбредної рослини з іншою інбредною рослиною *B. oleracea* для одержання гібрида.

У даному винаході запропоновано також:

Рослину *B. oleracea*, у тому числі гібридну рослину, яку можна одержувати за допомогою описаного вище способу.

У даному винаході запропонований також:

Спосіб переносу моногенної та домінантної ознаки стійкості до кили в рослину *B. oleracea*, чутливу або таку, що має недостатній рівень стійкості до захворювання, який полягає в тому, що: а) одержують рослину *B. oleracea*, яка несе моногенну та домінантну ознаку стійкості до кили; б) схрещують отриману на стадії а) рослину *B. oleracea* з рослиною *B. oleracea*, що має чутливість або недостатній рівень стійкості до кили; в) відбирають рослину, отриману на стадії б), яка має стійкість до кили. У кращому варіанті здійснення винаходу спосіб додатково передбачає зворотне схрещування стійкої рослини з рослиною *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до кили. У кращому варіанті здійснення винаходу ураження рослини *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до захворювання, відповідає балу 4 або більше, переважно балу 3 або більше, при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 1-9-бальною шкалою, або балу 3 або більше, переважно балу 2 або більше, при оцінці ураження, що викликається захворюванням, за 0-5-бальною шкалою.

У даному винаході запропоновані також:

ДНК-фрагмент, ампліфікований з генома рослин роду *Brassica*, де цей ДНК-фрагмент складається приблизно з 400 пар основ і представлений у SEQ ID NO:1.

ДНК-фрагмент, ампліфікований з генома рослин роду *Brassica*, де цей ДНК-фрагмент складається приблизно з 640 пар основ і представлений у SEQ ID NO:2.

У кращому варіанті здійснення винаходу описаний вище ДНК-фрагмент є індикатором присутності домінантної та моногенної ознаки стійкості до кили у рослини роду *Brassica*.

Застосування описаного вище ДНК-фрагмента для ідентифікації рослини роду *Brassica*, стійкої до кили.

Застосування праймера O20 (SEQ ID NO:1) для виявлення ДНК-фрагмента довжиною приблизно 400 пар основ в геномі рослини роду *Brassica*.

Застосування праймера Y13 (SEQ ID NO:) для виявлення ДНК-фрагмента довжиною приблизно 640 пар основ в геномі рослини роду *Brassica*.

Застосування праймера O20 або Y13 для виявлення рослини роду *Brassica*, стійкої до кили.

У кращому варіанті здійснення винаходу рослина роду *Brassica* являє собою *B. oleracea*.

Набір для виявлення моногенної та домінантної ознаки стійкості до кили у рослини *B. oleracea*,

який містить олігонуклеотид, представлений у SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2.

У даному винаході запропонований також:

Спосіб переносу моногенної та домінантної ознаки стійкості до кили у рослину *B. oleracea*, що має чутливість або недостатній рівень стійкості до захворювання, який полягає в тому, що а) одержують рослину *B. oleracea*, яка несе моногенну та домінантну ознаку стійкості до кили; б) схрещують рослину *B. oleracea*, отриману на стадії а), з рослиною *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до кили; в) відбирають рослину, що несе ДНК-фрагмент, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації та який коєгрегується з ознакою стійкості. Переважно ДНК-фрагмент можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2). Краща рослина, отримана на стадії в), має стійкість до кили. У кращому варіанті здійснення винаходу спосіб додатково передбачає зворотне схрещування стійкої рослини з рослиною *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до кили.

У даному винаході запропонований також:

Спосіб виявлення рослини *B. oleracea*, стійкої до кили, який полягає в тому, що а) одержують зразок з рослини *B. oleracea*; б) виявляють у зазначеному зразку ДНК-фрагмент, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2), де розглянута на стадії б) рослина *B. oleracea* має стійкість до кили.

У даному винаході запропонований також:

Спосіб відбору стійкої до кили рослини *B. oleracea* з популяції рослин *B. oleracea*, який полягає в тому, що: а) одержують популяцію рослин *B. oleracea*; б) одержують зразок з рослини, яка входить у цю популяцію; в) виявляють у цьому зразку ДНК-фрагмент, який можна одержувати за допомогою ПЛР-ампліфікації з використанням праймера O20 (SEQ ID NO:1) або праймера Y13 (SEQ ID NO:2), де розглянута на б) стадії рослина *B. oleracea* має стійкість до кили.

Визначення

Ознака: характеристика або фенотип, наприклад, стійкість до захворювання. Ознака може успадковуватися як домінантна або рецесивна або може бути моногенною або полігенною. Наприклад, ознака може являти собою стійкість до захворювання, такого як кила.

Стійкість: характеристика або фенотип рослини, при яких відсутні симптоми захворювання або присутні незначні симптоми захворювання. Таким чином, стійкість переважно являє собою здатність рослини знижувати розвиток патогена [див., наприклад, Robinson R.A., Review Applied Mycology, 48, 1969, стор.593-606].

Моногенний: визначається одним локусом.

Полігенний: визначається більше, ніж одним локусом.

Домінантний: визначає фенотип, коли є присутнім у гетерозиготному чи гомозиготному стані.

Рецесивний: виявляється тільки тоді, коли є присутнім у гомозиготному стані.

Локус: область хромосоми, яка несе один або кілька генетичних факторів, наприклад, один або кілька генів, що визначають ознаку, таку, як стійкість до захворювань.

Генетичне зчеплення: тенденція хромосомних областей успадковуватися спільно в результаті їх локалізації на одній і тій самій хромосомі. Оцінюється за відсотком рекомбінацій між локусами (сантиморганіда, cM).

Ізогенні: рослини, які є генетично ідентичними за винятком того, що вони можуть відрізнятися присутністю або відсутністю гетерологічної послідовності ДНК.

Здійснюваний за допомогою маркера відбір: відноситься до процесу відбору необхідної ознаки або необхідних ознак у рослині або рослинах шляхом виявлення однієї або декількох нуклеїнових кислот з рослини, де нуклеїнова кислота зв'язана з необхідною ознакою.

Дигаплоїдний: дублікація гаплоїдного (одна хромосома) статусу генома (наприклад, з використанням культури або пиляка або культури мікроспор) з утворенням цілком гомозиготної рослини.

Рослина-"тестер": рослина, яку застосовують для генетичного вивчення ознаки у рослині, яку піддають тестуванню. Як правило, рослину, яку піддають тестуванню, схрещують з рослиною-"тестером" та оцінюють співвідношення розщеплення ознаки в потомстві, отриманому в результаті схрещування.

