



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **122860** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)**C12Q 1/68** (2018.01)**C12N 15/29** (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)**A01H 5/10** (2018.01)**A01H 1/04** (2006.01)**A23D 9/00****C12N 9/02** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 04457**
(22) Дата подання заявки: **27.09.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **14.01.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **13/246,757**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **27.09.2011**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.08.2014, Бюл.№ 15**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **13.01.2021, Бюл.№ 2**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2012/057574, 27.09.2012**

(72) Винахідник(и):
**Джинджера Грегори Р. (СА),
Чжао Цзяньвей (СА),
Ріплі Ван Леонард (СА),
Убаясена Ласанта (US)**
(73) Володілець (володільці):
ДАУ АГРОСАЙЕНСІЗ ЕЛЕЛСІ,
9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268,
United States of America (US)
(74) Представник:
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.
№367**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2006/248611 A1, 02.11.2006
CN 101824472 A, 08.09.2010
Xueyi Hu et al. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of fad2 and fad3 allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). Theoretical and Applied Genetics; International Journal of Plant Breeding Research, Springer, Berlin, DE. 10.06.2006, vol. 113, P. 497-507
US 2009/202703 A1, 13.08.2009
WO 2011/060946 A1, 26.05.2011
NESI N. et al. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. C. R. BIOLOGIES. 04.09.2008, vol. 331, № 10, P. 763-771

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ РОСЛИНИ ЗІ СТІЙКІСТЮ ДО ЗАХВОРЮВАННЯ КИЛОЮ ХРЕСТОЦВІТИХ**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу ідентифікації рослини, яка містить мутацію в гені, що робить внесок в фенотип низького вмісту ліноленової кислоти, і стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у *Brassica napus*, що включає скринінг геномної ДНК з рослини на поліморфізм по одному нуклеотиду (SNP) в гені *fad3c*, де присутність SNP вказує на мутацію у вказаному гені, що робить внесок у вказаний фенотип низького вмісту ліноленової кислоти у *Brassica napus*, де SNP являє собою нуклеотид аденін в першому нуклеотиді 5'-сайта сплайсингу третього інтрона

UA 122860 C2

вказаного гена, де геномна ДНК рослини додатково містить тимідин (Т) в гені *fad2* в положенні, що відповідає положенню 411 SEQ ID NO: 7; способу отримання генетично модифікованої рослини з фенотипом низького вмісту ліноленової кислоти і стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, що включає введення полінуклеотиду SEQ ID NO: 12 в геномну ДНК рослини шляхом генетичної трансформації; рослини *Brassica*, з фенотипом низького вмісту ліноленової кислоти і стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, що містить вказані SNP в генах *fad3c* та *fad2*.

```

1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATATAGCCTCC 50
1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATATAGCCTCC 50
51 TGCTTCTACTACGTCGCGCACCACTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCTCT 100
51 TGCTTCTACTACGTCGCGCACCACTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCTCT 100
101 CTCCTACTTTCGCTGGCTCTCTACTGGGCTGCGAGGGCTGCGTCTTAA 150
101 CTCCTACTTTCGCTGGCTCTCTACTGGGCTGCGAGGGCTGCGTCTTAA 150
151 CCGGCGTCTGGGTATAGCCACAGTGGGCGCACCACTTCCAGCGAC 200
151 CCGGCGTCTGGGTATAGCCACAGTGGGCGCACCACTTCCAGCGAC 200
201 TACCAGTGGCTGGAGACACCGTGGGCTCATCTTCCACTCCTTCTCTCT 250
201 TACCAGTGGCTGGAGACACCGTGGGCTCATCTTCCACTCCTTCTCTCT 250
251 CGTCCCTTACTTCTCTGGAAGTACAGTCATCGAGCGCACCATTTCAACA 300
251 CGTCCCTTACTTCTCTGGAAGTACAGTCATCGAGCGCACCATTTCAACA 300
301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTGTTGCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350
301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTGTTGCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350
351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCTTTGGGACGCGACGTGAT 400
351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCTTTGGGACGCGACGTGAT 400
401 GTTAAACGGTTTAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGACTTAGCCTTCAACG 450
401 GTTAAACGGTTTAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGACTTAGCCTTCAACG 450
451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCACCCCAAC 500
451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCACCCCAAC 500
501 GCTCCCATCTACAACGACGCTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550
501 GCTCCCATCTACAACGACGCTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550
551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTCTACCGCTACGCTGCTTCCAAG 600
551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTCTACCGCTACGCTGCTTCCAAG 600
601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650
601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650
651 GGGTCTTAGTTTGTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700
651 GGGTCTTAGTTTGTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700
701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750
701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750
751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATCGGAT 850
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATCGGAT 850
851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACITGGGAGAGTATTATCAGTTCC 900
851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACITGGGAGAGTATTATCAGTTCC 900
901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCGAAGGAGTGTATC 950
901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCGAAGGAGTGTATC 950
951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985
951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985

```

Фиг. 1b

Фиг. 1a

---- Continued

Пріоритет, що запитується

За даною заявкою запитується пріоритет патентної заявки США з порядковим № 13/246757, поданої 27 вересня 2011 р.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Дане розкриття стосується рослин, стійких до захворювань, наприклад, рослин *Brassica napus*, стійких до захворювання килою хрестоцвітих. Дане розкриття стосується також молекулярних маркерів, які зчеплені зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих. У конкретних варіантах здійснення розкриття стосується композицій і способів введення в рослину стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, наприклад, шляхом використання молекулярних маркерів, зчеплених зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих. Конкретні варіанти здійснення стосуються способів використання конкретних послідовностей нуклеїнової кислоти для ідентифікації рослин, які, очевидно, мають фенотип стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

Відомий рівень техніки

Кила хрестоцвітих являє собою широко поширене захворювання, яке створює серйозні проблеми в багатьох зонах вирощування *Brassica*. Див., наприклад, Dixon (1999) *Grower April* 29:28-9. Захворювання викликається одноклітинним організмом *Plasmodiophora brassicae*. Симптоми захворювання включають аномалії коріння з твердими напливами (булавами), які в кінцевому результаті гниють. Захворювання також викликає карликовість через придушення росту, і за нестачі води спостерігається в'янення листя. Контролювання захворювання за допомогою хімічних агентів є неефективним.

Рід *Brassica* включає декілька видів, які становлять комерційний інтерес, таких, як *B. gara* (наприклад, пекінська капуста, китайська капуста, турнепс); *B. napus* (наприклад, олійне насіння, бруква); *B. juncea* (наприклад, гірчиця); *B. nigra* (наприклад, чорна гірчиця) і *B. oleracea* (наприклад, цвітна капуста, броколі, качанна капуста, брюссельська капуста, савойська капуста, листовка капуста, кольрабі, браунколь і т. д.). Тоді як підвиди в межах виду роду *Brassica* звичайно є сумісними відносно розмноження, це необов'язково у випадку розмноження різних видів роду *Brassica*. Наприклад, *B. gara* і *B. oleracea* не мають однакової кількості хромосом (10 хромосом відносно 9 хромосом) і, отже, є несумісними відносно розмноження. Це створює особливі труднощі для перенесення ознак від одного виду *Brassica* до іншого.

У межах роду *Brassica* описано декілька варіантів походження стійкості до кили хрестоцвітих. Див., наприклад, Bradshaw et al. (1997) *Ann. Appl. Biol.* 130:337-48; Gowers (1982) *Euphytica* 31:971-6. Деякі варіанти стійкості є моногенними, деякі полігенними, деякі є домінантними, деякі є рецесивними. Моногенна домінантна стійкість описана у *B. gara* і *B. napus*, така, як, наприклад, моногенна домінантна стійкість у пекінської капусти *B. gara*. Yoshikawa (1983) *Japan Agricultural Research Quarterly* 17(1):6-11. Гібриди F₁ пекінської капусти з такою стійкістю, як показано, мають хороший захист проти кили хрестоцвітих, хоча невелика кількість ліній ("рас") кили хрестоцвітих має здатність руйнувати цю стійкість.

Інфекційне захворювання килою хрестоцвітих розглядається як головна загроза промислового розведенню каноли. Спроби схрещування сортів каноли зі стійкістю до кили хрестоцвітих повинні давати істотну кількість рослин із розщепленням, які потребують скринінгу їх стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Поточна практика скринінгу продуктів схрещування на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих включає фенотипування індивідуальних рослин шляхом спостереження за фенотипічною реакцією цієї рослини після інокуляції рослини патогеном *P. brassicae*. Цей і без того складний процес, що вимагає витрат часу, додатково ускладнюється поточними регуляторними обмеженнями на транспорт патогену кили хрестоцвітих або будь-якого матеріалу, що інфікує. Попередні міркування роблять ціну скринінгу продуктів схрещування на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих надто високою, а також істотно ускладнюють спроби схрещування за рахунок обмеження кількості ліній, які можуть бути протестовані одночасно.

Розкриття винаходу

У цьому документі описується рослина *Brassica* spp. і її частини, де рослина включає щонайменше одну ознаку, вибрану з групи, яка складається з: високого вмісту олеїнової і/або низького вмісту ліноленової кислоти; стійкості до *Plasmodiophora brassicae*; стійкості до гербіциду (наприклад, до гліфосату або імідазолінонового гербіциду) і відновлення цитоплазматичної чоловічої стерильності. У деяких варіантах здійснення рослина *Brassica* spp. вибрана з групи, яка складається з *B. gara*, *B. napus*, *B. juncea*, *B. nigra* і *B. oleracea*. Наприклад, в конкретних варіантах здійснення використовується *B. napus*. У конкретних варіантах здійснення пропонується рослина *Brassica* spp., де у рослини підтверджується наявність високого вмісту олеїнової і/або низького вмісту ліноленової кислоти порівняно з рослиною

дикого типу того ж виду, підтверджується стійкість до *Plasmodiophora brassicae* порівняно з рослиною дикого типу того ж виду, виявляється стійкість до імідазолінону порівняно з рослиною дикого типу того ж виду, і вона включає ген-відновник системи цитоплазматичної чоловічої стерильності. Конкретні варіанти здійснення можуть включати спосіб вирощування рослини

Brassica spp. або її частин відповідно до винаходу в полі, що включає *P. brassicae*.
У конкретних варіантах здійснення рослина (або її частини) може включати геном, гомозиготний відносно генетичних алелей, які є природними для першого батька і неприродними для другого батька рослини, де у другого батька підтверджується наявність істотно більш низького вмісту олеїнової і/або більш високого вмісту ліноленової кислоти, ніж у першого батька. У деяких прикладах рослина (або її частини) включає алелі від першої рослини в гібриді або інбредної комбінації щонайменше в одному локусі, вибраному з локусу, картованого в групі зчеплення, яка вибрана з N14, N4, N5 і N1 виду Brassica. У конкретних прикладах алель від першої рослини може бути картований за допомогою одного або більше маркерів, представлених SEQ ID NO: 5, 6, 14, і 15.

У цьому документі описуються також молекулярні маркери нуклеїнової кислоти, які зчеплені (наприклад, зчеплені, тісно зчеплені або гранично тісно зчеплені) з фенотипом Brassica napus із високим вмістом олеїнової кислоти (НО) і/або низьким вмістом ліноленової кислоти (LL). У конкретних варіантах здійснення маркер, який зчеплений з фенотипом НО, зчеплений з мутацією в гені fad2. У конкретних варіантах здійснення маркер, який зчеплений з фенотипом LL, зчеплений з мутацією в гені fad3. У деяких варіантах здійснення маркери, які зчеплені з фенотипом НО/LL в *B. napus*, можуть бути використані для введення фенотипу НО/LL в інші рослини (наприклад, інші види Brassica). Деякі варіанти здійснення включають способи застосування щонайменше одного молекулярного маркера нуклеїнової кислоти, який зчеплений з фенотипом НО/LL в *B. napus*, наприклад, без обмеження, для ідентифікації рослин з фенотипом НО/LL; і/або для введення фенотипу НО/LL в нові генотипи рослин і зародкову плазму (наприклад, шляхом селекції з використанням маркерів або генетичної трансформації).

Додатково описуються способи введення фенотипу НО в рослину роду Brassica і способи введення фенотипу LL в рослину роду Brassica. У деяких прикладах спосіб введення фенотипу НО в рослину роду Brassica полягає в мутації із заміною "C" на "T" в положенні 411 гена fad2 в рослині *B. napus*. У деяких прикладах спосіб введення фенотипу LL в рослину роду Brassica полягає в мутації із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена fad32 в рослині *B. napus*.

Описується також спосіб ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип НО рослини роду Brassica. У деяких прикладах способом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок в фенотип НО, є зонд, який специфічно гібридизується із сегментом гена fad2 *B. napus*, що містить мутацію із заміною "C" на "T" в положенні 411, але не гібридизується з тим же самим сегментом гена fad2 *B. napus* дикого типу без цієї мутації. Описується також спосіб ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип LL рослини роду Brassica. У деяких прикладах способом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок в фенотип LL, є зонд, який специфічно гібридизується з сегментом гена fad32 *B. napus*, що містить мутацію із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону, але не гібридизується з тим же самим сегментом гена fad32 *B. napus* дикого типу без цієї мутації.

У деяких варіантах здійснення насіння рослини Brassica spp. за винаходом може включати щонайменше 63 % олеїнової кислоти (C18:1). Наприклад, насіння рослини Brassica spp. за винаходом може включати щонайменше 77 % олеїнової кислоти (C18:1). У деяких варіантах здійснення насіння рослини Brassica spp. за винаходом може включати не більше 6 % ліноленової кислоти (C18:3). Наприклад, насіння рослини Brassica spp. за винаходом може включати не більше 1,5 % ліноленової кислоти (C18:3).

У деяких варіантах здійснення рослина за винаходом (або її частина) може включати нуклеотидну послідовність, яка здатна специфічно гібридизуватися з комплементарною нуклеотидною послідовністю, вибраною з групи, яка складається з SEQ ID NO: 7 і 12. У цих і додаткових варіантах здійснення рослина або її частини можуть бути стійкі до імідазолінону (наприклад, імідазолінону, вибраному з групи імазаметбензу, імазамоксу, імазапіку, імазапіру, імазахіну і імазетапіру). Особливі варіанти здійснення включають спосіб контролювання щонайменше одного бур'яну в полі, де поле містить щонайменше одну рослину Brassica spp. або її частини, і застосування імідазолінону щонайменше в частині поля.

У цьому документі описуються також молекулярні маркери нуклеїнової кислоти, які зчеплені (наприклад, зчеплені, тісно зчеплені або гранично тісно зчеплені) з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих у Brassica napus. У деяких варіантах здійснення маркери, які зчеплені з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих у *B. napus*, можуть бути

використані для введення фенотипу стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в інші рослини (наприклад, інші види *Brassica*). Деякі варіанти здійснення включають способи застосування щонайменше одного молекулярного маркера нуклеїнової кислоти, який зчеплений з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих у *B. napus*, наприклад, і без обмеження, для ідентифікації рослин із фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих; і/або для введення фенотипу стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в генотипи нових рослин (наприклад, шляхом селекції з використанням маркерів або генетичної трансформації). У конкретних прикладах маркер, який зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, може бути визначений і/або ідентифікований шляхом ампліфікації ДНК із використанням праймера, вибраного з групи, яка складається з SEQ ID NO: 18-22, або його функціонального еквівалента.

Додатково описуються способи введення стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в рослину *Brassica* spp. і способи ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих. У деяких прикладах спосіб введення стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в рослину *Brassica* spp. полягає у використанні послідовного сегмента геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів з SEQ ID NO: 18 і 19, причому маркер зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у рослини *B. napus*. Описуються також способи ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок в стійкість до захворювання килою хрестоцвітих. У деяких прикладах способом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, є зонд, який специфічно гібридується з послідовним сегментом геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів з SEQ ID NO: 18 і 19.

Представлені вище і інші особливості стануть більш зрозумілими з подальшого докладного опису деяких варіантів здійснення, які представлені з посиланням на супроводжуючі фігури.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 включає часткові геномні нуклеотидні послідовності гена *fad2*, клонованого з сортів *B. napus* DMS100 і Quantum. Вгорі показана часткова геномна нуклеотидна послідовність гена *fad2*, клонованого з DMS100 (SEQ ID NO:7), а внизу показана послідовність часткової геномної нуклеотидної послідовності гена *fad2*, клонованого з Quantum (SEQ ID NO:9). Вістря стрілки вказує на мутацію одиничного нуклеотиду із заміною "C" на "T", що приводить до стоп-кодону ("TAG") (заштриховано). Мутантні специфічні для алеля прямий (SEQ ID NO:5) і зворотний (SEQ ID NO:6) праймери для ідентифікації за допомогою ПЛР маркера, специфічного для мутантного алеля, показані жирним шрифтом і підкреслені.

Фіг. 2 включає амінокислотні послідовності гена *fad2* із вираженої геномної нуклеотидної послідовності, клонованої з DMS100 (SEQ ID NO:8), Quantum (SEQ ID NO:10) і з опублікованого гена *fad2* *Brassica napus* (BN*fad2*) (SEQ ID NO:11). Вістря стрілки вказує на положення стоп-кодону, який виникає через мутацію одиничного нуклеотиду (заміна "C" на "T") у DMS100.

Фіг. 3 включає геномні нуклеотидні послідовності гена *fad3c*, клоновані з DMS100 і Quantum. Вгорі показаний ген *fad3c*, клонований з DMS100 (SEQ ID NO:12), а внизу показаний ген *fad3c*, клонований з Quantum (SEQ ID NO:13). Екзони, які відповідають екзонам 4, 5, 6 і 7 гена *fad3* у *Brassica rapa* і *Arabidopsis*, взяті в прямокутники, а інтрони, які відповідають інтронам 4, 5 і 6 гена *fad3* в *Brassica rapa* і *Arabidopsis*, не взяті в прямокутники. Вістря стрілки вказує на мутацію одиничного нуклеотиду із заміною "G" на "A". Прямий (SEQ ID NO:14) і мутантний, специфічний для алеля зворотний (SEQ ID NO:15) праймери для ідентифікації за допомогою ПЛР маркера, специфічного для мутантного алеля, показані жирним шрифтом і підкреслені.

Фіг. 4 включає таблицю, в якій представлені кореляції маркерів, специфічних для мутантного алеля, із вмістом жирних кислот в 184 двічі гаплоїдних (DH) лініях, що походять від схрещування Quantum і DMS100 (вгорі), а також результати електрофорезу продуктів ПЛР, ампліфікованих із маркера, специфічного для мутантного алеля гена *fad2* (внизу).

Фіг. 5 включає картування локусу кількісних ознак (QTL), що показує одну головну (N5) і одну мінорную (N1) область QTL для високого вмісту олеїнової кислоти (C18:1) і три області QTL (N4 і N14) для низького вмісту ліноленої кислоти (C18:3), визначені за допомогою маркерів за даним винаходом.

Фіг. 6 включає схематичне представлення одного варіанта застосування системи цитоплазматичної чоловічої стерильності в схемі отримання гібридного насіння.

Фіг. 7 включає діаграму, яка показує розподіл профілів жирних кислот для різних гібридів рослин.

Фіг. 8 включає ілюстрацію розподілу дат цвітіння у ілюстративних рослин каноли, стійких до захворювання килою хрестоцвітих із високим вмістом олеїнової кислоти і низьким вмістом ліноленової кислоти.

Фіг. 9 включає зображення гелю, що демонструє ідентифікацію молекулярного маркера, зчепленого зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у каноли. Смука ідентифікованого маркера, зчепленого зі стійкістю до кили хрестоцвітих, виділена червоним, і в цьому випадку розмір ампліфікованого фрагмента становить 333 п. о. (33 додаткових пари основ сумарно були додані до праймерів SEQ ID NO: 18 і 19 (26 основ було додано до 5'-кінця SEQ ID NO:18, і 7 основ було додано до 5'-кінця SEQ ID NO:19, як представлено в SEQ ID NO: 20 і 21 відповідно) для полегшення визначення з використанням генетичного аналізатора ABI 3130). Представлена реакція кожної лінії на захворювання килою хрестоцвітих.

Перелік послідовностей

Послідовності нуклеїнових кислот, перераховані в прикладеному переліку послідовностей, представлені з використанням стандартних буквених аббревіатур для нуклеотидних основ, як визначено в § 1.822 37 C.F.R., показаний тільки один ланцюг кожної послідовності нуклеїнової кислоти, але зрозуміло, що комплементарний ланцюг підлягає включенню при будь-якому посиланні на представлений ланцюг.

SEQ ID NO: 1-2 являють собою праймери, що використовуються для ампліфікації гена *fad2* геномної ДНК *B. napus* батьківських ліній DMS100 і Quantum.