У даному винаході описані рослини *B. oleracea*, стійкі до захворювання килію, більш конкретно до захворювання килію, збудником якого є патоген *Plasmodiophora brassicae*. Зокрема, у даному винаході описані рослини *B. oleracea*, які несуть моногенну домінуючу ознаку стійкості до захворювання. Генетичний фактор стійкості забезпечує підвищений рівень стійкості до захворювання в порівнянні з відомими рівнями стійкості рослин *B. oleracea*, та його легко переносити з однієї рослини *B. oleracea* в іншу.

Види та підвиди роду *Brassica* описані, наприклад, у P.H. Williams [Screening Crucifers for multiple disease resistance, Workshop 1981, Un. Wisconsin-Madison], а їх генетичний аналіз додатково проведений та описаний у [Song KM та ін., TAG 75, 1988, стор.784-794; TAG 76, 1988, стор.593-600 та TAG 79, 1990, стор.497-506 (серія з трьох статей)].

У кращому варіанті здійснення винаходу рослини *B. oleracea*, що застосовують відповідно до даного винаходу, являють собою, наприклад: *Brassica oleracea* L. (капустяні культури)

- сорт *acerphala* DC. (капуста кормова, капуста листовая, браунколь)
- сорт *albiflora* Sun [B. *alboglabra*] (капуста китайська)
- сорт *alboglabra* [B. *alboglabra*] (капуста китайська)
- сорт *botrytis* L. (капуста цвітна)
- сорт *capitata* L. (капуста городня качанна)
- сорт *chinensis* Prain (сорт "Prain" капусти китайської)
- сорт *fimbriata* Mill. (капуста городня)
- сорт *fruticosa* Metz. (капуста кормова тисяча-

голова)

- сорт *gemmifera* DC. (брюссельська капуста)
- сорт *gongyloides* L. (кольрабі)
- сорт *italica* Plenck. (броколі, спаржева капуста)
- сорт *sabauda* L. (савойська капуста)
- сорт *sabellica* (капуста кормова)
- сорт *tranchuda* L.H. Bailey (капуста тронхуда, описаний L.H. Bailey)
- сорт *costata* (португальська капуста)
- сорт *medullosa* (капуста коров'яча)
- сорт *ramifolia* (капуста джерсейна)
- сорт *ramosa* (капуста тисячоголова)
- сорт *selensia* (капуста кормова)

Кращими рослинами *B. oleracea* згідно з даним винаходом є білокачанна капуста, цвітна капуста, брюссельська капуста та броколі.

Згідно із даним винаходом моногенну домінуючу ознаку стійкості до кили переносили з китайської капусти (*B. гора*) у броколі (*B. oleracea*). Для міжвидової гібридизації використовували броколі (*B. oleracea* сорт *italica*) як материнську рослину та *B. гора* як батьківську рослину. Інбредні лінії броколі вибирали як материнську рослину для запобігання присутності клітинних органел різного походження в кінцевих продуктах схрещування. Застосовувана для міжвидового схрещування батьківська рослина являла собою стійкий до кили F1-гібрид китайської капусти, отриманий з Японії, що надходить у продаж під назвою "Parkin" (фірма Takii Seeds, Японія). Після кожного схрещування або зворотного схрещування підраховували число хромосом отриманих рослин для оцінки рівня поліплоїдії рослин та успіху з погляду одержання хромосомного набору, характерного для *B. oleracea*. Підрахунок хромосом здійснювали з використанням методу, описаного в Chiang та ін., [Euphytica 28, 1979, стор.41-45]. Для проточної цитометрії використовували пристрій типу Partec CA II (фірма Partech, Великобританія).

F1-гібриди, які представляють собою результат схрещування, одержували методом "порятунку" ембріона. Метод "порятунку" ембріона потрібно застосовувати через те, що *B. гора* та *B. oleracea* мають різне число хромосом і тому не мають стабільної сумісності. Метод "порятунку" ембріона дозволяє вирішити проблеми, пов'язані з руйнуванням ендосперму. Використовували метод "порятунку" ембріона, описаний у Harbert та ін. [Euphytica 18, 1969, стор.425-429]. Стерилізовані 10-12-денні насінні зачатки після запилення розрізали навпіл та переносили у культуральне середовище при постійному перемішуванні. Культуральне середовище являло собою середовище Уайта, доповнене 8% сахарози та 400 част./млн казеїнового гідролізату. Ембріони відмивали від насінних зачатків та вирощували у рідкому середовищі.

Стійкі до кили F1-рослини схрещували з рослинами броколі (тобто здійснювали зворотне схрещування). Описаний вище метод "порятунку" ембріона також був потрібний для одержання рослин після першого зворотного схрещування (тобто BC1-рослин).

Знову здійснювали зворотне схрещування

стійких до кили BC1-рослин з рослинами броколі, при цьому за допомогою звичайного набору насіння було одержано три BC2-рослини, що мали стійкість до кили. Ці рослини знову піддавали зворотному схрещуванню з рослинами броколі та рослини, отримані

після четвертого зворотного схрещування (тобто BC4-рослини), застосовували як джерело ознаки стійкості для інших культурних сортів *B. oleracea*.

Докладний експериментальний протокол, що дозволяє переносити ознаку стійкості у *B. oleracea*, описаний у прикладі 1. Оцінка ураження захворюванням, яку застосовували для виявлення наявності стійкості, описана в прикладі 2. Результати польових дослідів, що демонструють стійкість до кили, представлені в прикладі 3.

Репрезентативна лінія *B. oleracea*, яка несе моногенну домінуючу ознаку стійкості до кили, запропонована в даному винаході, тобто лінія CFL667, була депонована в [NCIMB, Абердин, AB21RY, Шотландія, Великобританія, під реєстраційним номером NCIMB 41134 28 червня 2002р.]. Рослини лінії CFL667 мають цитоплазматичну чоловічу стерильність та є гетерозиготними за ознакою стійкості.

Таким чином, згідно з даним винаходом стійкість до кили можна одержувати з використанням лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134.

У кращому варіанті здійснення даного винаходу рослину *B. oleracea*, стійку до кили, визначають як рослину, ураження якої відповідає балу 0 або 1 при використанні 0-5-бальної шкали, що описана в прикладі 2, або рослину, ураження якої відповідає балу 1 або 2 при використанні 1-9-бальної шкали, що описана в прикладі 2.

Ознаку стійкості до кили переносили в інші сорти *B. oleracea*, насамперед, у білокачанну капусту, цвітну капусту та брюссельську капусту, з використанням стандартних методів відбору, добре відомих в області селекції представників роду *Brassica*. Ознаку стійкості також інтрогресували в елітні лінії *B. oleracea*. Інтрогресію ознаки стійкості в елітну лінію здійснювали, наприклад, шляхом рекурентної селекції (повторюваний відбір), наприклад, шляхом зворотного схрещування. У цьому випадку елітну лінію (рекурентний батько) спочатку схрещували з інбредним донором (нерекурентний батько), який несе ознаку стійкості. Потомство цього схрещування потім знову схрещували з рекурентним батьком та відбирали отримане потомство за ознакою стійкості до кили. Після одержання трьох, бажано чотирьох, більш бажано п'яти або більше поколінь, отриманих в результаті зворотного схрещування з рекурентним батьком, та відбору за ознакою стійкості до кили, потомство було гетерозиготним за локусом, який обумовлює стійкість, але нагадувало рекурентного батька за більшістю або майже за всіма іншими генами [див., наприклад, Poehlman і Sleper, *Breeding Field Crops*, 4-е вид., 1995, стор.172-175; Fehr, *Principles of Cultivar Development*, том 1: *Theory and Technique*, стор.360-376], публікації включені в даний опис як посилання). Після кожного схрещу-

вання здійснювали відбір за ознакою стійкості до кили. Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є спосіб переносу домінуючої та моногенної ознаки стійкості до кили в рослину *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до захворювання, що полягає в тому, що: схрещують першу рослину *B. oleracea* із другою рослиною *B. oleracea*, де перша рослина несе домінуючу та моногенну ознаку стійкості до кили, відбирають отриману в результаті схрещування рослину, яка має стійкість до кили. Ураження захворюванням рослини *B. oleracea*, що є чутливою або має недостатній рівень стійкості до захворювання, наприклад, відповідає балу 4 або вище, переважно 3 або вище, при оцінці хвороби за 1-9-бальною шкалою, або балу 3 або вище, переважно 2 та вище, при оцінці хвороби за 0-5-бальною шкалою. Спосіб передбачає також зворотне схрещування відібраної за допомогою вищевикладеного способу рослини з другою рослиною *B. oleracea*, доти, поки ознака стійкості не буде перенесена у другу рослину *B. oleracea*.

Ознаку стійкості до кили переважно переносять у лінії *B. oleracea*, які мають комерційне значення. Такі лінії являють собою, наприклад, інбредні лінії. В іншому варіанті лінії, що мають комерційне значення, являють собою гібриди, які одержують схрещуванням двох інбредних ліній. У цьому випадку генетичний фактор, що обумовлює стійкість до кили, може бути присутнім в одному з інбредних батьків або в обох батьках. Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є інбредна або гібридна лінія *B. oleracea*, що несе моногенну домінуючу ознаку стійкості до кили, включаючи насіння та матеріал зазначеної інбредної або гібридної лінії та її потомство. Переважно генетичний фактор стійкості може мати походження від *B. gara*, переважно з F1-гібрида китайської капусти "Parkin". В іншому кращому варіанті здійснення винаходу ознака стійкості до кили, запропонована в даному винаході, є притаманною лінії CFL667, депонованій в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134.

Згідно з ще одним кращим варіантом здійснення винаходу стійка до кили рослина *B. oleracea*, запропонована в даному винаході, має чоловічу стерильність. Чоловіча стерильність є важливою для гібрида *B. oleracea*, що дає насіння, оскільки звичайні квітки є самозапильними. Лінії з чоловічою стерильністю не продукують життєздатний пилок та не здатні до самозапилення. Шляхом елімінації пилка одного з батьківських сортів, застосовуваних для схрещування, агроном-селекціонер гарантовано повинен одержати гібридний насінний матеріал однорідної якості. Найбільш кращою системою чоловічої стерильності є цитоплазматична чоловіча стерильність (ЦЧС). Прикладом такою ЦЧС у представників роду *Brassica* є описана Ogura ЦЧС, яка спочатку була виявлена в рослинах редьки [див., наприклад, Ogura, *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 6, 1968, стор.39-78; Makaroff, *Journal of Biol. Chem.* 264, 1989, стор.11706-11713; US 5254802]. Таким чином, у даному винаході описана рослина *B. oleracea*, яка має чоловічу стерильність, насампе-



ред, ЦЧС, та яка несе моногенну домінуючу ознаку стійкості до кили, включаючи насіння та матеріал таких рослин та їх потомство. Переважно генетичний фактор стійкості може мати походження від В. гара, переважно з F1-гібрида китайської капусти "Parkin". Переважно ЦЧС одержують з описаного в Ogura генома.

Чоловічу фертильність рослин з чоловічою стерильністю можна відновлювати за допомогою добре відомих у даній області техніки методів. Чоловічу фертильність рослин із ЦЧС, зокрема, рослин *B. oleracea* із ЦЧС, переважно відновлюють шляхом злиття клітин. З цією метою ЦЧС-рослину зливають із клітинами рослини з чоловічою фертильністю, замінюючи ядро фертильної рослини ядром стерильної рослини у фертильному цитоплазматичному оточенні, та відновлюють фертильність. Методи злиття клітин є добре відомими в даній області, наприклад, описані в [Sigareva та Earle, Theor. Appl. Genet. 94, 1997, стор.213-320]. За допомогою таких методів регенерують рослини, які володіють чоловічою фертильністю, та дають їм можливість самозапилюватися або схрещуватися з іншою рослиною.

Ознаки, зокрема, ознаки, які мають фенотипічний прояв, такі, як стійкість до хвороби, можна потім оцінювати генетично шляхом схрещувань та визначення розщеплення ознаки в потомстві, отриманому в результаті схрещування. Цей підхід дозволяє, наприклад, визначати, чи є ознака домінуючою або рецесивною. Це дозволяє також оцінювати, чи знаходяться генетичні фактори, які обумовлюють ці ознаки, у тому самому локусі (наприклад, в одному(их) і тому(тих) же гені(ах) або в різних генах, в одному(их) і тому(тих) же алелі(ях) або в різних алелях) або в різних зчеплених або незчеплених локусах.