SEQ ID NO: 3-4 являють собою праймери, що використовуються для ампліфікації гена *fad31* геномної ДНК *B. napus* батьківських ліній DMS100 і Quantum.

SEQ ID NO: 5 являє собою специфічний для мутанта прямий праймер для ідентифікації і/або визначення алеля *fad2*, який робить внесок у високий вміст олеїнової і/або низький вміст лінолевої кислоти у *Brassica*.

SEQ ID NO: 6 являє собою зворотний праймер для ідентифікації і/або визначення алеля *fad2*, який робить внесок у високий вміст олеїнової і/або низький вміст лінолевої кислоти у *Brassica*.

SEQ ID NO: 7 являє собою батьківську геномну нуклеотидну послідовність гена *fad2*, клоновану з сорту *B. napus* DMS100.

SEQ ID NO: 8 являє собою амінокислотну послідовність продукту гена *fad2* з вирожденної геномної нуклеотидної послідовності, клонованої з сорту *B. napus* DMS100, причому послідовність, як показано, перервана "стоп"-кодоном.

SEQ ID NO: 9 являє собою батьківську геномну нуклеотидну послідовність гена *fad2*, клоновану з сорту *B. napus* Quantum.

SEQ ID NO: 10 являє собою амінокислотну послідовність продукту гена *fad2* з вирожденної геномної нуклеотидної послідовності, клонованої з сорту *B. napus* Quantum.

SEQ ID NO: 11 являє собою амінокислотну послідовність продукту гена *fad2* з вирожденної геномної нуклеотидної послідовності з сорту *B. napus* BN*fad2*.

SEQ ID NO: 12 являє собою геномну нуклеотидну послідовність гена *fad3c*, клоновану з сорту *B. napus* DMS100.

SEQ ID NO: 13 являє собою геномну нуклеотидну послідовність гена *fad3c*, клоновану з сорту *B. napus* Quantum.

SEQ ID NO: 14 являє собою прямий праймер для ідентифікації і/або визначення алеля *fad32*, який робить внесок у високий вміст олеїнової і/або низький вміст лінолевої кислоти у *Brassica*.

SEQ ID NO: 15 являє собою специфічний для мутанта зворотний праймер для ідентифікації і/або визначення алеля *fad32*, який робить внесок у високий вміст олеїнової і/або низький вміст лінолевої кислоти у *Brassica*.

SEQ ID NO: 16 і 17 являють собою праймери, що використовуються для ампліфікації гена *fad32* геномної ДНК *B. napus* батьківських ліній DMS100 і Quantum.

SEQ ID NO: 18-21 являють собою послідовності ілюстративних праймерів, придатних для ідентифікації і/або визначення маркера стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

SEQ ID NO: 22 являє собою послідовність флуоресцентно міченого універсального праймера M13, що використовується для ампліфікації мічених фрагментів ДНК при використанні для визначення з SEQ ID NO: 20 і 21.

Варіант(и) здійснення винаходу

I. Огляд декількох варіантів здійснення

У цьому документі описуються рослини *Brassica* spp. (наприклад, *B. napus*) і їхнє потомство, яке включає фенотип стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. У цьому документі описуються також частини рослини, отримані з рослини *Brassica*, включаючи насіння і рослинні

матеріали рослини. У конкретних варіантах здійснення стійкість до кили хрестоцвітих може бути моногенною і/або мультигенною. У конкретних варіантах здійснення стійкість до кили хрестоцвітих може бути домінантною і/або рецесивною.

При використанні рослини *Brassica napus*, яка включає фенотип стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, ідентифіковані молекулярні маркери, які тісно зчеплені з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Зокрема ідентифікований локус маркера, що являє собою повтор короткої послідовності (SSR), який тісно зчеплений із фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Цей маркер SSR може бути особливо придатний для введення цього фенотипу в інші рослини (наприклад, інші сорти *B. napus* і інші види *Brassica*), наприклад, шляхом традиційного схрещування рослин, а також для ідентифікації рослин, які ймовірно мають цей фенотип (наприклад, серед рослин, створених рекомбінантним генно-інженерним способом). Використання щонайменше одного молекулярного маркера, який тісно зчеплений із фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, в програмі схрещування *Brassica* може істотно знизити час і вартість скринінгу матеріалів для схрещування на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих. Наприклад, використання такого маркера може знизити необхідність у скринінгу, що дорого коштує, на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, тим самим істотно полегшуючи схрещування сортів каноли зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих.

II. Терміни

Зворотне схрещування: Методи зворотного схрещування можуть бути використані для введення послідовності нуклеїнової кислоти в рослини. Метод зворотного схрещування широко використовується протягом десятиріч для введення нових ознак в рослини. Jensen, N., Ed. *Plant Breeding Methodology*, John Wiley & Sons, Inc., 1988. При типовому протоколі зворотного схрещування вихідний сорт (рекурентний батько), що становить інтерес, схрещується з другим сортом (нерекурентним батьком), який несе ген, що становить інтерес, призначений для перенесення. Отримане потомство від цього схрещування потім знову схрещують із рекурентним батьком, і процес повторюють доти, поки не отримають рослину, де в трансформованій рослині відкриваються по суті всі бажані морфологічні і фізіологічні характеристики рекурентного батька в доповнення до гена, перенесеного від нереккурентного батька.

Стійкість до кили хрестоцвітих: Стійкість або толерантність рослини до кили хрестоцвітих стосується збільшеного росту, продуктивності і/або зниження розміру і/або кількості кореневих наплівів у рослини порівняно з нестійким і/або нетолерантним сортом тієї ж рослини при вирощуванні в полі, що включає *Plasmodiophora brassicae*. При застосуванні в даному описі стійкість до кили хрестоцвітих також включає толерантність до кили хрестоцвітих. Стійкість до кили хрестоцвітих може бути додана за допомогою одного або більше генів, алелей або трансформантів.

Генетичний локус: При застосуванні в даному описі термін "генетичний локус" стосується локалізації в хромосомі.

Геномний локус: При застосуванні в даному описі термін "геномний локус" стосується локалізації в межах повного набору хромосом організму.

Нерівноважне зчеплення: При застосуванні в даному описі термін "нерівноважне зчеплення" стосується статистичного зв'язку між двома локусами або між властивістю і маркером.

Зчеплений, міцно зчеплений і гранично міцно зчеплений: При застосуванні в даному описі зчеплення між генами або маркерами стосується феномена, при якому гени або маркери в хромосомі виявляють імовірність, що піддається вимірюванню, спільної передачі індивідуумам у подальшому поколінні. Зчеплення двох генів або маркерів відбувається відносно один одного, ця імовірність виникає при зчепленні з (1). Таким чином, термін "зчеплений" може стосуватися одного або більше генів або маркерів, які передаються разом із геном з імовірністю більше 0,5 (яка очікується при незалежному наборі, коли маркери/ген локалізовані на різних хромосомах). Оскільки близькість двох генів або маркерів у хромосомі прямо пов'язана з імовірністю того, що ці гени або маркери будуть спільно передані індивідуумам у наступному поколінні, термін "зчеплені" в даному описі може також стосуватися одного або більше генів або маркерів, які локалізовані в межах приблизно 2,0 Мб відносно один одного в одній і тій же хромосомі *Brassica spp.* Таким чином, два "зчеплені" гени або маркери можуть бути розділені приблизно 2,1 Мб; 2,00 Мб; приблизно 1,95 Мб; приблизно 1,90 Мб; приблизно 1,85 Мб; приблизно 1,80 Мб; приблизно 1,75 Мб; приблизно 1,70 Мб; приблизно 1,65 Мб; приблизно 1,60 Мб; приблизно 1,55 Мб; приблизно 1,50 Мб; приблизно 1,45 Мб; приблизно 1,40 Мб; приблизно 1,35 Мб; приблизно 1,30 Мб; приблизно 1,25 Мб; приблизно 1,20 Мб; приблизно 1,15 Мб; приблизно 1,10 Мб; приблизно 1,05 Мб; приблизно 1,00 Мб; приблизно 0,95 Мб; приблизно 0,90 Мб; приблизно 0,85

Мб; приблизно 0,80 Мб; приблизно 0,75 Мб; приблизно 0,70 Мб; приблизно 0,65 Мб; приблизно 0,60 Мб; приблизно 0,55 Мб; приблизно 0,50 Мб; приблизно 0,45 Мб; приблизно 0,40 Мб; приблизно 0,35 Мб; приблизно 0,30 Мб; приблизно 0,25 Мб; приблизно 0,20 Мб; приблизно 0,15 Мб; приблизно 0,10 Мб; приблизно 0,05 Мб; приблизно 0,025 Мб; приблизно 0,012 Мб і приблизно 0,01 Мб. Ген може бути "зчеплений" із маркером, який знаходиться в межах екзону або інтрону гена. У цьому випадку розділення між зчепленими геном і маркером становить 0,00 Мб.

Конкретні приклади маркерів, які "зчеплені" з *fad2*, включають нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N5 і N1 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "С" на "Т" в положенні 411 гена *fad2* *B. napus*. Конкретні приклади маркерів, які "зчеплені" з *fad3*, включають нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N14 і N4 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* у *B. napus*.

Маркери і/або гени можуть також бути "зчепленими" з фенотипом, наприклад, із фенотипом, в який залучений зчеплений ген або ген, зчеплений зі зчепленим маркером. Деякі варіанти здійснення включають маркери, які зчеплені з HO, LL, стійкістю до імідазолінону і/або фенотипами стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Конкретні приклади маркерів, які "зчеплені" з фенотипами HO/LL, включають маркери, які зчеплені з *fad2* і *fad3*. Конкретні приклади маркерів, які "зчеплені" з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, включають послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. у довжину і ампліфікується ілюстративними праймерами SEQ ID NO: 16 і 17. Як повинно бути зрозуміло фахівцям в даній галузі техніки, довжина цього маркера SSR буде варіюватися, якщо нуклеотиди додаються або видаляються з ділянки геномної ДНК, локалізованої між дистальними кінцями конкретних праймерів, що використовуються при відпаді.

При застосуванні в даному описі термін "тісно зчеплений" може стосуватися одного або більше генів або маркерів, які розташовані в межах приблизно 0,5 Мб відносно один одного в одній і тій же хромосомі. Таким чином, два "тісно зчеплені" гени або маркери можуть бути розділені приблизно 0,6 Мб; приблизно 0,55 Мб; 0,5 Мб; приблизно 0,45 Мб; приблизно 0,4 Мб; приблизно 0,35 Мб; приблизно 0,3 Мб; приблизно 0,25 Мб; приблизно 0,2 Мб; приблизно 0,15 Мб; приблизно 0,12 Мб; приблизно 0,1 Мб; приблизно 0,05 Мб і приблизно 0,00 Мб. Конкретні приклади маркерів, які "тісно зчеплені" з *fad2*, включають певні нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N5 і N1 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "С" на "Т" в положенні 411 гена *fad2* *B. napus*. Конкретні приклади маркерів, які "тісно зчеплені" з *fad3*, включають певні нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N14 і N4 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* *B. napus*. Конкретні приклади маркерів, які "тісно зчеплені" з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, включають послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується ілюстративними праймерами SEQ ID NO: 16 і 17.

При застосуванні в даному описі термін "гранично тісно зчеплений" може стосуватися одного або більше генів або маркерів, які розташовані в межах приблизно 100 т. п. о. відносно один одного в одній і тій же хромосомі. Таким чином, два "гранично тісно зчеплені" гени або маркери можуть бути розділені приблизно 125 т. п. о.; приблизно 120 т. п. о.; приблизно 115 т. п. о.; приблизно 110 т. п. о.; приблизно 105 т. п. о.; 100 т. п. о.; приблизно 95 т. п. о.; приблизно 90 т. п. о.; приблизно 85 т. п. о.; приблизно 80 т. п. о.; приблизно 75 т. п. о.; приблизно 70 т. п. о.; приблизно 65 т. п. о.; приблизно 60 т. п. о.; приблизно 55 т. п. о.; приблизно 50 т. п. о.; приблизно 45 т. п. о.; приблизно 40 т. п. о.; приблизно 35 т. п. о.; приблизно 30 т. п. о.; приблизно 25 т. п. о.; приблизно 20 т. п. о.; приблизно 15 т. п. о.; приблизно 12 т. п. о.; приблизно 10 т. п. о.; приблизно 5 т. п. о.; приблизно 1 т. п. о. і приблизно 0 т. п. о. Конкретні приклади маркерів, які "гранично тісно зчеплені" з *fad2*, включають певні нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N5 і N1 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "С" на "Т" в положенні 411 гена *fad2* *B. napus*. Конкретні приклади маркерів, які "гранично тісно зчеплені" з *fad3*, включають певні нуклеотидні послідовності в групі зчеплення N14 і N4 геному *B. napus*, наприклад, з мутацією із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* *B. napus*. Конкретні приклади маркерів, які "гранично тісно зчеплені" з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, включають послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується ілюстративними праймерами SEQ ID NO: 16 і 17.

Зчеплені, тісно зчеплені і гранично тісно зчеплені генетичні маркери можуть застосовуватися в програмах селекції з використанням маркерів для ідентифікації індивідуумів, які включають зчеплені фенотипи і/або типи генів, і для відтворення цих ознак і/або генів у сортах *Brassica*.

Локус: При застосуванні в даному описі термін "локус" стосується положення в геномі, яке відповідає властивості (наприклад, ознаці), що піддається вимірюванню. Локус SNP визначається зондом, яким гібридується з ДНК, яка міститься в межах локусу.

Маркер: При застосуванні в даному описі маркер стосується гена або нуклеотидної послідовності, яка може бути використана для ідентифікації рослин, що мають певний алель, наприклад, *fad2*, *fad3* і послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується ілюстративними праймерами SEQ ID NO: 16 і 17. Маркер може бути описаний як варіант даного геномного локусу. Генетичний маркер може являти собою коротку послідовність ДНК, таку, як послідовність навколо зміни однієї пари основ (поліморфізм по одному нуклеотиду або "SNP"), або більш довгу послідовність, наприклад, повтор мінісателітної/простої послідовності ("SSR"). "Алель маркера" стосується варіанта маркера, який присутній в конкретній рослині. При застосуванні в даному описі "маркер" включає посилання на локус у хромосомі, який служить для ідентифікації індивідуального положення в хромосомі. Генотип може бути визначений за допомогою використання одного або множини маркерів. Таким чином, "маркер" включає посилання на одне або більше положення(положень) нуклеотиду в гені, локалізованому в хромосомі геному.

Молекулярні маркери особливо придатні для прискорення процесу введення гена або локусів кількісних ознак (QTL) в елітний сорт культурної рослини або лінію, що схрещується, шляхом зворотного схрещування. Маркери, зчеплені з геном, можуть бути використані для селекції рослин, що мають бажану ознаку, і маркери, розподілені по геному, можуть бути використані для селекції рослин, які генетично схожі з рекурентним батьком. Young and Tanksley (1989) *Theor. Appl. Genet.* 77:95-101; Hospital et al. (1992) *Genetics* 132:1199-210.

При застосуванні в даному описі термін "маркер" може стосуватися клонованого сегмента хромосомної ДНК Brassica (наприклад, сегмента з нуклеотидною послідовністю або SEQ ID NO:7, або SEQ ID NO:12) і може також або альтернативно стосуватися молекули ДНК, яка комплементарна до клонованого сегмента хромосомної ДНК Brassica.

Деякі варіанти здійснення включають "похідне" маркера. При застосуванні в даному описі термін "похідне" може стосуватися модифікації конкретної послідовності маркера. Ілюстраціями таких модифікацій відносно молекулярних маркерів є заміна, вставка і/або делеція однієї або більше основ відносно послідовності нуклеїнової кислоти маркера, розкритої в даному описі, які зберігають, злегка змінюють або підвищують функцію молекулярного маркера відносно ідентифікації однієї або більше ознаки(ознак) (наприклад, стійкість до захворювання килою хрестоцвітих і ознак високого вмісту олеїнової і/або низького вмісту ліноленової кислот у Brassica або інших видів насінневих культур). Такі похідні можуть бути легко визначені фахівцем в даній галузі техніки, наприклад, за допомогою використання методів комп'ютерного моделювання для прогнозу і оптимізації структури послідовності. Термін "похідне", таким чином, включає послідовності нуклеїнової кислоти, які по суті ідентичні до однієї або більше послідовностей розкритих в даному описі маркерів, так що похідні маркерів здатні мати розкриті функції для використання в селекції з використанням маркерів.

Селекція з використанням маркерів: При застосуванні в даному описі термін "селекція з використанням маркерів" може стосуватися підходу до селекції безпосередньо одного або більше комплексів ознак (наприклад, HO, LL, стійкість до імідазолінону і/або стійкість до захворювання килою хрестоцвітих). У сучасній практиці селекціонери рослин роблять спроби ідентифікації ознак, що легко визначаються, таких, як колір квіток, зовнішній вигляд оболонки насіння або варіанти ізозимів, які зчеплені з агрономічно бажаною ознакою. Селекціонери потім простежують агрономічну ознаку в розщеплюваних, селекційних популяціях, стежачи за розщепленням ознаки, що легко визначається. Однак існує дуже мало таких взаємовідносин зчеплення, доступних для використання при селекції рослин.

Селекція з використанням маркерів є способом поліпшення сортів рослин, доцільним відносно часу і ціни. Ряд прикладів застосування селекції з використанням маркерів включає використання ізозимних маркерів. Див., наприклад, Tanksley and Orton, eds. (1983) *Isozymes in Plant Breeding and Genetics*, Amsterdam: Elsevier. Одним прикладом є ізозимний маркер, зчеплений із геном стійкості до шкідників нематод у томатів. Стійкість контролюється геном, що означається *Mi*, розташованим у 6 хромосомі томата і дуже тісно зчепленим з *Aps1*, ізозимом - кислотою фосфатазою. Використання маркера ізозиму *Aps1* для непрямой селекції гена *Mi* створило переваги в тому, що розщеплення в популяції можна було однозначно визначити за допомогою стандартних методів електрофорезу; маркер ізозиму може бути кількісно оцінений в тканині розсади, що виключає необхідність підтримання рослини до дозрівання; і кодомінантні алелі маркера ізозиму дозволяють дискримінувати гомозигот від гетерозигот. Див. Rick (1983) in Tanksley and Orton, вище.

У деяких варіантах здійснення присутність маркера в рослині може бути визначена при використанні зонда нуклеїнової кислоти. Зонд може являти собою молекулу ДНК або молекулу РНК. РНК-зонди можуть бути синтезовані за допомогою методів, відомих в даній галузі техніки, наприклад, із використанням матриці молекули ДНК. Зонд може містити всю або частину нуклеотидної послідовності маркера і додаткову, прилеглу нуклеотидну послідовність з геному Brassica. У даному описі це означається як "прилеглий зонд". Додаткова, прилегла нуклеотидна послідовність означається як "яка лежить вище" або "яка лежить нижче" відносно вихідного маркера залежно від того чи знаходиться прилегла нуклеотидна послідовність із хромосоми Brassica на 5'- або на 3'-кінці вихідного маркера, як звичайно мається на увазі. У випадку прикладів маркерів, зчеплених з ознакою HO, додаткова, прилегла нуклеотидна послідовність може бути локалізована між вихідним маркером і положенням 411 гена *fad2* у хромосомі Brassica. У випадку прикладів маркерів, зчеплених з ознакою LL, додаткова, прилегла нуклеотидна послідовність може бути локалізована між вихідним маркером і першою основою 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad3* в хромосомі Brassica. Як відомо фахівцям в даній галузі техніки, спосіб отримання додаткової, прилеглої нуклеотидної послідовності для включення в маркер може бути повторюваний майже необмежено (обмежений тільки довжиною хромосоми), тим самим ідентифікуються додаткові маркери вздовж хромосоми Brassica. Всі описані вище маркери можуть бути використані в деяких варіантах здійснення даного винаходу.

Послідовність олігонуклеотидного зонда може бути отримана синтетично або з допомогою клонування. Придатні клонуючі вектори добре відомі фахівцям в даній галузі техніки. Олігонуклеотидний зонд може бути міченим або неміченим. Існує велика різноманітність методів мічення молекул нуклеїнових кислот, включаючи, наприклад, без обмеження: введення радіоактивної мітки за допомогою нік-трансляції; приєднання до хвоста кінцевої дезокситрансферази; або тому подібні, де використовуювані олігонуклеотиди мітять, наприклад, радіоактивним ^{32}P . Інші мітки, які можуть бути використані, включають, наприклад, і без обмеження: флуорофори; ферменти; субстрат ферментів; кофактори ферментів; інгібітори ферментів і тому подібне. Альтернативно використання мітки, яка дає сигнал, що піддається визначенню, сама по собі або в поєднанні з іншими реакційно-активними агентами, може бути замінене лігандами, з якими зв'язується рецептор, коли мітяться рецептори (наприклад, мітками, вказаними вище) для генерації сигналів, що піддаються визначенню, або самими рецепторами, або їх поєднанням з іншими реагентами. Див., наприклад, Leary et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4045-9.