Наприклад, коли гомозиготну за ознакою рослину схрещують з рослиною-"тестером", гомозиготним за домінуючою ознакою, що має такий самий фенотип, то потомство, отримане в результаті схрещування, не повинно розщеплюватися за фенотипом ознаки (співвідношення 1:0). Це співвідношення 1:0 одержують, коли генетичні фактори, які обумовлюють ознаку, знаходяться в тому самому локусі або в різних локусах. Коли відбувається самозапилення рослин з покоління першої генерації, отриманого в результаті описаного вище схрещування, то співвідношення 1:0 є характерним для домінуючих ознак, обумовлених генетичними факторами, які знаходяться в тому самому локусі у рослини, яку піддають тестуванню, та у рослини-"тестера". На противагу до цього, співвідношення 15:1 є характерним для домінуючих ознак, обумовлених генетичними факторами, які знаходяться в різних незчеплених локусах у рослини, яку піддають тестуванню, та у рослини-"тестера". Якщо генетичні фактори знаходяться в різних, але генетично зчеплених локусах, то співвідношення знаходиться між зазначеними співвідношеннями 1:0 та 15:1.

В іншому прикладі, коли досліджувану рослину, яка є гетерозиготною за домінуючою ознакою, схрещують з рослиною-"тестером", яка також є гетерозиготною за домінуючою ознакою, що має

такий самий фенотип, то отримане в результаті схрещування потомство розщеплюється в співвідношенні 3:1 за фенотипом стійкості. Це співвідношення 3:1 є характерним для випадку, коли генетичні фактори, які обумовлюють ознаку, знаходяться в тому самому локусі або в різних локусах. Коли отримані в результаті описаного вище схрещування рослини з покоління першої генерації схрещують з рослинами "тестерної" лінії або з рослиною, яку піддають повторному тестуванню, гетерозиготною за ознакою, то співвідношення 3:1 є характерним для домінуючих ознак, основою яких є генетичні фактори, розташовані в тому самому локусі, а співвідношення 23:9 є характерним для домінуючих ознак, основою яких є генетичні фактори, розташовані в різних незчеплених локусах. Якщо два генетичні фактори знаходяться в двох різних, але генетично зчеплених локусах, то співвідношення звичайно знаходиться між зазначеними двома співвідношеннями.

В іншому кращому варіанті здійснення винаходу покоління другої генерації окремих рослин аналізують індивідуально. У цьому випадку для генетичних факторів, розташованих у тому самому локусі, 50% рослин з покоління другої генерації знову розщеплюється в співвідношенні 3:1, 25% у співвідношенні 1:0, а 25% у співвідношенні 1:1 при схрещуванні з гетерозиготною рослиною. При наявності незчепленого генетичного фактора в досліджуваній рослині в поколінні другої генерації 50% рослин розщеплюється в співвідношенні 3:1, 25% у співвідношенні 7:1, а 25% у співвідношенні 1:1 (у поколінні другої генерації немає рослин із зафіксованою стійкістю).

Якщо ознака являє собою стійкість до хвороби та досліджуване захворювання викликає загибель чутливих рослин або перешкоджає цвітінню чутливих рослин, то в поколінні другої генерації можуть бути різні співвідношення розщеплення через загибель або відсутність потомства в чутливих рослин з покоління першої генерації. Наприклад, у цьому випадку замість зазначених вище співвідношень 3:1 та 23:9, одержують співвідношення 5:1 та 19:5, відповідно. При оцінці ураження захворювання окремих рослин 2/3 покоління другої генерації розщеплюється в співвідношенні 3:1, а 1/3 у співвідношенні 1:0 за генетичними факторами, що розташовані в тому самому локусі, а 2/3 розщеплюється в співвідношенні 3:1 та 1/3 у співвідношенні 7:1 за генетичними факторами, що розташовані в різних локусах. Застосовують також інші стратегії схрещування, наприклад, з використанням інших комбінацій гомозиготних або гетерозиготних рослин або рослин, які не несуть ознаки. Потім оцінюють розщеплення ознаки в потомстві. Ці стратегії схрещування та відповідні їм співвідношення розщеплення добре відомі фахівцю в даній області, для якого очевидні також шляхи одержання та застосування відповідних рослин-"тестерів" та інтерпретація отриманих у результаті таких схрещувань співвідношень розщеплення. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу проілюстровані вище схеми схрещування застосовують для створення стійкості до захворювання килею в контексті даного опису. Таким чином, іншим

кращим варіантом здійснення даного винаходу є рослина *B. oleracea*, гомозиготна або гетерозиготна за ознакою стійкості до кили, причому, коли ознака стійкості до кили є гомозиготною у досліджуваній рослині та цю рослину схрещують з рослиною-"тестером", гомозиготною за ознакою стійкості до кили, то в отриманому в результаті цього схрещування поколінні рослин першої генерації розщеплення ознаки стійкості до кили відбувається в співвідношенні 1:0. Застосовувана для такого схрещування рослина-"тестер" являє собою, наприклад, рослину, яка отримана з лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, та яка несе ознаку стійкості, запропоновану в даному винаході. У кращому варіанті здійснення винаходу рослину-"тестер" одержують з рослини лінії CFL667 або з потомства рослини лінії CFL667 шляхом злиття клітин. Інші рослини з чоловічою фертильністю, які несуть ознаку стійкості, запропоновану в даному винаході, можна використовувати також як рослину-"тестер". У кращому варіанті здійснення винаходу, коли рослинам з покоління першої генерації дають самозапилюватися, то отримане покоління другої генерації розщеплюється в співвідношенні 15:1 за ознакою стійкості. Ще в одному кращому варіанті здійснення винаходу покоління другої генерації, отримане в результаті самозапилення, розщеплюється в співвідношенні від 1:0 до 15:1. Таким чином, на основі співвідношення розщеплення можна або визначати локалізовані генетичні фактори стійкості досліджуваної рослини та рослин-"тестерів" у тому самому локусі або в різних зчеплених або незчеплених локусах.