Зонд може містити нуклеотидну послідовність, яка не прилягає до послідовності вихідного маркера, цей зонд означається в даному описі як "неприлеглий зонд". Послідовність неприлеглої зонда розташована досить близько до послідовності вихідного маркера в хромосомі Brassica, так що неприлеглий зонд звичайно зв'язаний з тим же самим геном (наприклад, *fad2* або *fad3*). Наприклад, в деяких варіантах здійснення неприлеглий зонд може бути розташований в межах 500 т. п. о.; 450 т. п. о.; 400 т. п. о.; 350 т. п. о.; 300 т. п. о.; 250 т. п. о.; 200 т. п. о.; 150 т. п. о.; 125 т. п. о.; 120 т. п. о.; 100 т. п. о.; 0,9 т. п. о.; 0,8 т. п. о.; 0,7 т. п. о.; 0,6 т. п. о.; 0,5 т. п. о.; 0,4 т. п. о.; 0,3 т. п. о.; 0,2 т. п. о. або 0,1 т. п. о. від вихідного маркера в хромосомі Brassica.

Зонд може являти собою точну копію маркера, призначеного для визначення. Зонд може також являти собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка включає або складається з нуклеотидної послідовності, яка по суті ідентична до клонованого сегмента хромосомної ДНК Brassica (наприклад, як показано для сегмента SEQ ID NO:7, включаючи нуклеотид в 411 положенні, або сегмента SEQ ID NO:12, включаючи положення першого нуклеотиду 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена). При застосуванні в даному описі термін "по суті ідентична" може стосуватися нуклеотидних послідовностей, які ідентичні більше, ніж на 85 %. Наприклад, по суті ідентична нуклеотидна послідовність може бути ідентична до референсної послідовності на 85,5 %; 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % або 99,5 %.

Зонд може також являти собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка "піддається специфічній гібридизації" або "специфічно комплементарна до" точної копії маркера, призначеного для визначення ("ДНК-мішені"). Терміни "піддається специфічній гібридизації" або "специфічно комплементарна до" є термінами, які вказують на достатній ступінь комплементарності, так що виникає стабільне і специфічне скріплення між молекулою нуклеїнової кислоти і ДНК-мішенню. Таким чином, в деяких прикладах зонд може бути комплементарний до ДНК-мішені. Однак молекула нуклеїнової кислоти необов'язково комплементарна на 100 % до своєї послідовності-мішені, з якою вона буде специфічно гібридизуватися. Молекула нуклеїнової кислоти піддається специфічній гібридизації, коли існує ступінь комплементарності, достатній для уникнення

неспецифічного скріплення нуклеїнової кислоти з усіма послідовностями-немішенями в умовах, коли бажане специфічне скріплення, наприклад, у жорстких умовах гібридизації. Таким чином, в деяких прикладах зонд може бути по суті ідентичним до комплементарної ДНК-мішені. Наприклад, зонд може бути ідентичний до комплементарної ДНК-мішені на 85,5 %; 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 % або 99,5 %.

Зонд може бути включений в молекулу нуклеїнової кислоти, яка включає додаткові послідовності нуклеїнової кислоти; наприклад, промотори; сигнали транскрипції; і/або послідовності вектора. Зонд може бути використаний для визначення додаткових маркерів, які тісно зчеплені з геном, залученим в HO, LL, стійкість до імідазолінону, і/або з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих (наприклад, *fad2* і *fad3*). Маркери, ідентифіковані таким чином, можуть бути еквівалентними ілюстративним маркерам, представленим в даному розкритті, і, таким чином, входять в об'єм винаходу.

Умови гібридизації, що приводять до конкретних ступенів жорсткості, повинні варіюватися залежно від природи вибраного методу гібридизації і складу і довжини послідовностей нуклеїнової кислоти, які гібридизуються. Звичайно температура гібридизації й іонна сила (особливо концентрація Na^+ і/або Mg^{++}) буфера для гібридизації будуть визначати жорсткість гібридизації, хоч час промивання також впливає на жорсткість. Розрахунки, що стосуються умов гібридизації, необхідні для досягнення конкретних ступенів жорсткості, відомі фахівцям у даній галузі техніки і обговорюються, наприклад, в Sambrook et al. (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11; and Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985. Додаткову докладну інструкцію і керівництво з гібридизації нуклеїнових кислот можна знайти, наприклад, в Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; and Ausubel et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995.

При застосуванні в даному описі "жорсткі умови" охоплюють умови, при яких гібридизація повинна наступати, тільки якщо існує менше 25 % помилкових спарювань між молекулою, яка гібридизується, і ДНК-мішенню. "Жорсткі умови" включають додаткові особливі умови жорсткості. Таким чином, при застосуванні в даному описі умови "помірної жорсткості" являють собою умови, при яких молекули з більше 25 % помилкових спарювань у послідовності не будуть гібридизуватися; умови "середньої жорсткості" являють собою умови, при яких молекули з більше 15 % помилкових спарювань не будуть гібридизуватися; і умови "високої жорсткості" являють собою умови, при яких послідовності з більше 10 % помилкових спарювань не будуть гібридизуватися. Умови "дуже високої жорсткості" являють собою умови, при яких послідовності з більше 6 % помилкових спарювань не будуть гібридизуватися.

У конкретних варіантах здійснення жорсткі умови являють собою гібридизацію при 65°C у буфері 6х фізіологічний розчин-цитрат натрію (SSC), 5х розчин Денхардта, 0,5 % SDS і 100 мкг ДНК сперми лосося з подальшими 15-30 хвилинними промиваннями при 65°C в 2х SSC буфері і 0,5 % SDS, потім в 1х SSC буфері і 0,5 % SDS, і нарешті в 0,2 х SSC буфері і 0,5 % SDS.

Імідазоліон: При застосуванні в даному описі термін "імідазоліон" стосується гербіциду, який втручається в дію ферменту ацетолактатсинтази (ALS), також відомого як синтаза ацетогідрокси кислоти (AHAS) в рослині, причому втручання може в кінцевому результаті приводити до загибелі рослини. Приклади імідазоліонів включають, але не обмежуються цим: імазаметбенз; імазамокс; імазапик; імазапир; імазахін і імазетапир.

При застосуванні в даному описі термін "стійкість до імідазолінону" стосується фенотипу, який характеризується щонайменше частково зниженням, ослабленням і/або зникненням небезпеки для здоров'я і/або життєздатності у стійкої рослини при порівнянні з рослиною дикого типу того ж виду. Стійкість до імідазолінону включає толерантність до імідазолінону. Стійкість до імідазолінону може бути додана за допомогою одного або більше генів, алелей або трансформантів, які змінюють ацетолактатсинтазу (ALS), також відому як синтаза ацетогідрокси кислоти (AHAS), що дозволяє ферменту бути стійким або толерантним до дії імідазоліонів. Ілюстративні гени, що надають стійкість до імідазоліонів, включають, але не обмежуються генами, описаними, наприклад, в статтях Lee et al. (1988) *EMBO J.* 7:1241, і Miki et al. (1990) *Theor. Appl. Genet.* 80:449 (обидві включені в даний опис як посилання в повному об'ємі). Стійкість або толерантність рослини до імідазолінону може дозволяти використання імідазоліонів при необхідності контролю над бур'янами в галузі культивування рослини.

InDel: При застосуванні в даному описі термін "InDel" використовується звичайно для опису вставки або делеції в гені. Таким чином, "InDel" означає конкретну мутацію, яка може являти собою або вставку, делецію, або їх поєднання. "Вставка" або "додавання" при застосуванні в

даному описі стосується зміни амінокислотної або нуклеотидної послідовності, що приводить до додавання одного або більше амінокислотних або нуклеотидних залишків відповідно, порівняно з природною молекулою.

"Вміст олії": При застосуванні в даному описі термін "вміст олії" стосується характеристики олії в рослині або частині рослини (наприклад, в насінні). У деяких варіантах здійснення вміст олії виражається у вигляді процента від сумарної сухої маси насіння. У деяких варіантах здійснення конкретний вміст рослинної олії є характеристикою конкретного сорту рослини і може бути використано для визначення відмінності рослини цього конкретного сорту від інших рослин того ж виду. Вміст олії може бути виміряний із використанням різних аналітичних методів, таких, як, наприклад, без обмеження: ЯМР, NIR, аналіз FAME і екстракція в системі Soxhlet. У конкретних варіантах здійснення характеристики вмісту олії можуть включати опис "процента олеїнової кислоти" і/або "процента ліноленої кислоти". При застосуванні в даному описі "процент олеїнової кислоти" стосується процента від сумарної олії насіння, що являє собою олеїнову кислоту при визначенні за допомогою аналізу FAME. При застосуванні в даному описі "процент ліноленої кислоти" стосується процента від сумарної олії насіння, що являє собою ліноленову кислоту при визначенні за допомогою аналізу FAME.

Аналіз FAME може бути використаний для вимірювання процентного вмісту жирної кислоти відносно сумарних жирних кислот у зразку. Відносно рослинної олії, її процент може бути визначений шляхом екстракції зразка олії з насіння, отримання метилових ефірів жирних кислот, присутніх в зразку цієї олії, і аналізу пропорцій різних жирних кислот у зразку з використанням газової хроматографії. Визначений таким чином вміст олії може бути відмінною характеристикою сорту.

Ідентичність послідовностей: Термін "ідентичність послідовностей" або "ідентичність" при застосуванні в даному описі в контексті двох послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептидних послідовностей може стосуватися залишків у двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні на максимальну відповідність у конкретному вікні порівняння.

Коли процент ідентичності послідовностей використовують відносно білків, зрозуміло, що положення залишків, які не є ідентичними, часто відрізняються консервативними амінокислотними замінами, коли амінокислотні залишки замінюються іншими амінокислотними залишками зі схожими хімічними властивостями (наприклад, зарядом, гідрофобністю або стеричними ефектами), і, отже, не змінюють функціональних властивостей молекули.

Отже, коли послідовності відрізняються консервативними замінами, процент ідентичності послідовностей може бути підвищений при вирівнюванні для корекції на консервативну природу заміни в сайті неідентичного залишку. Послідовності, які відрізняються такими консервативними замінами, як кажуть, характеризуються "схожістю послідовностей" або "схожістю". Методи здійснення такого вирівнювання добре відомі фахівцям в даній галузі техніки. Звичайно такі методи включають підрахунок консервативних замінів як часткових, а не повних порушень комплементарності, внаслідок чого підвищується процент ідентичності послідовностей. Наприклад, коли ідентичній амінокислоті присвоюється очко між 0 і 1, а неконсервативній заміні дається очко 0, консервативній заміні дається очко між 0 і 1. Очки консервативних заміні можуть бути підраховані, наприклад, при використанні програми PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, CA).

При застосуванні в даному описі термін "процент ідентичності послідовностей" може стосуватися величини, визначеної шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей вздовж вікна порівняння, де частина послідовності у вікні порівняння може включати добавки або делеції (тобто пробіли) порівняно з референсною послідовністю (яка не включає добавок або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Процент розраховується шляхом визначення кількості положень, в яких ідентичний нуклеотидний або амінокислотний залишок присутній в обох послідовностях, що дає кількість збіжних положень, ділення кількості збіжних положень на загальну кількість положень у вікні порівняння і множення результату на 100 з отриманням процента ідентичності послідовностей. Комп'ютерні програми, які можуть бути використані для визначення ідентичності і схожості між двома послідовностями, включають: пакет програм GCG (Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12(1):387); BLASTP; BLASTN; FASTA; и TFASTA (Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403).

Статистично зв'язані: При застосуванні в даному описі термін "статистично зв'язані" стосується тенденції двох подій виникати разом із частотою, більш високою, ніж частота, характерна для випадковості, де частоту, характерну для випадковості, представляють заздалегідь певним рівнем значущості. Статистична зв'язаність може бути визначена будь-яким з ряду тестів визначення значущості, добре відомих фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, ANOVA або t-критерієм. Див., наприклад, *Statistical Methods*, G.W. Snedecor and W.G. Cochran,

Iowa State University Press, Ames, Iowa (1985). Рівні значущості для альфа переважно становлять менше, ніж 0,01. Наприклад, рівні значущості для цього винаходу можуть знаходитися в діапазоні між 0 і приблизно 0,250, наприклад, менш приблизно 0,0001, 0,00050, 0,0010, 0,0050, 0,010, 0,025, 0,050, 0,100 або 0,250, включаючи будь-які рівні між ними.

Ознака або фенотип: Терміни "ознака" і "фенотип" використовуються в даному описі взаємозамінно. Для цілей даного розкриття ознаки, що становлять особливий інтерес, включають, наприклад, без обмеження: високий вміст олеїнової кислоти; низький вміст ліноленової кислоти; стійкість до імідазолінонів; стійкість до захворювання килою хрестоцвітних; і відновлення цитоплазматичної чоловічої стерильності.

III. Мутації HO/LL у генах *fad2* і *fad3*

Деякі варіанти здійснення включають мутації генів *fad2* і *fad3*, які надають фенотип HO/LL (високого вмісту олеїнової (*fad2*) і низького вмісту ліноленової (*fad3*) кислот) у рослин роду *Brassica*. У деяких варіантах здійснення винаходу використовується виділена молекула нуклеїнової кислоти, що включає послідовності нуклеїнової кислоти, які включають одну або більше цих мутацій, для надання однієї або обох ознак HO/LL рослині, в яку введена виділена молекула нуклеїнової кислоти. Такі виділені молекули нуклеїнової кислоти можуть додатково включати маркер, який тісно зчеплений із фенотипом HO і/або LL у канолі.

При клонуванні алелей *fad2* (десатурази-2 жирних кислот) і *fad3* (десатурази-3 жирних кислот) використовували сорти *B. napus* DMS100 (мутантний тип) і Quantum (дикий тип). Мутантний сорт DMS100 походить від масової селекції F₄ індивідуальної селекції рослин F₃, що походила від схрещування сестринської лінії Global X AG019. DMS100 являє собою лінію HO/LL із вмістом олеїнової кислоти приблизно 77 % і вмістом ліноленової кислоти приблизно 3 %. Quantum являє собою комерційний сорт дикого типу, який має відносно низький вміст олеїнової кислоти (~66 %) і високий вміст ліноленової кислоти (~7 %). Як детально описується в цьому документі, секвенування десатуразних ферментів *fad2* і *fad3* геномних клонів DMS100, залучених до шляху синтезу жирних кислот, виявило одиничні мутації нуклеотидів у кожному з генів. Додатковий аналіз послідовностей показав, що мутації є причиною зміненого вмісту жирних кислот у DMS100. Ці дві мутації відрізняються від раніше опублікованих мутацій (Tanhuanpaa et al. (1998) *Mol. Breeding* 4:543-50; Jourden et al. (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93:512-8).

Деякі варіанти здійснення використовуються в інтересах ідентифікації поліморфізму одиничного нуклеотиду (SNP) в гені *fad2*, який пов'язаний з конкретним вмістом олій, який може бути бажаним при деяких варіантах застосування. Вміст олеїнової кислоти (C18:1) у канолі знаходиться під впливом гена *fad2*, який кодує фермент (ендоплазматичну дельта-12-десатуразу), відповідальний за десатурацію олеїнової кислоти до лінолевої кислоти (C18:2). Конкретні варіанти здійснення включають мутацію з одиничною нуклеотидною заміною, яка вводить передчасний "стоп"-кодон у відкриту рамку читування *fad2*, приводячи до експресії укороченого продукту. У певних варіантах здійснення мутація з одиничною нуклеотидною заміною локалізована в положенні 411 гена *fad2* (дивись Фіг. 1). Наприклад, мутація може являти собою мутацію із заміною "C" на "T" в положенні 411, яка створює стоп-кодон "TAG", і приводить до продукту експресії *fad2*, який складається тільки зі 185 амінокислот у довжину. У деяких варіантах здійснення мутація з одиничною нуклеотидною заміною в гені *fad3* приводить до експресії укороченого поліпептиду, який характеризується зниженою функцією (наприклад, відсутністю функції або по суті відсутністю функції) як активної десатурази, яка десатурує олеїнову кислоту до лінолевої кислоти.

Інактивуючий мутантний алель гена *fad2* робить внесок у контроль вмісту олеїнової кислоти у канолі шляхом зниження десатурації олеїнової кислоти до лінолевої кислоти. У варіантах здійснення мутантний алель *fad2* включає нуклеотидну послідовність, яка здатна специфічно гібридизуватися з комплементарною SEQ ID NO:7 в області, що включає нуклеотид в положенні 411, як визначено при вирівнюванні SEQ ID NO:7. У конкретних варіантах здійснення мутантний алель *fad2* являє собою SEQ ID NO:7. У деяких варіантах здійснення винахід також включає ті нуклеотидні послідовності, які по суті ідентичні до мутантного алеля *fad2* SEQ ID NO:7. Наприклад, у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти являє собою гомолог *fad2* (наприклад, ортолог), який ідентичний до мутантного алеля *fad2* SEQ ID NO:7 щонайменше приблизно на 85 %. Гомолог *fad2* може бути ідентичний до мутантного алеля *fad2* SEQ ID NO:7 на 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; 99,5 % або 99,8 %. Такий гомолог *fad2* може бути легко ідентифікований і виділений з будь-яких повних або часткових геномів, легкодоступних фахівцям в даній галузі техніки для різних організмів, наприклад, *Brassica* spp.

Деякі варіанти здійснення також включають функціональні варіанти мутантного алеля *fad2* SEQ ID NO:7. Функціональні варіанти *fad2* включають, наприклад, послідовність *fad2* SEQ ID NO:7, причому послідовність включає одну або більше нуклеотидних замін, делецій або вставок, де функціональний варіант знижує десатурацію олеїнової кислоти до лінолевої кислоти в клітині *Brassica* і може бути виміряний за допомогою звичайних методів, добре відомих фахівцям в даній галузі техніки. Наприклад, здатність конкретного варіанта гена *fad2* знижувати десатурацію олеїнової кислоти до лінолевої кислоти в клітині *Brassica* може бути визначена за допомогою гомологічної рекомбінації мутанта або фрагмента в рослині, гомозиготній за функціональним алелем *Fad2*, з подальшими звичайними виділенням рослинних олій з рослини і їх характеристикою. Функціональні варіанти гена *fad2* можуть бути створені з допомогою сайт-направленого мутагенезу, індукованої мутації, або вони можуть існувати у вигляді алельних варіантів (поліморфізмів, наприклад, SNPs). Конкретні варіанти здійснення включають мутацію, яка вводить передчасний "стоп"-кодон у відкриту рамку зчитування *fad2*, приводячи до експресії укороченого і неактивного продукту.

Деякі варіанти здійснення мають переваги в ідентифікації одиничного поліморфізму нуклеотидів (SNP) в гені *fad32*, який пов'язаний з конкретним вмістом олій, який може бути бажаним при деяких варіантах застосування. Ген *fad3* кодує ендоплазматичну дельта-15-десатуразу лінолевої кислоти, ферменту, відповідального за десатурацію лінолевої кислоти (C18:2) до ліноленої кислоти (C18:3). Ген *fad32* робить внесок особливо в контроль вмісту ліноленої кислоти. Конкретні варіанти здійснення включають мутацію з одиничною нуклеотидною заміною, яка заважає коректному сплайсингу гена *fad32* і тим самим робить неповною трансляцію продукту експресії. У певних варіантах здійснення мутація з одиничною нуклеотидною заміною локалізована в першій основі 5'-сайту сплайсингу інтрону гена *fad32*. Інtron може являти собою, наприклад, третій інtron гена *fad32* *B. napus*, шостий інtron гена *fad32* *B. para* або гомологічний інtron гена *fad32* у додаткових видів рослин. Наприклад, мутація може являти собою мутацію із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* *B. napus*, що заважає коректному сплайсингу гена (див. Фіг. 3). У деяких варіантах здійснення мутація з одиничною нуклеотидною заміною, яка заважає коректному сплайсингу гена *fad32* і тим самим робить неповною трансляцію продукту експресії, може вести до неактивного ферменту і блокувати десатурацію лінолевої кислоти (C18:2) до ліноленої кислоти (C18:3), в кінцевому результаті приводячи до зниження акумуляції C18:3 в насінні канолі.

Інактивуючий мутантний алель гена *fad3* робить внесок у контроль вмісту ліноленої кислоти у канолі шляхом зниження десатурації лінолевої кислоти до ліноленої кислоти. У варіантах здійснення мутантний алель *fad3* включає нуклеотидну послідовність, яка здатна специфічно гібридуватися з комплементарною SEQ ID NO:12 в області, що включає нуклеотид в першій основі 5'-сайту сплайсингу інтрону гена *fad32*, як визначено при вирівнюванні з SEQ ID NO:12. У конкретних варіантах здійснення мутантний алель *fad3* являє собою SEQ ID NO:12. У деяких варіантах здійснення винахід також включає ті нуклеотидні послідовності, які по суті ідентичні до мутантного алеля *fad3* SEQ ID NO:12. Наприклад, у деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти являє собою гомолог *fad3* (наприклад, ортолог), який ідентичний до мутантного алеля *fad3* SEQ ID NO:12 щонайменше приблизно на 85 %. Гомолог *fad3* може бути ідентичний до мутантного алеля *fad3* SEQ ID NO:12 на 86 %; 87 %; 88 %; 89 %; 90 %; 91 %; 92 %; 93 %; 94 %; 95 %; 96 %; 97 %; 98 %; 99 %; 99,5 % або 99,8 %. Такий гомолог *fad3* може бути легко ідентифікований і виділений з будь-яких повних або часткових геномів, легкодоступних фахівцям в даній галузі техніки для різних організмів, наприклад, *Brassica* spp.

Деякі варіанти здійснення включають також функціональні варіанти мутантного алеля *fad3* SEQ ID NO:12. Функціональні варіанти *fad3* включають, наприклад, послідовність *fad3* SEQ ID NO:12, причому послідовність включає одну або більше нуклеотидних замін, делецій або вставок, де функціональний варіант знижує десатурацію лінолевої кислоти до ліноленої кислоти в клітині *Brassica*, і може бути виміряний за допомогою звичайних методів, добре відомих фахівцям в даній галузі техніки. Наприклад, здатність конкретного варіанта гена *fad3* знижувати десатурацію лінолевої кислоти до ліноленої кислоти в клітині *Brassica* може бути визначена за допомогою гомологічної рекомбінації мутанта або фрагмента в рослині, гомозиготній за функціональним алелем *Fad3*, з подальшим звичайним виділенням рослинних олій з рослини і їх характеристикою. Функціональні варіанти гена *fad3* можуть бути створені з допомогою сайт-направленого мутагенезу, індукованої мутації, або вони можуть існувати у вигляді алельних варіантів (поліморфізмів, наприклад, SNPs). Конкретні варіанти здійснення

включають мутацію, яка вводить передчасний "стоп"-кодон у відкриту рамку зчитування *fad2*, приводячи до неповної трансляції продукту експресії.

IV. Молекулярні маркери і їх застосування

Варіанти здійснення даного винаходу включають молекулярні маркери (тобто маркери нуклеїнової кислоти), які зчеплені (наприклад, зчеплені; міцно зчеплені; або гранично міцно зчеплені) з геном, що становить інтерес (наприклад, *fad2* або *fad3*). Наприклад, у деяких варіантах здійснення ген, що становить інтерес, може бути геном, який робить внесок у фенотип або ознаку у *Brassica*, вибраний з групи, яка складається з високого вмісту олеїнової кислоти, низького вмісту ліноленої кислоти, стійкості до гербіциду (наприклад, стійкості до гліфосату або стійкості до імідазолінону) і стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Конкретні варіанти здійснення включають спосіб використання таких маркерів, наприклад, для перенесення генів, що становлять інтерес (наприклад, включених у сегмент ДНК), для введення генів, що становлять інтерес, в хазяїна і для ідентифікації гена, що становить інтерес, в організмі або зразку ДНК з організму. У конкретних варіантах здійснення маркер SSR може бути використаний для перенесення сегмента ДНК, що включає ген, який робить внесок в стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, з сорту *B. napus*, стійкого до захворювання килою хрестоцвітих. Такий маркер SSR може включати послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів SEQ ID NO: 18 і 19.

У деяких варіантах здійснення маркери, прилеглі до гена, що становить інтерес, можуть бути використані для перенесення сегмента(ів) донорської батьківської ДНК, яка однозначно містить ген, що становить інтерес. У конкретних варіантах здійснення маркери в групі зчеплення N5 і N1 *B. napus* або маркери, еквівалентні таким маркерам, можуть бути використані для перенесення сегмента ДНК, що включає *fad2* з сорту DMS100 *B. napus*. У цих і додаткових варіантах здійснення маркери в групі зчеплення N14 і N4 *B. napus* або маркери, еквівалентні таким маркерам, можуть бути використані для перенесення сегмента ДНК, що включає *fad32* з сорту DMS100 *B. napus*.

У деяких варіантах здійснення використання маркерів, прилеглих до гена, що становить інтерес, для перенесення сегмента(ів) донорської батьківської ДНК, яка однозначно містить ген, що становить інтерес, може включати аналіз геномної ДНК двох батьківських рослин зондами, які здатні специфічно гібридизуватися з маркерами, зчепленими з геном, що становить інтерес; статеве схрещування двох батьківських генотипів рослин з отриманням популяції потомків і аналіз цього потомства на присутність маркерів, зчеплених з геном, що становить інтерес; зворотне схрещування потомства, яке містить маркери, зчеплені з геном, що становить інтерес, з генотипом реципієнта з отриманням першої популяції зворотного схрещування, і потім продовження програми зворотного схрещування до отримання кінцевого потомства, яке включає будь-яку бажану ознаку(и), що виявляється(ються) у батьківського генотипа, і ген, що становить інтерес. У конкретних варіантах здійснення індивідуальне потомство, що отримується при кожній стадії схрещування і зворотного схрещування, відбирають шляхом аналізу маркерів у кожному поколінні. У деяких варіантах здійснення аналіз геномної ДНК двох батьківських рослин зондами, які здатні специфічно гібридизуватися з маркерами, зчепленими з геном, що становить інтерес, показує, що одна з батьківських рослин включає менше зчеплених маркерів, з якими специфічно гібридизуються зонди, або не включає зчеплених маркерів, з якими специфічно гібридизуються зонди.

У деяких варіантах здійснення маркер, який зчеплений з геном, що становить інтерес, може бути використаний для введення гена, що становить інтерес, в рослину роду *Brassica* за допомогою генетичної трансформації. У конкретних варіантах здійснення маркер у групі зчеплення N5 або N1 або маркер, еквівалентний такому маркеру, може бути використаний для перенесення гена *fad2* в рослину роду *Brassica*. У цих і додаткових варіантах здійснення маркер в групі зчеплення N14 або N4 або маркер, еквівалентний такому маркеру, може бути використаний для перенесення гена *fad32* в рослину роду *Brassica*. У цих і інших варіантах здійснення маркер SSR може бути використаний для перенесення гена, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, у рослину роду *Brassica*. Такий маркер SSR може включати послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів SEQ ID NO: 18 і 19.

У деяких варіантах здійснення спосіб введення гена, що становить інтерес, в рослину роду *Brassica* за допомогою генетичної рекомбінації може включати аналіз геномної ДНК рослини (наприклад, сорту DMS100 *B. napus*) зондом, який здатний специфічно гібридизуватися з маркером, зчепленими з геном, що становить інтерес, для ідентифікації гена, що становить інтерес, в рослині; виділення сегмента геномної ДНК рослини, що включає ген, який становить

інтерес, наприклад, шляхом екстракції геномної ДНК і гідролізу геномної ДНК одним або більше ферментами рестрикційними ендонуклеазами; необов'язкову ампліфікацію виділеного сегмента ДНК; введення виділеного сегмента ДНК у клітину або тканину рослини-хазяїна роду *Brassica*; і аналіз ДНК рослини-хазяїна зондом, який здатний специфічно гібридизуватися з маркером, зчепленими з геном, що становить інтерес, для ідентифікації гена, що становить інтерес, в рослині-хазяїні. У конкретних варіантах здійснення виділений сегмент ДНК може бути введений в рослину-хазяїна так, що він стабільно інтегрується в геном рослини-хазяїна.

У деяких варіантах здійснення маркер, який зчеплений з геном, що становить інтерес, може бути використаний для введення гена, що становить інтерес, в організм (наприклад, в рослину), відмінний від рослини роду *Brassica*. У конкретних варіантах здійснення ген, що становить інтерес, являє собою *fad2*, а маркер являє собою маркер групи зчеплення N5 або N1 *B. napus* або є еквівалентним маркером. У конкретних варіантах здійснення ген, що становить інтерес, являє собою *fad3*, а маркер являє собою маркер групи зчеплення N14 або N4 *B. napus* або є еквівалентним маркером. У конкретних варіантах здійснення ген, що становить інтерес, являє собою ген, який робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, а маркер являє собою маркер SSR, який включає послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину, який ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів SEQ ID NO: 18 і 19, або еквівалентний маркер.

У деяких варіантах здійснення спосіб введення гена, що становить інтерес, в організм (наприклад, в рослину), відмінний від рослини роду *Brassica*, може включати аналіз геномної ДНК рослини *Brassica* (наприклад, рослини *B. napus* сорту DMS100) зондом, який здатний специфічно гібридизуватися з маркером, зчепленими з геном, що становить інтерес, для ідентифікації гена, що становить інтерес, в рослині; виділення сегмента геномної ДНК рослини, яка включає ген, що становить інтерес, наприклад, шляхом екстракції геномної ДНК і гідролізу геномної ДНК одним або більше ферментами рестрикційними ендонуклеазами; необов'язкову ампліфікацію виділеного сегмента ДНК; введення виділеного сегмента ДНК в організм, відмінний від рослини роду *Brassica*; і аналіз ДНК організму зондом, який здатний специфічно гібридизуватися з маркером, зчепленими з геном, що становить інтерес, для ідентифікації гена, що становить інтерес, в організмі. У конкретних варіантах здійснення виділений сегмент ДНК може бути введений в організм так, що він стабільно інтегрується в геном організму.

У деяких варіантах здійснення маркери, які зчеплені з геном, що становить інтерес, можуть бути використані для ідентифікації рослини, яка включає ген, що становить інтерес. У конкретних варіантах здійснення рослина може являти собою *Brassica* spp. У деяких варіантах здійснення молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, геномної ДНК або мРНК) можуть бути проекстраговані з рослини. Проекстраговані молекули нуклеїнової кислоти можуть бути потім введені в контакт із зондом, який здатний специфічно гібридизуватися з маркером, зчепленим з геном, що становить інтерес. Специфічна гібридизація зонда з проекстрагованими молекулами нуклеїнової кислоти є показником присутності гена, що становить інтерес, в рослині.

Загальна інформація відносно молекулярних маркерів і способів їх застосування може бути знайдена, наприклад, в Andrew H. Paterson, "The DNA Revolution" (Chapter 2) in: *Genome Mapping in Plants*, Ed. Andrew H. Paterson, 1996, Academic Press/R. G. Landis Company, Austin, Tex., pp. 7-21.

V. Молекулярні маркери генів *fad2* і *fad3*

Пропонуються молекулярні маркери, які зчеплені (наприклад, міцно зчеплені) з кожним із мутантних алелей *fad2* і *fad3* в *Brassica* spp. Ідентифіковані сегменти ДНК, які містять послідовності, залучені до ознаки HO (*fad2*) і ознаки LL (*fad3*). Ці сегменти локалізовані навколо і між маркерами, які зчеплені (наприклад, міцно зчеплені) з мутантними алелями в геномній групі зчеплення. Таким чином, пропонуються також молекули нуклеїнової кислоти, які включають мутантний ген *fad2* або *fad3*, які мають інактивуючу мутацію. У цьому документі описуються ідентифіковані сегменти і їх маркери, зокрема за їх положенням в групах зчеплення геному *B. napus*. Наприклад, *fad2* і зчеплені з ним молекулярні маркери можуть бути локалізовані в групах зчеплення N5 і N1. Також, у вигляді прикладів, *fad3* і зчеплені з ним молекулярні маркери можуть бути локалізовані в групах зчеплення N14 і N4.

Положення ідентифікованих сегментів і їх маркерів може бути виражене як частота рекомбінації або одиниці картування. Варіанти здійснення, описані в цьому документі, використали в популяції *B. napus*, DMS100 x Quantum. Однак положення конкретних сегментів і маркерів у вигляді одиниць картування може бути виражено з посиланням на послідовність інбредного геному *Brassica*. Очікується, що номери, дані конкретним сегментам і маркерам у вигляді одиниць картування, можуть варіюватися від сорту до сорту культурної рослини і не є

частиною значущого визначення сегментів ДНК і маркерів, ці сегменти ДНК і маркери описуються іншим чином, наприклад, за допомогою нуклеотидної послідовності.

Конкретні приклади інактивуючих мутацій одиничних нуклеотидів у генах *fad2* і *fad3*, присутні в зародковій плазмі лінії каноли DMS100, є чинниками, які відповідають за підвищений вміст олеїнової кислоти (НО) і знижений вміст ліноленової (LL) кислоти, що спостерігається в цій лінії. Використовуючи молекулярні маркери, зчеплені з кожною або з обома цими мутаціями, можна застосовувати інтрогресію з використанням маркерів для введення в лінії каноли і в їх потомство або похідні ознак НО/LL DMS100, і/або мутантних генів *fad2* і *fad3* DMS100 в їх потомство або похідні (SEQ ID NO:7 (див. Фіг. 1) і SEQ ID NO:12 (дивись Фіг. 3) відповідно).

Методи використання молекулярних маркерів нуклеїнової кислоти, які зчеплені з мутантним алелем *fad2* або *fad3* або які знаходяться в ньому, для введення ознак НО/LL в нові рослини і зародкові плазми, а також для ідентифікації рослин з ознаками НО/LL можуть привести для селекціонера рослин до зниження вартості, тому що такі методи можуть знизити або виключити необхідність фенотипування потомків схрещувань із планованим введенням ознак НО/LL.

У варіантах здійснення маркер, який гранично міцно зчеплений з ознакою НО, являє собою нуклеотид "Т" в положенні 411 гена *fad2* *B. napus* (або в такому ж положенні вирівняної послідовності, наприклад, з *Brassica* spp.), як описано на Фіг. 1 і представлено в SEQ ID NO:7. У варіантах здійснення маркер, який гранично міцно зчеплений з ознакою LL, являє собою нуклеотид "А" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* в рослині *B. napus* (або в такому ж положенні вирівняної послідовності, наприклад, з *Brassica* spp.), як описано на Фіг. 3 і представлено в SEQ ID NO:12. Додаткові маркери можуть бути ідентифіковані як еквіваленти будь-якого з цих ілюстративних маркерів, наприклад, шляхом визначення частоти рекомбінацій між додатковим маркером і ілюстративним маркером. Такі визначення можуть використовуватися як поліпшений метод ортогональних контрастів, заснований на методі Mather (1931), *The Measurement of Linkage in Heredity*, Methuen & Co., London, з подальшим тестуванням максимуму імовірності для визначення частоти рекомбінації. Allard (1956) *Hilgardia* 24:235-78. Якщо число частоти рекомбінації менше або дорівнює 0,10 (тобто 10 %) у будь-якого культурного сорту, то додатковий маркер розглядається як еквівалентний конкретному референсному маркеру для цілей використання в методах, розкритих в даному описі.

Маркери, які гранично міцно зчеплені з ознакою високого вмісту олеїнової кислоти (НО), включають маркери як інструменти введення фенотипу НО в рослину роду *Brassica*. Інструменти введення фенотипу НО в рослину роду *Brassica* можуть включати послідовність нуклеїнової кислоти з рослини, причому визначення цієї нуклеїнової кислоти дає щонайменше чітку вказівку на те, що рослина включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає мутантний алель *fad2*, який робить внесок в ознаку НО. Прикладом інструмента введення фенотипу НО в рослину роду *Brassica* є нуклеотид "Т" в положенні 411 гена *fad2* *B. napus*, як показано на Фіг. 1 і представлено в SEQ ID NO:7. Маркери, які гранично міцно зчеплені з ознакою низького вмісту ліноленової кислоти (LL), включають маркери як інструменти введення фенотипу LL в рослину роду *Brassica*. Інструменти введення фенотипу LL в рослину роду *Brassica* можуть включати послідовність нуклеїнової кислоти з рослини, причому визначення цієї нуклеїнової кислоти дає щонайменше чітку вказівку на те, що рослина включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає мутантний алель *fad32*, який робить внесок в ознаку LL. Прикладом інструмента введення фенотипу LL в рослину роду *Brassica* є нуклеотид "А" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32* *B. napus*, як показано на Фіг. 3 і представлено в SEQ ID NO:12.

Відносно маркерів, які гранично міцно зчеплені з ознакою високого вмісту олеїнової кислоти (НО), вони є інструментами ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип НО рослини роду *Brassica*. Такі інструменти включають молекулу, яка дає сигнал, що піддається визначенню, при додаванні до зразка, отриманого з рослини, яка несе ген, що робить внесок в фенотип НО рослини роду *Brassica*. Сигналом, що піддається визначенню, є специфічна гібридизація нуклеїнових кислот, і зонд нуклеїнової кислоти, який специфічно гібридується з геном, що робить внесок у фенотип НО, може, отже, бути інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип НО рослини роду *Brassica*. У деяких прикладах інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип НО рослини роду *Brassica*, є зонд, який специфічно гібридується з сегментом гена *fad2* *B. napus*, що включає мутацію із заміною "С" на "Т" в положенні 411, але не гібридується з тим же самим сегментом гена *fad2* *B. napus* дикого типу (наприклад, SEQ ID NO:5).

Відносно маркерів, які гранично міцно зчеплені з ознакою низького вмісту ліноленової кислоти (LL), вони є інструментами ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у

фенотип LL рослини роду Brassica. Такі інструменти включають молекулу, яка дає сигнал, що піддається визначенню, при додаванні до зразка, отриманого з рослини, яка несе ген, що робить внесок в фенотип LL рослини роду Brassica. Сигналом, що піддається визначенню, є специфічна гібридизація нуклеїнових кислот, і зонд нуклеїнової кислоти, який специфічно гібридується з геном, що робить внесок в фенотип LL, може, отже, бути інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок в фенотип LL рослини роду Brassica. У деяких прикладах інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у фенотип LL рослини роду Brassica, є зонд, який специфічно гібридується з сегментом гена *fad32 B. napus*, що включає мутацію із заміною "G" на "A" в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону, але не гібридується з тим же самим сегментом гена *fad32 B. napus* дикого типу (наприклад, SEQ ID NO:15).

VI. Маркери стійкості до захворювання килою хрестоцвітих

Пропонуються молекулярні маркери, які зчеплені (наприклад, міцно зчеплені) зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у Brassica. Сегменти ДНК, що містять гени, залучені до стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, зв'язані з цими маркерами. Таким чином, молекули нуклеїнової кислоти, що включають ген, який залучений до стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, дають можливість використання і маніпуляцій з використанням пропонованих маркерів. Ідентифіковані маркери і зв'язані з ними послідовності можуть бути описані частково за їх положенням в групах зчеплення в геномі *B. napus*. У деяких прикладах маркер, який зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у Brassica, являє собою маркер SSR.

Описані в цьому документі варіанти здійснення виконувалися на популяції *B. napus*, отриманій шляхом схрещування сорту Mendel, стійкого до захворювання килою хрестоцвітих, з інбредним HO/LL *B. napus*, що містить ген-відновник фертильності (*rest*) і стійкість до гліфосату (*gly*). Положення ідентифікованих маркерів і зчеплених з ними послідовностей ДНК (наприклад, генів) може бути виражене як частота рекомбінації або одиниці картування. Положення конкретних послідовностей і маркерів у вигляді одиниць картування можуть бути виражені із посиланням на послідовність інбредного геному Brassica. Очікується, що номери, дані конкретним послідовностям і маркерам у вигляді одиниць картування, можуть варіюватися від сорту до сорту культурної рослини і не є частиною значущого визначення яких-небудь послідовностей ДНК або маркерів, ці послідовності ДНК і маркери можуть описуватися іншим чином, наприклад, за допомогою нуклеотидної послідовності.

Маркери, присутні в зародковій плазмі лінії Mendel каноли, можуть бути зчеплені з чинником(ами), які відповідають за стійкість до захворювання килою хрестоцвітих, яка спостерігається у цієї вихідної лінії. Наприклад, при використанні цих маркерів або їх еквівалентів може бути застосована інтрогресія з використанням маркерів для введення в лінії каноли і в їх потомки і похідна стійкість до захворювання килою хрестоцвітих від Mendel.