Іншим кращим варіантом здійснення даного винаходу є рослина *B. oleracea*, гомозиготна або гетерозиготна за ознакою стійкості до кили, причому, коли ознака стійкості до кили є гетерозиготною у досліджуваній рослині і цю досліджувану рослину схрещують з рослиною-"тестером", гетерозиготною за ознакою стійкості до кили, то отримане в результаті цього схрещування покоління першої генерації розщеплюється в співвідношенні 3:1 за ознакою стійкості до кили. Рослина-"тестер" для такого схрещування являє собою, наприклад, рослину лінії CFL667, депонованої в NCIMB під реєстраційним номером NCIMB 41134, або рослину-нащадок лінії CFL667, що несе ознаку стійкості, запропоновану в даному винаході. Як рослину-"тестер" можна застосовувати також будь-яку іншу рослину, яка несе ознаку стійкості, запропоновану в даному винаході. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу, коли рослину з покоління першої генерації додатково схрещують з досліджуваними рослинами, гетерозиготними за ознакою стійкості, то очікується, що розщеплення за ознакою стійкості покоління другої генерації повинно відбуватися в співвідношенні 3:1. Проте у зв'язку з тим, що чутливі рослини, як правило, не виживають у дослідках з оцінки стійкості до захворювання килою або в таких дослідках у них не

відбувається цвітіння, то покоління другої генерації розщеплюється в співвідношенні 5:1. В іншому кращому варіанті здійснення винаходу, коли рослини з покоління першої генерації додатково схрещують з рослинами "тестерної" лінії, то очікується, що розщеплення отриманого покоління другої генерації за ознакою стійкості повинно відбуватися в співвідношенні 23:9, але звичайно розщеплення відбувається в співвідношенні 19:5. Ще в одному кращому варіанті здійснення винаходу розщеплення покоління другої генерації відбувається в співвідношенні від 5:1 до 19:5. При індивідуальній оцінці ураження захворюванням потомства окремих рослин були виявлені зазначені вище співвідношення. Таким чином, на основі співвідношення розщеплення можна або визначати локалізовані генетичні фактори стійкості досліджуваної рослини та рослин-"тестерів" у тому самому локусі або в різних зчеплених або незчеплених локусах.

Ще одним кращим варіантом здійснення даного винаходу є молекулярні маркери, зчеплені з генетичним фактором, що обумовлює моногенну домінуючу ознаку стійкості до кили. Такі молекулярні маркери дозволяють диференціювати на молекулярному рівні стійкі та чутливі рослини і в такий спосіб виявляють моногенну та домінуючу ознаку стійкості в рослинах роду *Brassica*, переважно в рослинах *B. oleracea*. Основою для створення молекулярних маркерів є генетичний поліморфізм між стійкими та чутливими рослинами, причому вони локалізовані в локусі, який зумовлює стійкість, або в безпосередній близькості від нього. Молекулярні маркери застосовують, наприклад, для відбору та одержання стійких рослин, для виявлення наявності ознаки стійкості при відборі або для контролю присутності ознаки стійкості в партії насіння, що надходить у продаж.

Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є способи картування генетичного фактора стійкості до кили в рослинах роду *Brassica*, переважно в рослинах *B. oleracea*, способи виявлення присутності ознаки стійкості в рослині роду *Brassica*, переважно рослині *B. oleracea*, та способи переносу ознаки стійкості у рослину роду *Brassica*, що має чутливість або недостатній рівень стійкості, переважно рослину *B. oleracea*. Наприклад, зазначені способи застосовують для відбору нових стійких рослин або ліній або для контролю якості партії насіння. Представлені в описі молекулярні маркери дозволяють прискорювати впровадження стійких ліній на ринок та поліпшувати якість контролю партій насіння, що надходять у продаж. Внаслідок цього можна не здійснювати оцінку ураження захворюванням та замінити її застосуванням молекулярного маркера.

Молекулярні маркери та способи, запропоновані в даному винаході, є особливо корисними на різних стадіях одержання комерційного сорту, таких як програми відбору та процес одержання насіння. Наприклад, даний винахід застосовують для інтрогресії ознаки стійкості в рослину *B. oleracea*, наприклад, в елітну інбредну лінію. Відбір за ознакою стійкості до кили здійснюють шляхом оцінки насіння або рослин, отриманих після кожного

схрещування з молекулярними маркерами. Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є способи переносу домінантної та моногенної ознаки стійкості до кили в рослину *B. oleracea*, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості до захворювання, що полягають у тому, що: схрещують першу рослину, стійку до захворювання, із другою рослиною, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості, збирають насіння, отримане в результаті схрещування, одержують зразок насінного матеріалу або вирощеної з нього рослини, визначають у цьому зразку наявність молекулярного маркера, запропонованого в даному винаході, присутність зазначеного молекулярного маркера свідчить про стійкість до захворювання в цьому насінному матеріалі або рослині, відбирають рослину, позитивну у відношенні присутності зазначеного маркера, причому, ця рослина переважно має стійкість до захворювання. Переважно потім здійснюють зворотнє схрещування стійкої рослини з рослиною, яка має чутливість або недостатній рівень стійкості.

Молекулярні маркери, запропоновані в даному винаході, зручно застосовувати також для одержання стабільних гомогенних інбредних ліній або культиварів (які також іноді називають сортами), при цьому конкретна лінія самозапилюється до досягнення задовільної чистоти та гомогенності лінії. Даний винахід можна застосовувати також для промислового виробництва насіння конкретної лінії або культивара. І в цьому випадку після кожного схрещування запропонований у винаході спосіб застосовують для оцінки насіння, отриманого в результаті схрещування, і відбирають тільки стійкі рослини. Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є способи одержання стійкого до кили насіння або стійких до кили рослин, які полягають у тому, що: схрещують стійку рослину із собою, збирають насіння, що утворилося в результаті схрещування, одержують зразок насінного матеріалу або вирощеної з нього рослини, визначають у цьому зразку наявність молекулярного маркера, запропонованого в даному винаході, присутність зазначеного молекулярного маркера свідчить про стійкість до захворювання в цьому насінному матеріалі або рослині.

Даний винахід застосовують також для одержання гібридного насінного матеріалу. У цьому випадку даний винахід застосовують для гарантії того, що усе гібридне насіння, яке проросло та виросло в польових умовах, має стійкість до захворювання. Переважно молекулярні маркери, запропоновані в даному винаході, застосовують також для гарантії якості та для гарантії того, що стійкість до захворювання присутня в гібридному насінні. Таким чином, кращим варіантом здійснення даного винаходу є способи одержання насіння, які полягають у тому, що: схрещують першу рослину та другу рослину, де одна з рослин має стійкість до кили, збирають насіння, що утворилося в результаті схрещування, одержують зразок насінного матеріалу або вирощеної з нього рослини, визначають у цьому зразку наявність молекулярного маркера, запропонованого в даному винаході, присутність зазначеного молекулярного маркера

свідчить про наявність ознаки стійкості до захворювання в цьому насінному матеріалі або рослині. Таким чином, даний винахід дозволяє істотно удосконалювати промислові процеси селекції та одержання насіння.