Маркер, який зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у Brassica, може бути інтегрований в програму селекції з використанням маркерів для створення нових генотипів і зародкової плазми, стійких до захворювання килою хрестоцвітих. Така програма дозволяє здійснити скринінг тисяч потомків Brassica, які походять, наприклад, від схрещування інбредних сортів Brassica, що мають одну або більше бажаних ознак, і Mendel (або його потомства або похідних). Такий маркер дозволяє також порівняно швидко і недорого ідентифікувати лінії зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у процесі біологічного скринінгу стійкості до захворювання килою хрестоцвітих перед використанням ресурсів, таких, як теплиці, поля і т. д. В цей час скринінг стійкості до захворювання звичайно здійснюється в обмежених тепличних рядах всередині приміщень, що приводить до істотних витрат.

У варіантах здійснення маркер, який зчеплений з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, являє собою маркер SSR, що включає послідовний сегмент геномної ДНК *B. napus*, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів з SEQ ID NO: 18 і 19, причому маркер зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у рослини *B. napus*. Фахівцям в даній галузі техніки зрозуміло, що еквівалентні маркери в тому ж самому локусі можуть бути визначені шляхом зміни довжини або положення праймерів, які використовуються для зміни довжини послідовного сегмента геномної ДНК *B. napus*, який ампліфікується з допомогою праймерів.

Як еквівалент цьому ілюстративному маркеру можуть бути ідентифіковані додаткові маркери, наприклад, шляхом визначення частоти рекомбінацій між додатковим маркером і ілюстративним маркером SSR. При таких визначеннях можна використати поліпшений метод ортогональних контрастів, заснований на методі Mather (1931), The Measurement of Linkage in Heredity, Methuen & Co., London, з подальшим тестуванням максимуму імовірності для

визначення частоти рекомбінації. Allard (1956) *Hilgardia* 24:235-78. Якщо число частоти рекомбінації менше або дорівнює 0,10 (тобто 10 %) у будь-якого культурного сорту, то додатковий маркер розглядається як еквівалентний конкретному референсному маркеру для цілей використання в методах, розкритих в даному описі.

Маркери, які зчеплені зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, включають інструменти введення стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в рослину роду *Brassica*. Інструменти введення стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в рослину роду *Brassica* можуть включати послідовність нуклеїнової кислоти з рослини, причому визначення цієї нуклеїнової кислоти дає щонайменше чітку вказівку на те, що рослина включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка включає послідовність ДНК, яка робить внесок у фенотип стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Прикладом інструмента введення стійкості до захворювання килою хрестоцвітих в рослину роду *Brassica* є послідовний сегмент геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів з SEQ ID NO: 18 і 19, причому маркер зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у рослини *B. napus*.

Відносно маркерів, які зчеплені зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, вони є інструментами ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у рослини роду *Brassica*. Такі інструменти включають молекулу, яка дає сигнал, що піддається визначенню, при додаванні до зразка, отриманого з рослини, яка несе ген, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у рослини роду *Brassica*. Сигналом, що піддається визначенню, є специфічна гібридизація нуклеїнових кислот, і зонд нуклеїнової кислоти, який специфічно гібридується з послідовністю ДНК, що робить внесок у фенотип стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, може, отже, бути інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок в стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у рослини роду *Brassica*. У деяких прикладах інструментом ідентифікації рослини, яка несе ген, що робить внесок у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у рослини роду *Brassica*, є зонд, який специфічно гібридується з послідовним сегментом геномної ДНК, який становить 300 п. о. в довжину і ампліфікується з допомогою ілюстративних праймерів з SEQ ID NO: 18 і 19, але не гібридується з будь-яким сегментом, ампліфікованим тими ж самими праймерами з геномної ДНК дикого типу.

У доповнення до представленого вище праймери, представлені як SEQ ID NO: 18-22, або їх еквіваленти, можуть бути використані у варіантах здійснення для скринінгу присутності гена, залученого до стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Коли ці праймери або їх еквіваленти використовуються для ампліфікації послідовностей ДНК зі зразка геномної ДНК *Brassica*, в які проводилося втручання, ампліфіковані фрагменти ДНК можуть бути візуалізовані (наприклад, з допомогою гель-електрофорезу). Присутність фрагмента 300 п. о. (або фрагмента очікуваного розміру для використання праймерів, функціонально еквівалентних SEQ ID NO: 18-22), вказує на те, що рослина, з якої був отриманий зразок геномної ДНК, включає ген, залучений до стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

VII. Рослини *Brassica* HO/LL, стійкі до гербіцидів і захворювання килою хрестоцвітих

У деяких варіантах здійснення винаходу пропонується або іншим чином включається у винахід рослина *Brassica* (наприклад, рослина *B. napus*), яка має високий вміст олеїнової кислоти і/або низький вміст ліноленої кислоти (HO/LL) порівняно з рослиною *Brassica* дикого типу того ж виду (наприклад, сортом Quantum *B. napus*). У цих і додаткових варіантах здійснення рослина *Brassica* може включати ознаку стійкості до імідазолінонових гербіцидів. У цих і додаткових варіантах здійснення рослина *Brassica* може включати ознаку стійкості до захворювання килою хрестоцвітих. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу пропонується або іншим чином включається у винахід рослина *Brassica*, яка включає всі ознаки високого вмісту олеїнової кислоти, низького вмісту ліноленої кислоти, стійкості до імідазолінонів і стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

Таким чином, рослина *Brassica*, яка стійка до захворювання килою хрестоцвітих, може включати маркер, зчеплений із фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, а також включає маркер, зчеплений з ознакою HO. У цих і інших варіантах здійснення рослина *Brassica* може також включати генетичний маркер, зчеплений з ознакою LL. Наприклад, рослина *Brassica*, стійка до кили хрестоцвітих, може також включати одну або більше послідовностей нуклеїнової кислоти, які відповідають мутантним генам *fad2* і/або *fad3*. Ці гени можуть бути введені в канолу або інші олійні насінні рослини за допомогою будь-якого з ряду методів, відомих в даній галузі техніки. Крім того, гени *fad2* і/або *fad3* можуть бути змінені за допомогою відомих методів *in vivo* або *in vitro* для отримання ілюстративних мутантних генів *fad2* і/або *fad3* або їх еквівалентів. Приклади таких генів, маркерів і мутацій можуть бути знайдені без

обмеження в цій розкритій патентній публікації США 2006/0248611 (повний зміст якої включений в даній опис як посилання).

У конкретних варіантах здійснення насіння рослини Brassica може включати сприятливий профіль олії. Наприклад, насіння може включати щонайменше 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 % або 77 % олеїнової кислоти (C18:1). У цих і інших прикладах насіння рослини Brassica може включати не більше 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % або 1,5 % ліноленової кислоти (C18:3).

У варіантах здійснення винаходу рослини *B. napus*, стійкі до кили хрестоцвітих, можуть бути також стійкі або толерантні до імідазолінону.

У деяких варіантах здійснення рослина Brassica, стійка до захворювання килою хрестоцвітих, може також включати систему відновлення цитоплазматичної чоловічої стерильності. Цитоплазматична чоловіча стерильність (CMS) є широко поширеною і класичною ознакою розщеплення не по Менделю. Рослини CMS не здатні до самоопилення. Отже, коли лінія CMS висаджується поблизу з лінією з чоловічою фертильністю, все насіння, яке утвориться у стерильних рослин, буде являти собою гібриди двох батьків. На відміну від більшості ознак CMS передається по материнській лінії (тобто вона переходить до потомства тільки через батьківське насіння). Ця властивість є наслідком того факту, що ген або гени, які визначають CMS, локалізовані в мітохондріальній ДНК (mtDNA). На відміну від більшості генів, які знаходяться в ядерній ДНК, гени в mtDNA передаються у більшості видів рослин виключно через жіночого батька. Внаслідок наявності цієї властивості передачі по материнській лінії виникає можливість легкого розмноження жіночих ліній CMS за допомогою запилення чоловічою фертильною "підтримувальною" лінією, яка ідентична до лінії CMS відносно її ядерних генів, але яка є чоловічою фертильною через відсутність mtDNA, що викликає CMS. Однак внаслідок передачі CMS через жіночого батька гібридні рослини, отримані з використанням жіночих ліній CMS, також характеризуються чоловічою стерильністю; вони несуть mtDNA, що надає чоловічу стерильність. Це проблематично для насінневих рослин (наприклад, маїсу і каноли), для яких потрібна продукція пилку для утворення насіння як продукту, що збирається.

На щастя, у багатьох видів культур ідентифіковані специфічні домінуючі ядерні гени, позначені як відновники фертильності (Rf), які можуть пригнічувати фенотип чоловічої стерильності і "відновлювати" фертильність у гібридів F₁. Таким чином, компоненти системи CMS включають: (1) лінію CMS (яка містить цитоплазму з чоловічою стерильністю (S) або (mtDNA) і є гомозиготною для рецесивного або підтримувального алеля гена-відновника); (2) підтримувальну лінію (яка містить фертильну або нормальну mtDNA (F), але ізогенна лінії CMS в ядерних генетичних локусах), і (3) лінію відновника (яка звичайно містить mtDNA чоловічої стерильності, але є гомозиготною для домінуючого ядерного гена Rf). Використання цих компонентів у схемі отримання гібридного насіння проілюстровано на Фіг. 6. Системи чоловічої стерильності і відновники, придатні для даного винаходу, включають, але не обмежуються цим: rolіma-систему; систему Ogura; систему, описану в патенті США 6365798; і систему, описану в патентній публікації США № 2004/0237141 (повний зміст кожної з яких включений в даній опис як посилання).

Всі публікації, патенти і патентні заявки, цитовані в даному описі, включені таким чином як посилання. Якщо в даному описі не вказано інакше, для цілей даного винаходу можуть бути використані стандартні методи очищення ДНК, гідролізу ферментами рестрикції, аналізу на агарозному гелі, виділення фрагментів ДНК, лігування і трансформації. Такі методи описані, наприклад, в керівництвах Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; и Ausubel et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York (обидва включені в даний опис як посилання).

Подальші приклади пропонуються для ілюстрації певних конкретних особливостей і/або варіантів здійснення. Приклади не повинні тлумачитися як такі, що обмежують розкриття тих конкретних особливостей або варіантів здійснення, які вони ілюструють. Передбачається, що фахівці в даній галузі техніки можуть розрізнити і на практиці здійснити варіації або альтернативні варіанти конкретних вказівок, що пропонуються в даному описі, не виходячи за об'єм даного винаходу.

Приклади

Приклад 1: Матеріали і методи

Рослинний матеріал

Сорти каноли DMS100 (мутантний тип) і Quantum (дикий тип) в цьому дослідженні використовували для клонування алелів *fad2* (десатурази-2 жирних кислот) і *fad3* (десатурази-3 жирних кислот). DMS100 являє собою лінію HO/LL (високий вміст олеїнової і низький вміст

ліноленової кислот) із вмістом олеїнової кислоти приблизно 77 % і вмістом ліноленової кислоти приблизно 3 %. DMS100 походить від масової селекції F₄ індивідуальної селекції рослин F₃, що походить від схрещування сестринської лінії Global X AG019. Quantum являє собою комерційний сорт і має низький вміст олеїнової кислоти (~66 %) і високий вміст ліноленової кислоти (~7 %).

Популяція подвійних гаплоїдів (DH) створена за допомогою культури мікроспор із рослин F₁ від схрещування між лінією канолі Quantum і DMS100. Популяція DH включала 604 лінії. Повний аналіз жирних кислот насіння ліній DH і їх батьків був здійснений з використанням газової хроматографії. З 604 ліній DH 183 лінії були вибрані випадковим чином для аналізу маркерів і картування.

Екстракція і кількісна оцінка геномної ДНК

ДНК обох батьківських ліній і 183 ліній DH екстрагували з листя двотижневих рослин, вирощених у теплиці, з використанням набору для тестування рослин Qiagen DNeasy™ 96. Подробиці методів екстракції ДНК описані в керівництві набору для тестування рослин DNeasy™ 96. Цей набір дозволяє екстрагувати ДНК в 96-ямковому форматі для високої продуктивності екстракції.

Для кількісної оцінки ДНК барвник PicoGreen™ розводили в 200 раз в 1X TE буфері. У кожному ямку планшета для мікротитрування додавали 100 мкл розведеного розчину барвника PicoGreen™ і потім додавали 5 мкл кожного зразка ДНК або стандарту ДНК (5 мкг/мл, 10 мкг/мл і 20 мкг/мл). Потім планшет короткочасно перемішували на шейкері для планшетів і показники зчитували на мікропланшетному флуориметрі Spectra Max GEMINIS™ XS від Molecular Devices.

ПЛР-ампліфікація

Реакційні суміші для ПЛР-ампліфікації містили від 20 до 30 нг геномної ДНК, 0,25 мкМ 10-членного праймера, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ кожного dNTP, 1 ПЛР буфер і 0,6 одиниць ДНК-полімерази Taq. Реакції ампліфікації здійснювали в системі GeneAmp PCR System 9700, запрограмованій на 35 циклів по 45 секунд при 94°C, 30 секунд при від 55°C до 60°C, 1 хвилині при 72°C і закінчення протягом 7 хвилин при 72°C.

Продукти ПЛР-ампліфікації, що становлять інтерес, розділяли електрофорезом в агарозному гелі, і смуги, що становлять інтерес, вирізали з гелю. Вирізані смуги вміщували в мікроцентрифугальну пробірку, яка містить стерильну воду, і нагрівали протягом 5 хвилин у киплячій воді. Розчинену ДНК ампліфікували шляхом ПЛР із відповідними парами праймерів. Ампліфіковані продукти лігували з клонуючим вектором PCR2.1-ТОРО з використанням ТА-клонуючого набору (Invitrogen Corp., San Diego, CA) відповідно до інструкцій виробника. Продукти лігування потім трансформували в компетентні клітини і вміщували на плашки LB-агару, що містять ампіцилін або канаміцин, X-GAL і IPTG для можливості біло-блакитної селекції. Білі колонії в плашках трансформантів збирали, і ідентифікацію клонованих продуктів ПЛР верифікували ферментом рестрикції EcoRI, що виявило фрагмент ДНК вектора і вставлений фрагмент очікуваного розміру. Позитивні клони, що містять вставку, секвенували з допомогою Sequetech Corporation (Mountain View, CA).

Аналізи секвенування і даних

Послідовності аналізували і вирівнювали з використанням комп'ютерної програми аналізу послідовностей на базі інтернету SeqWeb™ (версія 2) пакету комп'ютерних програм GCG (Wisconsin University). Зчепленість зв'язків між маркерами і ознаками високого вмісту олеїнової кислоти або низького вмісту ліноленової кислоти (HO/LL) визначали за допомогою t-критерію. Карту генетичних зчеплень створювали з використанням комп'ютерної програми JoinMap™ V2.0 з використанням мінімального LOD, що становить 3,0. Дистанції карти перетворювали в сантиМоргани, використовуючи функцію Kosambi. Передбачувані області QTL, пов'язані з C18:1 і C18:3, локалізували з допомогою картування інтервалів із використанням комп'ютерної програми MapQTL V 3.0. Кількісний показник LOD 3,0 використовували для ідентифікації областей, які потенційно впливають на ознаки HO і LL.

Тестування впровадження

Набори для тестування впровадження, специфічні для мутацій генів fad2 і fad3, були розроблені з допомогою Third Wave Technologies (Madison, WI). Концентрацію ДНК зразків для тестування впровадження нормалізували до 15 нг/мкл із використанням QiaGen Bio-Robot 3000 (Valencia, CA). Тестування впровадження здійснювали в 96-ямкових планшетах за інструкцією виробника. Коротко, зразки ДНК денатурували при 95°C протягом десяти хвилин. Сім мкл денатурованої ДНК (15 нг/мкл) і 8 мкл реакційної суміші (3 мкл суміші олігонуклеотидів і 5 мкл 24 мМ MgCl₂) додавали в кожен ямок 96-ямкових планшетів для тестування впровадження. Потім кожен реакцію зупиняли 15 мкл мінерального масла, і планшети інкубували в BioOven III від St. John Associates, Inc. (Belts ille, Maryland) при 63°C протягом чотирьох годин. Планшети з матеріалом, який прореагував, зчитували з використанням мікропланшетного флуориметра

Spectra Max GEMINIS™ XS від Molecular Devices для флуоресцентних сигналів. Для розрахунку відношення процент сигналу відносно фону для мутантного алеля ділили на процент сигналу для алеля дикого типу для кожного зразка. Генотипи зразків визначали, засновуючись на розрахованому відношенні.

5 Приклад 2: Клонування алелей *fad2* і *fad3*

Фрагменти геномної ДНК гена *fad2* батьківських ліній *B. napus* DMS100 (мутантної) і Quantum (дикого типу) ампліфікували з використанням праймерів, гомологічних до послідовностей генів *fad2* *Arabidopsis* або *B. rapa*. Tanhuanpaa et al. (1998), вище. Фіг. 1. Фрагменти *fad2*, ампліфіковані з кожного з батьків праймерами FAD2-2F і FAD2-6R, клонували і секвенували. Ця пара праймерів ампліфікувала фрагмент *fad2* тієї ж самої довжини (986 п. о.) від кожного з двох батьків. Послідовності цих двох праймерів являють собою:

FAD2-2F: CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACC (SEQ ID NO:1)

FAD2-6R: CCTTTCTTGTACCTTCCCTGTCC (SEQ ID NO:2)

Між двома батьківськими лініями була ідентифікована мутація із заміною одного нуклеотиду в положенні 411 гена *fad2*. Ген *fad2* Quantum дикого типу містить нуклеотид "C" в положенні 411. Однак ген *fad2* HO/LL DMS100 містить SNP в тому ж положенні, де нуклеотид замінений на "T". Присутність в цьому положенні "T" вводить стоп-кодон і приводить до істотно укороченого продукту експресії *fad2*, який містить тільки 185 амінокислот у довжину. Фіг. 2.

Послідовності ДНК локусів *fad31* і *fad32* ендоплазматичної дельта-15-десатурази лінолевої кислоти *B. napus* були знайдені і витягнуті з GenBank (номери надходження AF056569 (*fad31*) і AF066570 (*fad32*)). Три пари праймерів для кожного локусу *fad31* і локусу *fad32* були створені з послідовностей генів *fad31* і *fad32* з використанням комп'ютерної програми створення праймерів Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Клонували фрагменти *fad31*, ампліфіковані парою праймерів BNFD31-CF (GAGGCTTGGACGACCACTTG) (SEQ ID NO:3) і BNFD31-CR (GACTGGACCAACGAGGAATG) (SEQ ID NO:4), і фрагменти *fad32*, ампліфіковані парою праймерів BNFD32-CF (CAAGAATTTGTCCACAGTACAC) (SEQ ID NO:16) і BNFD32-CR (CAACTGTTGTTAATCCTCCACG) (SEQ ID NO:17), з кожного з батьків. Секвенували сім клонів DMS100 і шість клонів Quantum *fad31* і шість клонів DMS100 і шість клонів Quantum *fad32*.

Аналіз послідовностей і вирівнювання виявили відсутність відмінностей між клонами DMS100 і Quantum відносно *fad31* (дані не показані). Однак вирівнювання послідовностей виявило мутацію в одиничному нуклеотиді (заміна "G" на "A") в першій основі 5'-сайту сплайсингу третього інтрону гена *fad32*. Фіг. 3. Цей інтрон відповідає інтрону 6 гена *fad3* в *B. rapa* (Tanhuanpaa (2000) Mapping and cloning of *Fad3* gene in *Brassica rapa* subsp. *Oleifera*. Пряме надання GenBank. Надходження в GenBank NO. AF308975, AF308976, AF308977 и AF308978) і *Arabidopsis* (Nishiuchi et al. (1994) Plant Physiol. 105:767-8). Гени *fad3* *B. rapa* і *Arabidopsis* містять вісім екзонів і сім інтронів, тоді як послідовність *B. napus*, досліджена в даному описі, охоплює екзони 4 (частково), 5, 6 і 7 (частково) і інтрони 4, 5 і 6. Це представлення екзонів/інтронів у гені *fad3* підтримується тим фактом, що послідовність гена *fad3* високо консервативна серед секвенованих видів *Brassica* і *Arabidopsis*.