У кращому варіанті здійснення винаходу молекулярний маркер, запропонований у даному винаході, розташований на відстані 10 сантиморганід (сМ) від локусу, який обумовлює стійкість до кили, бажано 6сМ, більш бажано 5сМ, ще більш бажано 3сМ, найбільш бажано на відстані 1,5сМ від локусу, що обумовлює стійкість до кили, і в результаті цього має високу здатність до косегрегації з ознакою стійкості.

У контексті даного опису кращі поліморфізми включають, наприклад, повтори однієї послідовності [SSR, див, наприклад, Neame та ін., Trends Genet 8, 1992, стор.288-294], поліморфізми одного нуклеотиду [SNP, Botstein B та ін., Am J Hum Genet 32, 1980, стор.314-331] та будь-які інші типи перегруповань ДНК, такі як делеції, ампліфікації, кросвери.

У контексті даного опису для одержання молекулярних маркерів, зчеплених з генетичним фактором, який обумовлює стійкість, можна застосовувати методи виявлення поліморфізмів, що добре відомі в даній області. Кращими є методи, які базуються на ПЛР-ампліфікації, наприклад, на SSR-технології та RAPD-технології [Williams та ін., Nucl Acids Res 18, 1990, стор.6531-6535]. У цілому, кращі олігонуклеотиди, які застосовуються для ПЛР, складаються з 8-50 нуклеотидів, більш бажано з 10-30 нуклеотидів. Отримані за допомогою ПЛР-ампліфікації ДНК-фрагменти, що містять сайт, який включає поліморфізм, запропонований у даному винаході, бажано складаються приблизно з 100-3000, більш бажано приблизно з 200-2000, ще більш бажано приблизно з 300-1000 нуклеотидів. Інші методи скринінгу або виявлення поліморфізмів, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, включають пряме секвенування нуклеїнових кислот, аналіз одноланцюгових поліморфізмів, лігазну ланцюгову реакцію, ферментативне розщеплення та Саузерн-гібридизацію.

Альтернативні методи являють собою кілька методів, призначених для виявлення розщеплених ампліфікованих поліморфних послідовностей [Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; CAPS-методи; Konieczny та ін., The Plant Journal 4(2), 1993, стор.403-410] та для виявлення поліморфізмів одного нуклеотиду (SMP) за допомогою методу, призначеного для виявлення розщеплених ампліфікованих модифікованих поліморфних послідовностей (Cleaved Amplified Modified Polymorphic Sequences, позначений як CAMPS-метод), також відомого як dCAPS-метод [Neff та ін., Plant J. 14, 1998, стор.387-392; Michaels та Amasino, Plant J. 14, 1998, стор.381-385]. Відповідно до CAPS-методу нуклеїнову кислоту, що містить поліморфний сайт рестрикції, ампліфікують з використанням праймерів, які фланкують сайт рестрикції. ПЛР-продукт, який утворився, розщеплюють рестриктазою, що відповідає поліморфному сайту рестрикції, і розщеплені продукти аналізують за допомогою гел-електрофорезу.

Саузерн-гібридизація також являє собою ефективний метод виявлення відмінностей у послідовностях, зокрема, на основі поліморфізмів довжин рестрикційних фрагментів (RFLP; restriction fragment length polymorphisms) [Botstein B та ін., *Am J Hum Genet* 32, 1980, стор.314-331].

Кращим варіантом здійснення даного винаходу є молекулярні маркери, міцно зчеплені з генетичним фактором, що обумовлює стійкість до кили, які одержують за допомогою RAPD-методу (див. приклад 4 даного опису).

Нижче винахід проілюстрований на прикладах, що не обмежують його об'єм.

Усі процитовані в даному описі публікації цілком включені в нього як посилання.

Приклади

Приклад 1: Перенос ознаки стійкості в *B. oleracea*

E1

Здійснювали кілька сотень схрещувань стійкого до кили F1-гібрида сорту "Parkin" китайської капусти з броколі (*B. oleracea*). "Рятували" ембріони, отримані в результаті цих схрещувань [Harbert та ін., *Euphytica* 18, 1969, стор.425-429]. З чотирьох ембріонів розвивалися рослини, дві з яких виявилися стійкими до захворювання. Геном цих двох стійких рослин включав 19 хромосом. За фенотипом рослини виявилися гібридом китайської капусти та броколі.

BP1

Для одержання BC1-рослин також здійснювали "порятунком" ембріонів. Інбредну лінію броколі використовували як батька при зворотному схрещуванні. Для одержання наступних генерацій як батька при зворотному схрещуванні також використовували лінії броколі. Тільки одна із зазначених вище двох рослин покоління F1 виявилася респондером та з 5 ембріонів розвивалися рослини. Чотири з них виявилися стійкими до кили.

За фенотипом BC1-рослини виявилися ближче до рослин броколі, які застосовували як батька при зворотному схрещуванні.

Оскільки розподіл хромосом генома *B. гара* у BC1-рослинах є довільним, то рослини містили 18 хромосом *B. oleracea* та 0-10 хромосом *B. гара*.

В результаті були отримані рослини з 18-28 хромосомами.

BC2

BC2-рослини одержували шляхом закладання насіння BC1-рослин. Встановлено, що дев'ять рослин, які були отримані в результаті закладання насіння однієї рослини, позначеної як рослина В, із зазначених вище BC1-рослин, мали стійкість до кили. У них визначали кількість хромосом та за допомогою проточного цитометра оцінювали відхилення вмісту ДНК від основного рівня. У подальшій програмі досліджень використовували три рослини, а саме B23, B27 та B28.

BC3 та BC4

BC3- та BC4-рослини також одержували шляхом закладання насіння. У рослину B27, що вже в BC2-поколінні була диплоїдною, виявився включеним домінуючий ген, який обумовлює стійкість до кили. В отриманих шляхом зворотного схрещування поколіннях BC3 та BC4 виявлене очікуване

розщеплення 1:1.

Як було встановлено при аналізі наступних поколінь, ген, що обумовлює стійкість, був також інтрогредований у рослини B23 та B28.

Польовий дослід

Попередній польовий дослід здійснювали з використанням стійких рослин, відібраних після оцінки проростків, які були отримані від однієї з BC3-рослин, позначеної як B27. Рослини висаджували в поле з високим рівнем зараження на дослідній базі фірми-заявника в Клюванні, Німеччина. Усі рослини виявилися здоровими та в них не виявлено ніяких симптомів при викопуванні після дозрівання.