Інтрони рослин містять високо консервативні 5'-сайти сплайсингу (з'єднання екзону/інтрону AG/GTAAG) і 3'-сайти сплайсингу (з'єднання екзону/інтрону TGCAG/G). Серед більше 1000 досліджених інтронів *Arabidopsis* перші два нуклеотиди в 5'-сайті сплайсингу послідовності з'єднання інтрону, +1G і +2T, консервативні на 100 % і 99 % відповідно. Lorkovic et al. (2000) Trends Plant Set. 5(4): 160-7; і Brown (1996) Plant Mol. Biol. 32(3):531-5. Правильність сплайсингу залежить від механізмів пізнавання сигналу інтрону і коректного вибору 5'- і 3'-сайтів сплайсингу. Мутація із заміною +1G на +1A в 5'-сайті сплайсингу (положення 530), ідентифікована в даному описі (див. Фіг. 3), може відмінити сплайсинг або привести до пропуску екзону; тобто впливає на екзон (екзон 6), і обидва прилеглі інтрони можуть бути видалені при одиничній події сплайсингу. Lorkovic et al. (2000), вище; і Simpson et al. (1998) Plant J. 15(1): 125-31. Такий пропуск екзону може привести до синтезу поліпептиду з пропуском амінокислот, що кодуються екзоном 6 гена *fad3*. Ця мутація може також блокувати сплайсинг в нормальному 5'-сайті сплайсингу і активувати приховані сайти сплайсингу в різних положеннях, що може привести до прихованого сплайсингу підданого до впливу екзону спільно з інтроном, який лежить нижче. McCullough et al. (1993) Mol. Cell. Biol. 13(3):1323-31. Такий прихований сплайсинг може привести до ранньої термінації трансляції і синтезу більш короткого поліпептиду дельта-15-десатурази лінолеату з гена *fad3*, тому що інтрон містить стоп-кодони у всіх трьох можливих рамках зчитування і, отже, екзони 7 і 8 залишаються нетрансльованими. Неповна трансляція *fad3* може приводити до інактивації ферменту і блокування десатурації лінолевої кислоти (C18:2) до ліноленової кислоти (C18:3), приводячи до зниження акумуляції C18:3 у насінні каноли.

Ці дані істотно підтримують припущення про те, що мутації одиничних нуклеотидів, ідентифіковані в генах *fad2* і *fad3*, є факторами, які відповідають за збільшення вмісту олеїнової кислоти і зниження вмісту ліноленої кислоти в лінії каноли DMS100. Як показано на Фіг. 1 і 3, відповідно, специфічні для мутантів праймери FAD2GM (CGCACCGTGATGTTAACGGTTT) (SEQ ID NO:5) і FAD3cGM (ATAAATAATGTTGATCTACTTAT) (SEQ ID NO:15), створені з метою визначення мутантних алелей HO/LL *fad2* і *fad32* з використанням ПЛР ампліфікації. При використанні молекулярних маркерів, зчеплених з кожною або обома двома мутаціями, описаними вище, може бути застосована інтрогресія з використанням маркерів для введення ознак HO/LL в лінії каноли DMS100 і їх потомство або похідні, і/або мутантних генів *fad2* (SEQ ID NO:7) і *fad3* (SEQ ID NO:12) DMS100 в їх потомство або похідні. Фіг. 1 і 3.

Приклад 3: Мутантні специфічні для алеля SNP маркери генів *fad2* і *fad3*

Мутації одиничного нуклеотиду, присутні в генах *fad2* і *fad3*, використовували як маркери SNP для введення мітки в гени *fad2* і *fad3* для селекції на високий вміст C18:1 і низький вміст C18:3 при схрещуванні каноли. Створювали специфічні для мутантів праймери (FAD2GM: CGCACCGTGATGGTTAACGGTTT (SEQ ID NO:5); і FAD3cGM: ATAAATAATGTTGATCTACTTAT (SEQ ID NO:15)), для того, щоб визначити мутантні алелі *fad2* і *fad32* із використанням ПЛР ампліфікації. Праймери створювали так, щоб мутантна основа (SNP) була на 3'-кінці одного з праймерів для специфічної для алеля ПЛР ампліфікації. Фіг. 1 і 3.

Праймери, специфічні для *fad2*, ампліфікувалися поліморфною смугою, яка була присутньою в DMS100 і об'ємах ДНК при високому вмісті олеїнової кислоти (C18:1), але була відсутньою в Quantum і об'ємах ДНК при низькому вмісті олеїнової кислоти. Фіг. 4. Цей специфічний для гена маркер був протестований в популяції DH, що походить від схрещування Quantum і DMS100, де було знайдено, що розподіл алеля високо корелював із високим вмістом C18:1. Фіг. 4; таблиця 1. Специфічні для алеля *fad3* праймери також ампліфікувалися як поліморфний фрагмент, який був присутній в DMS100, але був відсутній в Quantum. Аналіз популяції DH показав, що цей специфічний для гена маркер був статистично пов'язаний з низьким вмістом C18:3. Фіг. 4; таблиця 1. Таким чином, успішно створені специфічні для гена маркери на основі ПЛР, які є безпосередніми мітками генетичних мутацій. Цей зміст даного розкриття, варіанти або похідні маркерів, розкритих в даному описі (включаючи маркери різного типу), засновані, наприклад, на високій значній гомології істотної кількості пар основ, повинен бути з легкістю зрозумілий фахівцям у даній галузі техніки.

Таблица 1

| Генотип | Сумарно рослин* | Кількість рослин, які належать до кожної категорії | | | | ID (%) | CR CALL |
|---------|-----------------|--|---|----|----|--------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| DAS 34 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 35 | 35 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 36 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 37 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 38 | 36 | 2 | 0 | 0 | 34 | 94,4 | S |
| DAS 39 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 40 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 41 | 36 | 1 | 1 | 3 | 31 | 92,6 | S |
| DAS 42 | 36 | 1 | 0 | 1 | 34 | 96,3 | S |
| DAS 43 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 44 | 36 | 6 | 6 | 7 | 17 | 65,7 | M |
| DAS 45 | 34 | 33 | 1 | 0 | 0 | 1 | M |
| DAS 46 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 47 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 48 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 49 | 36 | 0 | 3 | 16 | 17 | 79,6 | M |
| DAS 50 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 51 | 36 | 31 | 1 | 4 | 0 | 8,3 | M |
| DAS 52 | 36 | 18 | 8 | 6 | 4 | 29,6 | M |
| DAS 53 | 36 | 1 | 1 | 6 | 28 | 89,8 | M |
| DAS 54 | 36 | 0 | 0 | 0 | 36 | 100 | S |
| DAS 55 | 36 | 2 | 0 | 0 | 34 | 94,4 | S |

Таблиця 1

| Генотип | Сумарно рослин* | Кількість рослин, які належать до кожної категорії | | | | ID (%) | CR CALL |
|---------|-----------------|--|----|----|----|--------|---------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| DAS 56 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 57 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 58 | 36 | 3 | 3 | 12 | 18 | 75 | M |
| DAS 59 | 36 | 3 | 2 | 2 | 29 | 86,1 | M |
| DAS 60 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 61 | 36 | 3 | 4 | 10 | 19 | 75 | M |
| DAS 62 | 30 | 18 | 5 | 4 | 3 | 24,4 | M |
| DAS 63 | 36 | 8 | 11 | 8 | 9 | 50 | M |
| DAS 64 | 36 | 3 | 1 | 16 | 16 | 75 | M |
| DAS 65 | 34 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 66 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 67 | 36 | 8 | 9 | 7 | 12 | 54,6 | M |
| DAS 68 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 69 | 33 | 12 | 5 | 8 | 8 | 45,5 | M |
| DAS 70 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 71 | 36 | 13 | 8 | 9 | 6 | 40,7 | M |
| DAS 72 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 73 | 34 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | R |
| DAS 74 | 35 | 34 | 1 | 0 | 0 | 1 | M |

У процесі генетичного і QTL картування з використанням популяції DH, що походить від схрещування Quantum x DMS100, були знайдені одна основна (N5) і одна мінорна (N1) області QTL для високого вмісту C18:1 і три області QTL (N4 і N14) для низького вмісту C18:3. Фіг. 5. Результат цього картування узгоджується з генетичними аналізами, які показали, що високий вміст C18:1 контролюється одним головним геном, а низький вміст C18:3 контролюється багатьма генами. Маркер на основі гена *fad2* локалізований точно в картованій локалізації локусу QTL для C18:1, підтримуючи той факт, що QTL відповідає функціонуючому гену *fad2*, який піддадуть мутації в DMS100. Це також збігається з попередніми дослідженнями, які показали, що ген *fad2* може бути локалізований в групі зчеплення N5. Див. Schierholt et al. (2000) Theor. Appl. Genet. 101:897-901. Локалізація маркера, оснований на гені *fad3*, точно збігається з картованою локалізацією одного з головних локусів QTL для C18:3 в групі зчеплення 14 (геном C), підтримуючи висновок про те, що QTL являє собою ген *fad3c* (*fad3* у геномі C, який раніше називався як *fad32*) і що він схильний до другої мутації в DMS100.

Приклад 4: Отримання популяцій для селекції

Вихідне міжсортне схрещування включало канолу HOLL x канолу сорту не HOLL. F₁ використовували як подвійний гаплотипний донор, і всі донорські рослини були гемізиготними для кожного з трьох мутантів *fad*. Всі донорські рослини були гемізиготними для кожної з трьох необхідних мутацій десатурази жирних кислот. Всі три гени, як прогнозувалося, групувалися незалежно. Таким чином, представлена популяція із 457 зібраних індивідуумів, очікувалося, що 1/8 цих індивідуумів ($1/2 \times 1/2 \times 1/2$) повинні містити всі три маркери FAD. Отже, з 457 індивідуумів приблизно 57 індивідуумів, як прогнозувалося, містять всі три маркери FAD, які роблять внесок у канолу HO/LL. Однак, як продемонстровано за допомогою аналізу FAME, поданого на Фіг. 7, цей прогноз в даній популяції не виправдався.

Профіль розподілу жирних кислот при схрещуванні HO/LL x не HO/LL не був очікуваним. У цій популяції була менша кількість індивідуумів з низьким вмістом C18:3, ніж повинні було очікуватися, і набагато більше індивідуумів з дуже низьким вмістом композиції C18:1. 202 індивідууми продукували рівень C18:1 вище 70 %, але тільки 101 індивідуум продукував рівень C18:3 нижче 3,0 %. Тільки 41 індивідуум мав поєднання вмісту C18:1 вище 70 % і C18:3 нижче 3 %. Це було нижчим, ніж очікувана кількість в 57 індивідуумів. Замість 12 % індивідуумів, які містять профіль олії насіння HO/LL (як очікувалося), тільки 9 % індивідуумів демонструвало такий профіль.

Досліджували також вплив поєднання двох наборів батьківського матеріалу. Рослини HO/LL схрещували з рослинами сорту не HO/LL для отримання популяцій для селекції. Ця популяція дала велику кількість ліній DH, які не мали профілю HO/LL або стандартних профілів жирних

кислот каноли, навіть якщо обидва батька були HO/LL або мали стандартні профілі жирних кислот каноли (C18-1; C18-3). 88 ліній DH продукувало профіль менше 60 % C18:1, що звичайно виявляється в матеріалах з якістю, що не відповідає канолі. Це було несподіваним результатом, оскільки генетичний склад рослин-донорів був гемізиготним для всіх трьох мутацій FAD.

Спостерігалася більш висока продукція як C16:0, так і C18:2 в цих матеріалах порівняно з типами HO/LL і близькими до HO/LL. Ці типи з якістю, що не відповідає канолі, продукували злегка підвищений рівень C16:0 порівняно з лініями HO/LL, але найбільша відмінність між цими двома класами ліній полягала в рівні ліноленової кислоти (C18:2). Лінії, що містять дуже низькі рівні C18:1, мали дуже високі рівні C18:2, а також дуже високі рівні C18:3. Існували лінії із вмістом C18:1 менше 60 %, які мали дуже низькі рівні C18:3 (менше 2 %), що представляють цікаве поєднання генетичних ознак, яке заявники не бачили у цих різновидів схрещування раніше.

З даних генетичних прогнозів відносно батьківських ліній, гемізиготних за всіма трьома мутаціями FAD, повинно очікуватися, що велика частка ліній HO/LL повинна виявляти стійкість до кили хрестоцвітих. Однак складність складу жирних кислот, що спостерігається у потомства таких рослин, вказує на те, що створення ліній HO/LL зі стійкістю до кили хрестоцвітих за допомогою схрещування гемізиготних рослин FAD повинно бути утруднено.

Інша складність, яка спостерігається при комбінації батьків HO/LL і не HO/LL, полягала в отриманні раннього цвітіння ліній HO/LL в популяції потомків. Як проілюстровано на діаграмі цвітіння на Фіг. 8, частоту ряду селекційних ліній порівнювали з датою цвітіння. Дуже мало селекційних ліній характеризувалося раннім цвітінням, і спостерігалася тенденція до розподілу, що є сплосченим, з великою кількістю ліній, які виявляють більш пізнє цвітіння. Отримання дуже рано квітучої лінії HO/LL і ліній, стійких до кили хрестоцвітих, із використанням цього батьківського матеріалу виявилось несподівано важким. Істотні відмінності в цвітінні також очевидні для ліній зі стійкістю, поданих на Фіг. 7.

Стійкі лінії, ідентифіковані в таблиці 1 (від DAS 34 до DAS 74), висаджували для здійснення селекційного зворотного схрещування батька HOLL. Стійкі лінії таблиці 1 давали дуже великі відмінності в даті першого цвітіння від 19 березня до 2 квітня. Чотири стійкі лінії давали надто пізнє цвітіння і не квітнули доти, поки батько HOLL виявлявся вже без квіток. Потрібно зазначити, що чотири лінії, стійкі до кили хрестоцвітих, з найбільш раннім цвітінням в цьому експерименті мали тільки два з трьох маркерів FAD. Дві з чотирьох ліній з гранично пізнім цвітінням мали всі три мутанти FAD і дві з ліній з гранично пізнім цвітінням мали два мутанти FAD. Це вказує на складність і трудність отримання зародкової плазми, стійкої до кили хрестоцвітих, з раннім цвітінням і HOLL, в одній лінії Brassica.

Приклад 5: Аналіз FAME

Для 40 окремих ліній, проаналізованих в прикладі 3, проводили аналіз FAME для визначення вмісту жирних кислот у лініях. Результати представлені в таблицях 2 і 3 нижче:

Таблиця 2

Аналіз FAME (C12:0-C18:3)

| Генотип | % насич. | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 |
|---------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DAS 34 | 8,11 | nd | 0,04 | 4,29 | 0,52 | 2,19 | 73,09 | 12,50 | 3,96 |
| DAS 35 | 7,73 | nd | 0,07 | 4,82 | 0,46 | 1,57 | 62,95 | 21,69 | 5,31 |
| DAS 36 | 7,89 | nd | 0,07 | 4,77 | 0,52 | 1,58 | 68,66 | 15,41 | 5,41 |
| DAS 37 | 8,39 | nd | 0,06 | 4,24 | 0,34 | 2,55 | 72,78 | 9,99 | 5,79 |
| DAS 38 | 9,84 | nd | 0,08 | 5,97 | 0,46 | 2,11 | 64,02 | 18,74 | 4,79 |
| DAS 39 | 7,18 | nd | 0,07 | 4,13 | 0,29 | 1,62 | 64,75 | 21,65 | 3,92 |
| DAS 40 | 7,77 | nd | 0,06 | 3,85 | 0,33 | 2,29 | 77,43 | 8,71 | 3,02 |
| DAS 41 | 7,43 | nd | 0,06 | 4,21 | 0,32 | 1,72 | 75,10 | 9,11 | 5,72 |
| DAS 42 | 6,91 | nd | 0,07 | 4,04 | 0,32 | 1,70 | 71,62 | 15,55 | 3,35 |
| DAS 43 | 6,81 | 0,01 | 0,08 | 4,30 | 0,37 | 1,47 | 71,21 | 14,27 | 4,93 |
| DAS 44 | 7,75 | nd | 0,06 | 4,60 | 0,40 | 1,93 | 75,11 | 11,13 | 3,44 |
| DAS 45 | 7,64 | nd | 0,10 | 5,24 | 0,42 | 1,48 | 61,52 | 26,32 | 2,02 |
| DAS 46 | 7,70 | nd | 0,09 | 5,12 | 0,53 | 1,42 | 65,22 | 13,98 | 9,98 |
| DAS 47 | 7,37 | nd | 0,07 | 4,12 | 0,31 | 1,98 | 73,18 | 14,64 | 2,30 |
| DAS 48 | 7,72 | nd | 0,09 | 4,76 | 0,40 | 1,74 | 69,91 | 12,01 | 7,76 |
| DAS 49 | 7,28 | 0,02 | 0,07 | 3,35 | 0,27 | 2,31 | 76,19 | 8,16 | 5,82 |
| DAS 50 | 7,39 | nd | 0,07 | 4,56 | 0,47 | 1,69 | 69,97 | 18,54 | 1,52 |

Таблиця 2

Аналіз FAME (C12:0-C18:3)

| Генотип | % насич. | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 |
|---------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DAS 51 | 7,64 | nd | 0,07 | 4,69 | 0,41 | 1,67 | 70,78 | 14,55 | 4,26 |
| DAS 52 | 6,79 | nd | 0,05 | 3,79 | 0,29 | 1,69 | 74,42 | 10,45 | 5,59 |
| DAS 53 | 6,59 | nd | 0,06 | 4,07 | 0,29 | 1,41 | 73,64 | 11,65 | 5,47 |
| DAS 54 | 8,08 | nd | 0,06 | 4,38 | 0,26 | 2,35 | 65,77 | 22,22 | 1,44 |
| DAS 55 | 7,36 | nd | 0,08 | 4,82 | 0,41 | 1,35 | 69,24 | 18,40 | 2,14 |
| DAS 56 | 7,56 | 0,03 | 0,10 | 3,73 | 0,29 | 2,39 | 73,29 | 11,82 | 4,71 |
| DAS 57 | 6,98 | nd | 0,08 | 4,37 | 0,28 | 1,55 | 58,65 | 24,75 | 7,16 |
| DAS 58 | 7,48 | nd | 0,05 | 4,65 | 0,37 | 1,62 | 74,66 | 11,19 | 3,91 |
| DAS 59 | 6,49 | nd | 0,08 | 4,51 | 0,32 | 1,19 | 71,51 | 11,15 | 8,43 |
| DAS 60 | 7,18 | nd | 0,09 | 4,15 | 0,36 | 1,71 | 70,11 | 11,98 | 7,80 |
| DAS 61 | 6,59 | nd | 0,05 | 3,93 | 0,25 | 1,45 | 64,19 | 20,84 | 5,65 |
| DAS 62 | 6,39 | nd | 0,05 | 3,44 | 0,23 | 1,64 | 69,86 | 19,00 | 2,12 |
| DAS 63 | 7,00 | nd | 0,07 | 3,33 | 0,24 | 2,19 | 75,71 | 10,52 | 4,14 |
| DAS 64 | 7,95 | nd | 0,06 | 4,30 | 0,29 | 2,20 | 64,63 | 17,37 | 7,51 |
| DAS 65 | 7,52 | nd | 0,07 | 4,27 | 0,36 | 1,80 | 61,40 | 19,72 | 8,43 |
| DAS 66 | 6,64 | nd | 0,07 | 3,92 | 0,34 | 1,65 | 73,70 | 12,85 | 4,33 |
| DAS 67 | 7,33 | nd | 0,06 | 4,17 | 0,34 | 1,97 | 75,95 | 10,35 | 3,86 |
| DAS 68 | 7,21 | nd | 0,07 | 4,03 | 0,33 | 1,90 | 72,56 | 12,63 | 4,99 |
| DAS 69 | 7,32 | nd | 0,06 | 4,31 | 0,42 | 1,72 | 72,42 | 12,31 | 4,99 |
| DAS 70 | 7,01 | nd | 0,07 | 4,04 | 0,31 | 1,89 | 73,04 | 15,43 | 2,04 |
| DAS 71 | 7,49 | 0,01 | 0,08 | 4,91 | 0,34 | 1,44 | 54,41 | 28,79 | 6,59 |
| DAS 72 | 7,32 | nd | 0,06 | 4,66 | 0,36 | 1,53 | 71,69 | 12,04 | 6,42 |
| DAS 73 | 7,59 | nd | 0,07 | 5,11 | 0,41 | 1,40 | 58,09 | 29,38 | 2,16 |