Перенос ознаки стійкості в інших представників *B. oleraceas*

Стіжку рослину B27 використовували як джерело ознаки стійкості до кили для здійсненню програми по зворотному схрещуванню з броколі, цвітною капустою, капустою городньою та брюссельською капустою, одержуючи стійкі сорти, що представлені, зокрема, у прикладі 3.

Приклад 2: Оцінка симптомів захворювання

Проростки пересаджували через один тиждень після посіву в блок паперових або пластмасових горщиків, що містять суміш піску та торф'яного ґрунту в співвідношенні 2:1, значення pH<6. Через один день після пересаджування в горщики вводили 1мл розчину, що містить  $1 \times 10^6$  цист/мл. Розчин являв собою суміш джерел кили, які мали ECD-коди 16/3/30, 16/23/30, 16/3/14 та 16/7/30 [Buczacki та ін., *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65, 1975, стор.295-303]. Перші два тижні ґрунт зволожували, після цього терміну ґрунт міг злегка підсихати. Температуру при інкубації в теплиці підтримували на рівні 18-20°C. Через 4-5 тижнів після пересадки корені цілком відмивали та оцінювали симптоми захворювання.

В іншому варіанті насіння безпосередньо висаджували в ящики з блоками паперових або пластмасових горщиків у суміш піску та торф'яного ґрунту (2:1 EGO, pH5-6, 1 насіння на 1 горщик із блоку). Як правило, для кожної лінії оцінювали по 20-30 рослин. Приблизно через 7-10 днів після посіву рослини інокулювали, другу інокуляцію здійснювали через 2-5 днів після першої інокуляції. Якщо передбачалося, що насіння може погано проростати, то посів здійснювали в чорні ящики в грядки та рослини пересаджували через 7-10 днів у ящики з блоками горщиків. Температуру інкубації підтримували на рівні 20-22°C.

Стандартний інокулят являв собою ізолят 9 (агресивний ізолят, виділений із зараженого поля в Німеччині). Інокулят одержували із заражених коренів, які зберігали в замороженому стані при -20°C у пластикових мішечках. Корені перемішували в міксері (1 частина коренів, 5 частин води) протягом приблизно 2хв. Невеликі частинки потім фільтрували з використанням сирної серветки і підраховували кількість цист (круглі, слабо забарвлені (злегка блакитні)). Один мл розчину, що містить  $0,5-1 \times 10^7$  цист/мл наносили за допомогою піпетки Еппендорфа на стебло/основу кореня рослини. Інокулят необхідно було регулярно струшувати для гомогенного перемішування наявних у

суспензії цист.

В залежності від масштабу дослідів було порівняно включення в нього достатньої кількості контрольних рослин. Чутливими контрольними рослинами були, наприклад: сорт White Rock (цвітна капуста), сорт Maximus або інші F1-гібриди (брюссельська капуста), сорт Marathon (білокачанна капуста). Як стійкі контрольні рослини у дослід можна включати сорти Parkin або Storkin (китайська капуста). Можна також використовувати сорт Norpin (чутливий сорт китайської капусти), тому що у ньому, якщо інокулянт є ефективним, ознаки захворювання виявляються на ранніх стадіях.

Рослини повинні були знаходитися в досить вологому стані протягом усього дослідів. Було необхідно регулярне внесення добрив, проте рослини не повинні були рости занадто швидко. Температуру підтримували на рівні 22-20°C (день/ніч), тривалість дня 16 годин.

Через 4 тижні (літо) - 6 тижнів (зима) після інокуляції рослини можна виймати з ґрунту, промивати та оцінювати симптоми захворювання.

Для оцінки симптомів захворювання можна використовувати, наприклад, наступну бальну шкалу:

0 - відсутність кили, здорова коренева система;

1 - 1-2 незначна кила на бічних коренях, іноді корені набувають коричневатого забарвлення;

2 - кілька невеликих кил на бічних коренях, іноді головні корені злегка товщають;

3 - велика частина головних коренів потовщені;

4 - головні корені значно потовщені та зрощені з киллоподібними бічними коренями, іноді ще присутні здорові корені;

5 - одна грудка коренів, відсутні здорові корені.

Рослини, ураження яких відповідає балу 0 при проведенні дослідів поза теплицею (іноді балу 1 в залежності від жорсткості умов випробування в теплиці та генетичних особливостей), потім перенесли на заражене килою поле (наприклад, поле De Wit у Енкхузене). Як правило, рослини, узяті з теплиці, у польових умовах виявлялися сильно інфікованими, і це було гарно помітно (затримка росту). Проте кількість таких рослин бути невеликою.

Для оцінки симптомів захворювання можна використовувати, наприклад, іншу бальну шкалу:

1 - відсутність помітного галоутворення на коренях;

2 - один гал на бічних коренях;

3 - кілька невеликих галів на бічних коренях (рослина є здоровою);

4 - слабе галоутворення на головному корені, кілька невеликих галів;

5 - помітне (помірне) галоутворення на головному корені, багато невеликих або кілька великих галів на бічних коренях;

6 - виражене галоутворення на головному корені, багато великих галів на бічних коренях;

7 - виражене галоутворення, залишається кілька здорових коренів;

8 - виражене галоутворення, є присутньою незначна кількість здорових коренів;

9 - виражене галоутворення, здорові корені відсутні.

Приклад 3: Результати польових дослідів

Таблиця 1

Польовий дослід проводили у Веррібі, провінція Вікторія, Австралія. Рослини висаджували в січні 2002р. у заражений збудниками кили ґрунт. Оцінка, проведена через 6 тижнів після посадки (таблиця 1), уже дозволила виявити стійкість до кили гібридів цвітної капусти, запропонованих у даному винаході (F308 і F311), у порівнянні з чутливими сортами (White Rock та Triumphant) та чутливим сортом (Triumphant), що обробляли різними кількостями фунгіциду (ширлан), а також при доданні вапна (підвищення значення рН приводить до зменшення ураження килою, [див., наприклад, Dixon та Page, Acta Horticulturae, 459, 1998, стор.343-349]). Для оцінки дослідів використовували зазначену вище 1-9-бальну шкалу.