Таблиця 3

Аналіз FAME (C20:0-C24:1)

| Генотип | C20:0 | C20:1 | C20:2 | C22:0 | C22:1 | C24:0 | C24:1 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DAS 34 | 0,78 | 1,27 | 0,07 | 0,44 | nd | 0,36 | 0,18 |
| DAS 35 | 0,63 | 1,23 | 0,09 | 0,42 | nd | 0,23 | 0,17 |
| DAS 36 | 0,70 | 1,46 | 0,08 | 0,51 | nd | 0,27 | 0,25 |
| DAS 37 | 0,84 | 1,31 | 0,06 | 0,40 | nd | 0,30 | 0,16 |
| DAS 38 | 0,82 | 1,23 | 0,07 | 0,49 | nd | 0,37 | 0,26 |
| DAS 39 | 0,62 | 1,47 | 0,11 | 0,41 | nd | 0,33 | 0,16 |
| DAS 40 | 0,81 | 1,35 | 0,05 | 0,45 | 0,02 | 0,32 | 0,15 |
| DAS 41 | 0,74 | 1,50 | 0,05 | 0,49 | nd | 0,20 | 0,14 |
| DAS 42 | 0,61 | 1,35 | 0,08 | 0,33 | nd | 0,17 | 0,14 |
| DAS 43 | 0,54 | 1,38 | 0,06 | 0,29 | 0,02 | 0,10 | 0,13 |
| DAS 44 | 0,67 | 1,21 | 0,04 | 0,33 | 0,02 | 0,17 | 0,12 |
| DAS 45 | 0,47 | 0,98 | 0,07 | 0,22 | nd | 0,13 | 0,14 |
| DAS 46 | 0,55 | 1,43 | 0,06 | 0,33 | 0,03 | 0,19 | 0,21 |
| DAS 47 | 0,71 | 1,26 | 0,07 | 0,36 | nd | 0,14 | 0,11 |
| DAS 48 | 0,63 | 1,28 | 0,06 | 0,35 | nd | 0,15 | 0,12 |
| DAS 49 | 0,84 | 1,44 | 0,06 | 0,43 | 0,02 | 0,25 | 0,14 |
| DAS 50 | 0,57 | 1,06 | 0,06 | 0,29 | nd | 0,20 | 0,23 |
| DAS 51 | 0,67 | 1,35 | 0,06 | 0,38 | 0,02 | 0,16 | 0,15 |
| DAS 52 | 0,70 | 1,56 | 0,06 | 0,42 | nd | 0,14 | 0,13 |
| DAS 53 | 0,57 | 1,40 | 0,06 | 0,34 | 0,02 | 0,15 | 0,16 |
| DAS 54 | 0,76 | 1,24 | 0,08 | 0,38 | 0,01 | 0,15 | 0,17 |
| DAS 55 | 0,55 | 1,34 | 0,08 | 0,34 | 0,02 | 0,22 | 0,20 |
| DAS 56 | 0,80 | 1,34 | 0,07 | 0,37 | nd | 0,15 | 0,12 |
| DAS 57 | 0,54 | 1,12 | 0,08 | 0,31 | nd | 0,13 | 0,13 |

Аналіз FAME (C20:0-C24:1)

| Генотип | C20:0 | C20:1 | C20:2 | C22:0 | C22:1 | C24:0 | C24:1 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DAS 58 | 0,60 | 1,38 | 0,05 | 0,34 | 0,03 | 0,21 | 0,11 |
| DAS 59 | 0,42 | 1,17 | 0,06 | 0,21 | nd | 0,09 | 0,14 |
| DAS 60 | 0,64 | 1,47 | 0,07 | 0,34 | nd | 0,26 | 0,21 |
| DAS 61 | 0,59 | 1,42 | 0,09 | 0,36 | 0,02 | 0,21 | 0,18 |
| DAS 62 | 0,67 | 1,42 | 0,09 | 0,41 | 0,02 | 0,18 | 0,12 |
| DAS 63 | 0,80 | 1,51 | 0,07 | 0,41 | nd | 0,21 | 0,16 |
| DAS 64 | 0,79 | 1,22 | 0,07 | 0,42 | 0,01 | 0,18 | 0,16 |
| DAS 65 | 0,70 | 1,46 | 0,08 | 0,45 | 0,03 | 0,21 | 0,15 |
| DAS 66 | 0,58 | 1,27 | 0,06 | 0,29 | nd | 0,12 | 0,12 |
| DAS 67 | 0,66 | 1,26 | 0,04 | 0,32 | nd | 0,15 | 0,10 |
| DAS 68 | 0,68 | 1,30 | 0,06 | 0,35 | 0,02 | 0,19 | 0,13 |
| DAS 69 | 0,66 | 1,40 | 0,07 | 0,37 | nd | 0,19 | 0,17 |
| DAS 70 | 0,61 | 1,23 | 0,07 | 0,29 | nd | 0,10 | 0,09 |
| DAS 71 | 0,54 | 1,26 | 0,10 | 0,32 | 0,06 | 0,19 | 0,16 |
| DAS 72 | 0,61 | 1,24 | 0,06 | 0,37 | nd | 0,09 | 0,14 |
| DAS 73 | 0,52 | 1,25 | 0,08 | 0,30 | nd | 0,20 | 0,17 |

Приклад 6: Селекція стійкості до гербіцидів

Приблизно 1000 індивідуумів покоління BC1 (від зворотного схрещування індивідуумів Mendel x HO/LL/rest/gly зі стійкими до імідазолінону і гліфосату інбредними лініями) досліджували на ген-відновник фертильності. Було виявлено, що приблизно 156 індивідуумів BC1 були гомозиготними, 469 були гемізиготними і 370 індивідуумів характеризувалися ознакою відновлення фертильності дикого типу. Частки фертильних (гомозиготних і гемізиготних) індивідуумів були нижчими очікуваних із даними очікуваними відношеннями 50 % гомозиготних і 50 % гемізиготних для ознаки відновлення фертильності; фактичні результати становили 625 фертильних:469 стерильних, істотно відходячи від очікуваного відношення.

Були проведені додаткові тести на фертильність (гомозиготних і гемізиготних) рослин для визначення наявності стійкості до гліфосату. 327 рослин BC1 зі стійкістю до гліфосату використовували для селекції стійкості до імідазолінону. Типи, стійкі до імідазолінону, отримували в приблизному відношенні 1:1 гомозиготи:гемізиготи для кожного з трьох генів FAD (173:150 для FAD2, 144:177 для FAD3A і 174:153 для FAD3C), і з отриманих рослин 83 були гомозиготними для гена-відновника і 244 були гемізиготними. Лінії з індивідуальною негативною стійкістю до гліфосату порівнювали на присутність генів FAD, а також гена-відновника, і рослини, ідентифіковані як гомозиготні для двох із трьох генів FAD, а також гомозиготні для гена-відновника, вирощували в горщиках у теплиці для селекції "раннього цвітіння".

Дні до цвітіння в умовах теплиці визначали для кожної рослини, і рослини з найбільш раннім цвітінням з двома або трьома генами FAD і ознакою відновлення індивідуально вміщували в мішечки для самоопилення для отримання чистого насіння BC1S1. Після збору невеликі зразки насіння тестували для підтвердження профілів жирних кислот олії насіння. Вміст олеїнової кислоти (C18:1) в цих зразках знаходився в діапазоні від 63,34 % до 77,34 %. Вміст ліноленової кислоти (C18:3) знаходився в діапазоні від 5,81 % до 1,32 %, і склад насичених жирних кислот знаходився в діапазоні від 9,64 % до 6,49 %. Тестували насіння, що залишилося від 20 найбільш рано квітучих ліній BC1S1, стійких до імідазолінону, з високим вмістом олеїнової, низьким вмістом ліноленової кислот, геном- відновником, і у всіх визначали носійство стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

Приклад 7: Маркери, зчеплені зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих

Сорт Mendel культурної рослини B. napus зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих використовували для отримання серій схрещувань з інбредною лінією HO/LL B. napus, яка містить ген-відновник фертильності (restr) і стійкість до гліфосату (gly). Отримане потомство F₁ піддавали зворотному схрещуванню з інбредними лініями, стійкими до імідазолінону і гліфосату, з селекцією на HO/LL, відновник фертильності і стійкість до гербіцидів. Рослини F₁ були проміжними відносно ознак росту і вимагали низькотемпературної яровізації для індукції цвітіння. Використовували характеристики молекулярних маркерів для об'єднання стійкості до гербіцидів, профілів олії насіння і відновлення фертильності для ідентифікації індивідуумів F₁ з метою застосування як батьків при схрещуванні для створення покоління BC1. Після отримання

покоління BC1 визначали стійкість до кили хрестоцвітих із використанням біологічного методу, який показав, що стійкість до захворювання килою хрестоцвітих передавалася батьківським типам HO/LL. У таблиці 4 представлені результати тестування на стійкість до кили хрестоцвітих для множини рослин з 40 окремих ліній. Рослини поділяли на категорії з ранжуванням від 0 (стійкі) до 3 (сприйнятливі). Лінію загалом потім оцінювали за допомогою буквеної градації від R (стійка), M (змішана стійкість) до S (сприйнятлива).

Таблиця 4

Результати тестування на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих 40 окремих ліній каноли (численні рослини)

| Генотип | Сумарно рослин* | Кількість рослин, віднесених до кожної категорії | | | | ID (%) | | Стійкість до кили хрестоцвітих |
|---------|-----------------|--|----|----|----|--------|--|--------------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | | | |
| DAS 34 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 35 | 35 | 35 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 36 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 37 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 38 | 36 | 2 | 0 | 0 | 34 | 94,4 | | S |
| DAS 39 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 40 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 41 | 36 | 1 | 1 | 3 | 31 | 92,6 | | S |
| DAS 42 | 36 | 1 | 0 | 1 | 34 | 96,3 | | S |
| DAS 43 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 44 | 36 | 6 | 6 | 7 | 17 | 65,7 | | M |
| DAS 45 | 34 | 33 | 1 | 0 | 0 | 1 | | M |
| DAS 46 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 47 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 48 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 49 | 36 | 0 | 3 | 16 | 17 | 79,6 | | M |
| DAS 50 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 51 | 36 | 31 | 1 | 4 | 0 | 8,3 | | M |
| DAS 52 | 36 | 18 | 8 | 6 | 4 | 29,6 | | M |
| DAS 53 | 36 | 1 | 1 | 6 | 28 | 89,8 | | M |
| DAS 54 | 36 | 0 | 0 | 0 | 36 | 100 | | S |
| DAS 55 | 36 | 2 | 0 | 0 | 34 | 94,4 | | S |
| DAS 56 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 57 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 58 | 36 | 3 | 3 | 12 | 18 | 75 | | M |
| DAS 59 | 36 | 3 | 2 | 2 | 29 | 86,1 | | M |
| DAS 60 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 61 | 36 | 3 | 4 | 10 | 19 | 75 | | M |
| DAS 62 | 30 | 18 | 5 | 4 | 3 | 24,4 | | M |
| DAS 63 | 36 | 8 | 11 | 8 | 9 | 50 | | M |
| DAS 64 | 36 | 3 | 1 | 16 | 16 | 75 | | M |
| DAS 65 | 34 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 66 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 67 | 36 | 8 | 9 | 7 | 12 | 54,6 | | M |
| DAS 68 | 36 | 36 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 69 | 33 | 12 | 5 | 8 | 8 | 45,5 | | M |
| DAS 70 | 30 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 71 | 36 | 13 | 8 | 9 | 6 | 40,7 | | M |
| DAS 72 | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 73 | 34 | 34 | 0 | 0 | 0 | 0 | | R |
| DAS 74 | 35 | 34 | 1 | 0 | 0 | 1 | | M |

Здійснювали потрібне схрещування інбредної лінії Mendel (стійкість до кили хрестоцвітих) HO/LL з інбредною лінією B. parus, сприйнятливої до захворювання килою хрестоцвітих. Проводили скринінг сорока ліній DH, які походять від рослини покоління F₁ цього потрібного схрещування на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих із використанням біологічного методу. Таблиця 5. Вирощували ці вибрані лінії DH, дві батьківські лінії і три сорти канолі (NEX 827, NEX 830 і NEX 845), і збирали тканину листя від кожної. Зібрані тканини листя ліофілізували і розтирали для екстракції ДНК.

Таблиця 5

Лінії DH, які використовують для ідентифікації молекулярних маркерів стійкості до кили хрестоцвітих

| Loc Seq# | Geno_Id | Джерело ID |
|----------|---------|------------------|
| 7880 | 140227 | BS09PS000170.005 |
| 7881 | 140243 | BS09PS000170.021 |
| 7882 | 140251 | BS09PS000170.029 |
| 7883 | 145442 | BS09PS000170.120 |
| 7884 | 145506 | BS09PS000170.184 |
| 7885 | 145551 | BS09PS000170.229 |
| 7886 | 145557 | BS09PS000170.235 |
| 7887 | 145645 | BS09PS000170.323 |
| 7888 | 145666 | BS09PS000170.344 |
| 7889 | 145721 | BS09PS000170.399 |
| 7890 | 145733 | BS09PS000170.411 |
| 7891 | 145768 | BS09PS000170.446 |
| 7892 | 145776 | BS09PS000170.454 |
| 7893 | 145779 | BS09PS000170.457 |
| 7894 | 145784 | BS09PS000170.462 |
| 7895 | 145790 | BS09PS000170.468 |
| 7896 | 145791 | BS09PS000170.469 |
| 7897 | 145810 | BS09PS000170.488 |
| 7898 | 145813 | BS09PS000170.491 |
| 7899 | 145814 | BS09PS000170.492 |
| 7900 | 145842 | BS09PS000170.520 |
| 7901 | 145850 | BS09PS000170.528 |
| 7902 | 145853 | BS09PS000170.531 |
| 7903 | 145860 | BS09PS000170.538 |
| 7904 | 145863 | BS09PS000170.541 |
| 7905 | 145864 | BS09PS000170.542 |
| 7906 | 145882 | BS09PS000170.560 |
| 7907 | 145946 | BS09PS000170.624 |
| 7908 | 145978 | BS09PS000170.656 |
| 7909 | 146007 | BS09PS000170.685 |
| 7910 | 146034 | BS09PS000170.712 |
| 7911 | 146037 | BS09PS000170.715 |
| 7912 | 146038 | BS09PS000170.716 |
| 7913 | 146039 | BS09PS000170.717 |
| 7914 | 146043 | BS09PS000170.721 |
| 7915 | 146049 | BS09PS000170.727 |
| 7916 | 146058 | BS09PS000170.736 |
| 7917 | 146074 | BS09PS000170.752 |
| 7918 | 146075 | BS09PS000170.753 |
| 7919 | 146091 | BS09PS000170.769 |
| 7920 | 21641 | BS08PS000120.001 |

ДНК екстрагували з ліофілізованих розтертих тканин листя з використанням набору для екстракції ДНК рослин Qiagen™ Mini відповідно до інструкцій набору. Зразки проекстрагованої

ДНК кількісно оцінювали з використанням NanoDrop™ 8000 і доводили до концентрації 5 нг/мкл особливо чистою водою. Два окремі зразки сумарної ДНК складали з використанням однакових кількостей ДНК від 5 ліній DH, стійких до кили хрестоцвітих ("R-пул") (лінії DH 140227, 145776, 145853, 145882 і 146058) і від 5 чутливих ліній DH ("S-пул") (лінії DH 145506, 145645, 145666, 145842, 145850).

Ці два сумарні зразки ДНК разом із зразками батьківської ДНК використовували для ідентифікації маркерів SSR (маркерів повторів простих послідовностей), зчеплених зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих у каноли, з використанням способу масового сегрегаційного аналізу: заявники застосовували спосіб масового сегрегаційного аналізу (BSA) з використанням R-пулу, S-пулу і зразків ДНК від їх відповідних батьківських ліній з молекулярними маркерами повторів простих послідовностей (SSR). Потім маркери SSR, ідентифіковані як поліморфні між двома сумарними зразками ДНК і батьківськими лініями, тестували у 40 індивідуальних ліній DH з відомою стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих.

Проводили скринінг двох сумарних зразків ДНК і ДНК двох батьківських ліній з допомогою сумарно 713 пар SSR M13-мічених праймерів і генетичного аналізатора ABI 3130 для ідентифікації поліморфних маркерів між стійкими і чутливими пулами, а також батьківської ДНК. Скринінг проводили за допомогою здійснення реакцій ПЛР із праймерами, які мають послідовності, представлені в SEQ IDs 20, 21 і 22 (FAM-міченими); Taq-полімеразою HotMaster™; і реакційним буфером HotMaster™. Реакції ПЛР здійснювали в 1 циклі при 95°C протягом 3 хвилин; 4 циклах профілю touchdown ПЛР, що складається з 94°C протягом 30 секунд, 56°C протягом 50 секунд (-2°C/цикл), і 72°C протягом 55 секунд; 24 циклах при 94°C протягом 30 секунд, 51°C протягом 50 секунд і 72°C протягом 55 секунд; 1 циклі при 72°C протягом 10 хвилин; і при кінцевій інкубації при 8°C до завершення. Реакційні суміші після закінчення ПЛР розбавляли (7 мкл реакційної суміші в 100 мкл H₂O) і 4 мкл розбавленого продукту ПЛР змішували з рухомим буфером SSR (10,8 мкл HiDi формаміду і 0,2 мкл стандартної ДНК Gene Scan 600 LIZ) і переносили в планшет для використання в генетичному аналізаторі ABI 3130 × 1. Планшети потім швидко крутили короткий час (макс. 500 об./хв. протягом декількох секунд), денатурували протягом 5 хвилин при 95°C і охолоджували на льоду. Планшети знову швидко крутили для впевненості в тому, що вся рідина скупчилася на дні кожної ямки, і не спостерігається пухирців повітря. Отримані планшети потім вставляли в планшетний блок і завантажували в генетичний аналізатор ABI 3130 × 1. Дані аналізували з використанням комп'ютерної програми GeneMapper™.

42 з 713 пар праймерів SSR, що були піддані скринінгу, були поліморфними при ампліфікаціях ДНК між стійким ДНК-пулом (R-пулом) і чутливим ДНК-пулом (S-пулом), і поліморфізми, що спостерігаються, збігалися зі стійкою батьківською лінією (Mendel) і чутливим інбредним батьком. Ці 42 маркери SSR використовували для скринінгу сорока індивідуальних ліній DH, батьківських сортів, NEX 827, NEX 830 і NEX 845, для визначення зчеплення між маркером і фенотипом стійкості до кили хрестоцвітих.

Масовий сегрегаційний аналіз ідентифікував одну пару праймерів SSR (BN1810), що забезпечує ампліфікацію фрагмента ДНК 333 п. о., тісно зв'язаного з фенотипом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

Таблиця 6.

Маркер BN1810 SSR

BN1810-DAS-M13F: CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTTCTCC GACCAAAGCTGTTT (SEQ ID NO:20)

BN 1810-Tailed R: GTTTCTTAAGGAGCTGGATTCACATGG (SEQ ID NO:21)

M13-6FAM (флуоресцентно мічений праймер): 6FAM-CACGACGTTGTAAAACGA (SEQ ID NO:22)

За винятком двох помилкових класифікацій цей маркер безпомилково передбачає реакцію протестованих ліній каноли на захворювання килою хрестоцвітих. Дані таблиці 6 демонструють 19 стійких індивідуумів, 13 чутливих індивідуумів і 6 індивідуумів, які класифікуються як помірно стійкі. Цей маркер був протестований також з іншою популяцією DH, яка походила від Mendel як стійкої рослини, і маркер передбачав очікуване співвідношення сегрегації стійких індивідуумів до чутливих. Індивідууми, ті, що оцінюються в цій, іншій популяції DH походили не від гомозиготних батьків, так що очікувалася деяка сегрегація.

Таблиця 6

Реакція на захворювання килою хрестоцвітих і алелі маркера пари праймерів BN1810 SSR індивідуальних ліній DH, батьківських ліній і сортів DAS каноли, які використовують для визначення взаємозв'язку зчеплення.

Правильно класифіковані маркерним алелем фенотипи виділені жирним шрифтом, а неправильно класифіковані виділені курсивом.

| ID зразка | Фенотип реакції на килу хрестоцвітих | Маркерні алелі BN1810 SSR | | | |
|-----------|--|---------------------------|---------|---------|----------|
| | | Алель 1 | Алель 2 | Алель 3 | Алель 3* |
| Mendel | R | 325 | | 331 | 333 |
| 7926 | S | | | 331 | |
| R-Pool | | 325 | | 331 | 333 |
| S-Pool | | | | 331 | |
| Nex827 | S | | 327 | | |
| Nex830 | S | | 327 | | |
| Nex845 | S | | | 331 | |
| 140227 | R | 325 | | | 333 |
| 140243 | R | | | | 333 |
| 140251 | R | | | | 333 |
| 145442 | R | 325 | | | 333 |
| 145506 | S | | | 331 | |
| 145551 | R | | | | 333 |
| 145557 | R | | | | 333 |
| 145645 | S | | | 331 | |
| 145666 | S | | | 331 | |
| 145721 | R | 325 | | | 333 |
| 145733 | S | 325 | | 331 | |
| 145768 | R | 325 | | 331 | |
| 145776 | R | 325 | | | 333 |
| 145779 | R | 325 | | | 333 |
| 145784 | R | | | | 333 |
| 145790 | S | | | 331 | |
| 145791 | R | | | | 333 |
| 145810 | MR | | | 331 | |
| 145813 | S | | | 331 | |
| 145814 | S | 325 | | 331 | |
| 145842 | S | | | 331 | |
| 145850 | S | | | 331 | |
| 145853 | R | | | 331 | |
| 145860 | R | 325 | | | 333 |
| 145863 | S | 325 | | 331 | |
| 145864 | S | 325 | | 331 | |
| 145882 | R | | | | 333 |
| 145946 | S | | | | |
| 145978 | MR | | | 331 | |
| 146007 | MR | | | 331 | |
| 146034 | S | | | 331 | |
| 146037 | R | | | | 333 |
| 146038 | R | 325 | | | 333 |
| 146039 | MR | | | 331 | |
| 146043 | R | | | | 333 |

Таблиця 6

Реакція на захворювання килою хрестоцвітих і алелі маркера пари праймерів BN1810 SSR індивідуальних ліній DH, батьківських ліній і сортів DAS канолі, які використовують для визначення взаємозв'язку зчеплення.