Режим обробки	Галоутворення за 0-9-бальною шкалою
1. Негашене вапно (2,5т/га)	4,11
2. Ширлан (3л/га)	2,33
3. Ширлан (3л/га)+ негашене вапно (2,5т/га)	2,22
4. Ширлан (2л/га)	3,00
5. Контроль - сорт Triumphant	5,06
6. F308	1,00
7. F311	1,00
8. Сорт White Rock	5,11

Таблиця 2

Представлено результати, отримані в досліді з використанням молодих рослин цвітної капусти та ізолятів, узятих із трьох різних областей Австралії (Кора Лін (Cora Lyn), Веррібі (Werribee) та Трентам (Trentham)). Інокуляцію ізолятами здійснювали за допомогою методу, аналогічного описаному вище. Сорт White Rock являв собою чутливий контроль, а E70 - стійкий гібридний сорт цвітної капусти, запропонований у даному винаході. Для оцінки дослідів використовували зазначену вище 1-9-бальну шкалу.

Усереднені результати

	Кора Лін	Веррібі	Трентам
White Rock	8,2	8,7	3,9
E70	1	1	1

Таблиця 3

Представлено результати, отримані протягом 2 років у різних областях Європи на полях із природним зараженням килою. Лінії D249, D506, E245, E246, які використовували, являли собою стійкі гібриди цвітної капусти, запропоновані в даному винаході, White Rock являв собою чутливий сорт цвітної капусти, SPR666 та A876 являли собою стійкі гібриди B. sprouts, запропоновані в даному винаході, Romulus та Maximus являли собою чутливі сорти B. sprouts, F1182, F1187 являли собою стійкі гібриди білокачанної капусти, запропоновані в даному винаході, а Marathon являв собою чутли-

вий сорт білокачанної капусти. Оцінку (di05) здійснювали наприкінці вегетативного періоду за 0-5-

бальною шкалою (див. вище).

Популяція	Тип	Область	Рік	di05
D249	Цвітна капуста	Ганновер	2000	0,0
D506	Цвітна капуста	Ганновер	2000	0,0
White Rock	Цвітна капуста	Ганновер	2000	1,8
D249	Цвітна капуста	Халсал-Великобританія	2000	0,0
White Rock	Цвітна капуста	Халсал-Великобританія	2000	4,3
SPR666	B. sprouts	Халсал-Великобританія	2000	0,0
Romulus	B. sprouts	Халсал-Великобританія	2000	4,5
SPR666	B. sprouts	Роеслар-Бельгія	2001	0,0
Romulus	B. sprouts	Роеслар-Бельгія	2001	3,3
A876	B. sprouts	Халсал-Великобританія	2001	0,0
Maximus	B. sprouts	Халсал-Великобританія	2001	4,5
E245	Цвітна капуста	Халсал-Великобританія	2001	0,0
White Rock	Цвітна капуста	Халсал-Великобританія	2001	4,6
F1187	Білокачанна капуста	Халсал-Великобританія	2001	0,0
Marathon	Білокачанна капуста	Халсал-Великобританія	2001	3,5
E246	Цвітна капуста	Ганновер	2001	0,5
White Rock	Цвітна капуста	Ганновер	2001	1,9
F1182	Білокачанна капуста	Ганновер	2001	0,0
Marathon	Білокачанна капуста	Ганновер	2001	3,6

#### Приклад 4: Молекулярні маркери

Маркери, зчеплені з генетичним фактором RAPD, що зумовлює стійкість, оцінювали з використанням двох популяцій білокачанної капусти (D1544 та D1545). За допомогою двох молекулярних маркерів, отриманих з використанням праймерів O20 та Y13 відповідно, одержували продукти ПЛР-ампліфікації, міцно зчеплені з генетичним фактором, що обумовлює стійкість до кили. Результати, отримані з використанням O20, так і Y13, корелювали на 94,6% (53 випадки з 56) з результатом дослідження по оцінці ураження захворюванням (стійкість або чутливість) у популяції D1544, що свідчить про відстань на карті зчеплення, яка відповідає 5,4сМ. Для популяції D1555 при використанні O20 кореляція з результатами дослідження складала 100%, а при використанні Y13 - 95,7% (45 випадків з 47), що дозволяє припустити, міцне зчеплення (0сМ)

між O20 та генетичним фактором, що обумовлює стійкість, а зчеплення, що відповідає 4,3сМ, між Y13 та генетичним фактором, який обумовлює стійкість. При оцінці RAPD-маркерів у диплоїдній популяції білокачанної капусти, що складалася з 140 рослин, при використанні O20 виявлена 100%-на кореляція (0сМ), а при використанні Y13 98,6%-на (1,4сМ) кореляція з результатами дослідження з оцінки ураження захворюванням.

При використанні праймера O20 (5'-ACA CAC GCT G-3') одержували специфічний фрагмент довжиною приблизно 400 пар основ.

При використанні праймера Y13 (5'-GGG TCT CGG T-3') одержували специфічний фрагмент довжиною приблизно 640 пар основ.

Умови ампліфікації описані нижче. Після проведення ПЛР 25мкл ДНК аналізували в 1,8%-ному агарозному гелі.

ДНК	мкл (розведена ДНК зі стандартного мініпрепарата)
Праймер (10мкМ)	1,0мкл
дНТФ (2,5мМ)	2,0мкл
10-кратний буфер Platinum Taq	2,5мкл (200мМ Трис-НСІ рН8,4, 500мМ КСІ, що не містить MgCl <sub>2</sub> )
MgCl <sub>2</sub> (50мМ)	0,75мкл
Platinum Taq (BRL/life)	0,2мкл (Бод./мкл)
Стерильна вода	мкл (в залежності від кількості застосовуваної ДНК), кінцевий об'єм 25мкл

#### Програма ПЛР

Зхв. 94°C		
Рівень 0:00 94°C	0,10	1 цикл, ПЛР цикл (Perkin Elmer 9600)
Рівень 0:00 36°C	0,30	
Рівень 0: 45 72°C	1,05	
Зхв. 94°C		
Рівень 0: 00 94°C	0,10	40 циклів, ПЛР цикл (Perkin Elmer 9600)
Рівень 0: 00 36°C	0,30	
Рівень 0: 45 72°C	1,05	
Зхв. 72°C		

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; Syngenta Participations AG

<120> Рослини капусти *Brassica oleracea*,  
стійкі до захворювання килою

&lt;130&gt; 70059WO\_PCT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; GB 0217406.8

&lt;151&gt; 2002-07-26

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn версія 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; олігонуклеотид

&lt;400&gt; 1

acacacgctg

10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; олігонуклеотид

&lt;400&gt; 2

gggtctcggt

10