Правильно класифіковані маркерним алелем фенотипи виділені жирним шрифтом, а неправильно класифіковані виділені курсивом.

| ID зразка | Фенотип реакції на килу хрестоцвітих | Маркерні алелі BN1810 SSR | | | |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------|---------|---------|----------|
| | | Алель 1 | Алель 2 | Алель 3 | Алель 3* |
| 146049 | MR | | | 331 | |
| 146058 | R | 325 | | 331 | |
| 146074 | MR | | | | 333 |
| 146075 | R | | | | 333 |
| 146091 | R | 325 | | | 333 |

*Алель, який ідентифікований як зчеплений зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих і сприяє стійкості до кили хрестоцвітих у батьківській лінії Mendel.

Приклад 8: Ідентифікація гена(ів) стійкості до захворювання килою хрестоцвітих

Секвенована область геномної ДНК В. parus, ампліфікована парою праймерів BN1810 SSR.

5 Послідовність ампліфікованої області використовується для геномних баз даних зондів для ідентифікації гена, що включає маркер BN1810 SSR. Ген, що включає маркер BN1810 SSR, ідентифікований, і цей ген визначений як такий, що є джерелом стійкості до захворювання килою хрестоцвітих.

10 Ідентифікований ген стійкості до захворювання килою хрестоцвітих локалізований в геномі Brassica, і ідентифіковані маркери, які розташовані досить близько до гена, є зчепленими в процесі мейозу. Проведений скринінг ідентифікованих маркерів у популяціях F₁ гібридів між сортами, стійкими до захворювання килою хрестоцвітих і чутливими до нього, для додаткової ідентифікації підгрупи маркерів, які є поліморфними, і таким чином придатні як маркери джерела стійкості до захворювання килою хрестоцвітих, представленого маркером BN1810 SSR. Деякі маркери в цій підгрупі можуть бути більш тісно зчеплені зі стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, ніж маркер BN1810 SSR.

15 Геномну ДНК виділяли з наданих сортів, і виділену ДНК ампліфікували з використанням пари праймерів BN1810 SSR. Якщо ампліфікація послідовності виділеної ДНК з послідовностями, які відповідають парі праймерів BN1810 SSR, показує присутність маркера, дані представляють доказ того, що джерело потенційної стійкості до кили хрестоцвітих є алельним варіантом джерела, присутнього в Mendel.

20 Надані сорти, кожний гібридується з лінією, чутливою до захворювання килою хрестоцвітих, для отримання популяції F₁. Подвійні гаплоїдні (DH) лінії отримують з цієї популяції F₁ і проводять скринінг ліній на стійкість до захворювання килою хрестоцвітих із використанням біологічного методу. Вибрані лінії DH, дві батьківські лінії і Mendel вирощують, і тканину рослини збирають від кожної лінії. ДНК екстрагують із зібраних тканин рослин. Зразки проекстрагованої ДНК кількісно оцінюють і складають зразки сумарної ДНК з ліній DH, стійких до кили хрестоцвітих, і ліній DH, чутливих до кили хрестоцвітих.

30 Зразки сумарної ДНК разом із зразками батьківської ДНК використовують у способі масового сегрегаційного аналізу для визначення того, чи є маркер BN1810 SSR поліморфним між пулами ДНК, стійкими до захворювання килою хрестоцвітих і чутливими до нього, батьківськими лініями і лініями DH. Якщо маркер є поліморфним, дані збігаються з гіпотезою про те, що джерелом потенційної стійкості до кили хрестоцвітих є варіант, алельний джерелу, присутньому в лінії Mendel.

35 Незважаючи на те, що в цьому документі описані ілюстративні варіанти здійснення, фахівці в даній галузі техніки повинні розуміти і брати до уваги, що можуть бути зроблені численні додатки, видалення і модифікації ілюстративних варіантів здійснення без виходу за межі об'єму подальшої формули винаходу. Крім того, характерні властивості одного варіанта здійснення можуть бути об'єднані з характерними властивостями іншого варіанта здійснення.

40

Список последовательностей

<110> Dow AgroSciences LLC
Ripley, Van L
Gingera, Gregory R
Zhao, Jianwei
Ubayasena, Lasantha

<120> Отримання каноли омега-9 зі стійкістю до кили хрестоцвітих

<130> 2971-9903US (69270)

<140> Невідомо
<141> 2011-02-09

<150> US 10/545,100
<151> 2006-05-16

<160> 22

<170> Версія 3.4 патенту

<210> 1
<211> 24
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 1
caatccctcg ctctttctcc tacc 24

<210> 2
<211> 24
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 2
cctttcttgt caccttcct gtcc 24

<210> 3
<211> 20
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 3
gaggcttgga cgaccacttg 20

<210> 4
<211> 20
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 4
gactggacca acgaggaatg 20

<210> 5
<211> 23
<212> ДНК

<213> Brassica napus

<400> 5
cgcacgtga tggttaacgg ttt 23

<210> 6
<211> 22
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 6
acaggtgatg cgccacgtgc gt 22

<210> 7
<211> 985
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 7
caatccctcg ctctttctcc tacctcatct gggacatcat catagcctcc tgcttctact 60
acgtcgccac cacttacttc cctctcctcc ctcaccctct ctcctacttc gcctggcctc 120
tctactgggc ctgccagggc tgcgtcctaa ccggcgctctg ggcatagcc caccagtgcg 180
gccaccacgc cttcagcgac taccagtggc tggacgacac cgtcggcctc atcttccact 240
ccttcctcct cgtcccttac ttctcctgga agtacagtca tcgacgccac cattccaaca 300
ctggctccct cgagagagac gaagtgtttg tccccagaa gaagtcagac atcaagtggg 360
acggcaagta cctcaacaac cctttgggac gcaccgtgat gttaacgggt tagttcactc 420
tcggctggcc tttgtactta gccttcaacg tctcggggag accttacgac ggcggcttcg 480
cttgccattt ccaccccaac gctcccatct acaacgaccg tgagcgtctc cagatataca 540
tctccgacgc tggcatcctc gccgtctgct acgggtctcta ccgtacgct gctgtccaag 600
gagttgcctc gatgggtctgc ttctacggag ttctctttct gattgtcaac gggttcttag 660
ttttgatcac ttacttgcag cacacgcac cttccctgcc tcactatgac tcgtctgagt 720
gggattgggt gaggggagct ttggccaccg ttgacagaga ctacggaatc ttgaacaagg 780
tcttccacaa tatcacggac acgcacgtgg cgcacacct gttctcgacc atgccgcatt 840
atcatgcgat ggaagctacg aaggcgataa agccgatact gggagagtat tatcagttcg 900
atgggacgcc ggtgggtaag gcgatgtgga gggaggcgaa ggagtgtatc tatgtggaac 960
cggacagggg aggtgacaag aaagg 985

<210> 8
<211> 136
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 8

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
20 25 30

Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
35 40 45

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
50 55 60

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
65 70 75 80

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
85 90 95

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
100 105 110

Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
115 120 125

Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val
130 135

<210> 9

<211> 985

<212> ДНК

<213> Brassica napus

<400> 9

| | |
|--|-----|
| caatccctcg ctctttctcc tacctcatct gggacatcat catagcctcc tgcttctact | 60 |
| acgtcgccac cacttacttc cctctcctcc ctccacctct ctctacttc gcctggcctc | 120 |
| tctactgggc ctgccagggc tgcgtcctaa ccggcgctctg ggtcatagcc cacgagtgcg | 180 |
| gccaccacgc cttcagcgac taccagtggc tggacgacac cgtcggcctc atcttccact | 240 |
| ccttctctct cgtcccttac ttctcctgga agtacagtca tcgacgccac cattccaaca | 300 |
| ctggctccct cgagagagac gaagtgttg tccccaagaa gaagtcagac atcaagtggc | 360 |
| acggcaagta cctcaacaac cctttgggac gcaccgtgat gttaacgggt cagttcactc | 420 |
| tcggctggcc tttgtactta gccttcaacg tctcggggag accttacgac ggcggtctcg | 480 |
| cttgccattt ccacccaac gctcccatct acaacgaccg tgagcgtctc cagatataca | 540 |

tctccgacgc tggcatcctc gccgtctgct acggtctcta ccgctacgct gctgtccaag 600
gagttgcctc gatgggtctgc ttctacggag ttctcttctt gattgtcaac gggttcttag 660
ttttgatcac ttacttgtag cacacgcata cttccctgcc tcactatgac tcgtctgagt 720
gggattgggt gaggggagct ttggccaccg ttgacagaga ctacggaatc ttgaacaagg 780
tcttccacaa tatcacggac acgcacgtgg cgcatacct gttctcgacc atgccgcatt 840
atcatgcgat ggaagctacg aaggcgataa agccgatact gggagagtat tatcagttcg 900
atgggacgcc ggtgggtaag gcgatgtgga gggaggcgaa ggagtgtatc tatgtggaac 960
cggacaggga aggtgacaag aaagg 985

<210> 10
<211> 327
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 10

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
20 25 30

Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
35 40 45

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
50 55 60

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
65 70 75 80

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His
85 90 95

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
100 105 110

Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
115 120 125

Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu
130 135 140

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala
145 150 155 160

Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu
165 170 175

Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu
180 185 190

Tyr Arg Tyr Ala Ala Val Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Tyr
195 200 205

Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr
210 215 220

Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp
225 230 235 240

Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
245 250 255

Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
260 265 270

Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala
275 280 285

Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val
290 295 300

Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro
305 310 315 320

Asp Arg Glu Gly Asp Lys Lys
325

<210> 11
<211> 384
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 11

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser
1 5 10 15

Glu Thr Asp Thr Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr
20 25 30

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Glu | Leu | Lys | Lys | Ala | Ile | Pro | Pro | His | Cys | Phe | Lys | Arg | Ser | 35 | 40 | 45 | |
| Ile | Pro | Arg | Ser | Phe | Ser | Tyr | Leu | Ile | Trp | Asp | Ile | Ile | Ile | Ala | Ser | 50 | 55 | 60 | |
| Cys | Phe | Tyr | Tyr | Val | Ala | Thr | Thr | Tyr | Phe | Pro | Leu | Leu | Pro | His | Pro | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Leu | Ser | Tyr | Phe | Ala | Trp | Pro | Leu | Tyr | Trp | Ala | Cys | Gln | Gly | Cys | Val | 85 | 90 | 95 | |
| Leu | Thr | Gly | Val | Trp | Val | Ile | Ala | His | Glu | Cys | Gly | His | His | Ala | Phe | 100 | 105 | 110 | |
| Ser | Asp | Tyr | Gln | Trp | Leu | Asp | Asp | Thr | Val | Gly | Leu | Ile | Phe | His | Ser | 115 | 120 | 125 | |
| Phe | Leu | Leu | Val | Pro | Tyr | Phe | Ser | Trp | Lys | Tyr | Ser | His | Arg | Arg | His | 130 | 135 | 140 | |
| His | Ser | Asn | Thr | Gly | Ser | Leu | Glu | Arg | Asp | Glu | Val | Phe | Val | Pro | Lys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Lys | Lys | Ser | Asp | Ile | Lys | Trp | Tyr | Gly | Lys | Tyr | Leu | Asn | Asn | Pro | Leu | 165 | 170 | 175 | |
| Gly | Arg | Thr | Val | Met | Leu | Thr | Val | Gln | Phe | Thr | Leu | Gly | Trp | Pro | Leu | 180 | 185 | 190 | |
| Tyr | Leu | Ala | Phe | Asn | Val | Ser | Gly | Arg | Pro | Tyr | Asp | Gly | Gly | Phe | Ala | 195 | 200 | 205 | |
| Cys | His | Phe | His | Pro | Asn | Ala | Pro | Ile | Tyr | Asn | Asp | Arg | Glu | Arg | Leu | 210 | 215 | 220 | |
| Gln | Ile | Tyr | Ile | Ser | Asp | Ala | Gly | Ile | Leu | Ala | Val | Cys | Tyr | Gly | Leu | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Phe | Arg | Tyr | Ala | Ala | Ala | Gln | Gly | Val | Ala | Ser | Met | Val | Cys | Phe | Tyr | 245 | 250 | 255 | |
| Gly | Val | Pro | Leu | Leu | Ile | Val | Asn | Gly | Leu | Leu | Val | Leu | Ile | Thr | Tyr | 260 | 265 | 270 | |

Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp
275 280 285

Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
290 295 300

Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
305 310 315 320

Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala
325 330 335

Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val
340 345 350

Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro
355 360 365

Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu
370 375 380

<210> 12
<211> 651
<212> ДНК
<213> Brassica napus

<400> 12
caagaatttg tcccacagta cacggatgct cagatacact gtccctctcc ccatgctcgc 60
ttaccctctc tatctggtaa atcctaattc ctaatttttc ttcttgatta taattacaat 120
tttgaatttt tagattttga gtattaacta aatataaatt aaatttgttt ggggatgact 180
acagtggtag agaagtcctg gtaaagaagg gtcacattat aaccataca gtagtttatt 240
tgccccaagc gagagaaagc ttattgcaac ttcaactact tgctggtcga tcgtggtggc 300
cactcttggt tatctatcat tcctcggttg tccagtcaca gttctaaaag tctatgggtg 360
tccttacatt gtaagtttca tatatttctt tattatatca ttgctaatat aatttggttt 420
tgacataaaa gttttggaaa aatttcagat ctttgtaatg tggttggacg ctgtcacgta 480
cttgcatcat catggtcacg atgataagct gccttggtac agaggcaagg taagtagatc 540
aacattattt ataagaagca ataatgatta gtagttgaat aatctgaatt tttgatgttt 600
ttgtacaata ataggaatgg agttattttac gtggaggatt aacaacagtt g 651

<210> 13
<211> 651
<212> ДНК

<213> Brassica napus

<400> 13

| | |
|---|-----|
| caagaatttg tcccacagta cacggatgct cagatacact gtcctctctc ccatgctcgc | 60 |
| ttacctctc tatctggtaa atcctaattc ctaatttttc ttcttgatta taattacaat | 120 |
| tttgaatttt tagattttga gtattaacta aatataaatt aaatttggtt ggggatgact | 180 |
| acagtggtag agaagtcctg gtaaagaagg gtcacattat aaccataca gtagtttatt | 240 |
| tgccccaagc gagagaaagc ttattgcaac ttcaactact tgctggtcga tcgtgttggc | 300 |
| cactcttggt tatctatcat tctcgttgg tccagtcaca gttctaaaag tctatgggtg | 360 |
| tccttacatt gtaagtttca tatatttctt tattatatca ttgctaatat aatttggttt | 420 |
| tgacataaaa gttttggaaa aatttcagat ctttgtaatg tggttggacg ctgtcacgta | 480 |
| cttgcacat catggtcacg atgataagct gccttggtac agaggcaaga taagtagatc | 540 |
| aacattattt ataagaagca ataatgatta gtagttgaat aatctgaatt tttgatgttt | 600 |
| ttgtacaata ataggaatgg agttatttac gtggaggatt aacaacagtt g | 651 |

<210> 14

<211> 23

<212> ДНК

<213> Brassica napus

<400> 14

| | |
|---------------------------|----|
| caagaatttg tcccacagta cac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 15

<211> 23

<212> ДНК

<213> Brassica napus

<400> 15

| | |
|---------------------------|----|
| ataaataatg ttgatctact tat | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 16

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Прямий праймер BNFD32-CF

<400> 16

| | |
|---------------------------|----|
| caagaatttg tcccacagta cac | 23 |
|---------------------------|----|

<210> 17

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>
 <223> Зворотний праймер BNFD32-CR

<400> 17
 caactgttgt taatcctcca cg 22

<210> 18
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Праймер

<400> 18
 tctccgacca aagctgttt 19

<210> 19
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Праймер

<400> 19
 aaggagctgg attcacatgg 20

<210> 20
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Праймер з універсальною послідовністю M13 на 5'-кінці

<400> 20
 caccagcttg taaaacgacg gccagtttct ccgaccaaag ctgttt 46

<210> 21
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> Праймер з 7 додатковими основами на 5'-кінці

<400> 21
 gttttcttaag gagctggatt cacatgg 27

<210> 22
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>

<223> Послідовність універсального праймера M13

<400> 22

cacgacgttg taaaacga

18

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб ідентифікації рослини, яка містить мутацію в гені, що робить внесок у фенотип низького вмісту ліноленової кислоти і у стійкість до захворювання килою хрестоцвітих у *Brassica napus*, що включає:
скринінг геномної ДНК з рослини на поліморфізм по одному нуклеотиду (SNP) в гені гена *fad3c*, де присутність SNP вказує на мутацію у вказаному гені, що робить внесок у вказаний фенотип
- 10 де SNP являє собою нуклеотид аденін у першому нуклеотиді 5'-сайта сплайсингу третього інтрона вказаного гена,
де геномна ДНК рослини додатково містить тимідин (Т) в гені *fad2* в положенні, що відповідає положенню 411 SEQ ID NO: 7; і
- 15 скринінг геномної ДНК з рослини на наявність маркера повтору короткої послідовності (SSR) BN1810, де маркер SSN BN1810 містить полінуклеотид, який ампліфікується в полімеразній ланцюговій реакції праймерами, що містять SEQ ID NO: 16 і SEQ ID NO: 17, відповідно, і має довжину 300 нуклеотидів.
- 20 2. Спосіб за п. 1, в якому скринінг геномної ДНК включає визначення присутності в геномній ДНК полінуклеотиду, який специфічно гібридується з комплементарною SEQ ID NO: 12 і не гібридується специфічно з комплементарною SEQ ID NO: 13.
3. Спосіб за п. 1, в якому скринінг геномної ДНК включає генерацію амплікону з геномної ДНК з використанням праймерів SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 16 в полімеразній ланцюговій реакції.
- 25 4. Спосіб за п. 1, в якому рослина являє собою рослину потомства, отриманого шляхом схрещування рослини *Brassica*, що включає SNP з рослиною *Brassica*, яка не включає мутацію.
5. Спосіб отримання генетично модифікованої рослини з фенотипом низького вмісту ліноленової кислоти і стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, що включає введення полінуклеотиду SEQ ID NO: 12 в геномну ДНК рослини шляхом генетичної трансформації,
де геномна ДНК рослини додатково містить тимідин (Т) в гені *fad2* в положенні, що відповідає положенню 411 SEQ ID NO: 7; і
- 30 де геномна ДНК рослини містить маркер повтору короткої послідовності (SSR) BN1810, де маркер SSN BN1810 містить полінуклеотид, який ампліфікується в полімеразній ланцюговій реакції праймерами, що містять SEQ ID NO: 16 і SEQ ID NO: 17, відповідно, і має довжину 300 нуклеотидів.
- 35 6. Рослина *Brassica* з фенотипом низького вмісту ліноленової кислоти і стійкістю до захворювання килою хрестоцвітих, де геномна ДНК рослини містить:
нуклеотид аденін (А) в першому нуклеотиді 5'-сайта сплайсингу третього інтрона гена *fad3c*, де рослина додатково містить тимідин (Т) в гені *fad2* в положенні, що відповідає положенню 411 SEQ ID NO: 7; і
- 40 маркер повтору короткої послідовності (SSR) BN1810, де маркер SSN BN1810 містить полінуклеотид, який ампліфікується в полімеразній ланцюговій реакції праймерами, що містять SEQ ID NO: 16 і SEQ ID NO: 17, відповідно, і має довжину 300 нуклеотидів

1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATCATAGCCTCC 50
|||||

1 CAATCCCTCGCTCTTTCTCCTACCTCATCTGGGACATCATCATAGCCTCC 50
.

51 TGCTTCTACTACGTCGCCACCACTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCCCTCT 100
|||||

51 TGCTTCTACTACGTCGCCACCACTTACTTCCCTCTCCTCCCTCACCCCTCT 100
.

101 CTCCTACTTCGCCTGGCCTCTCTACTGGGCCTGCCAGGGCTGCGTCCTAA 150
|||||

101 CTCCTACTTCGCCTGGCCTCTCTACTGGGCCTGCCAGGGCTGCGTCCTAA 150
.

151 CCGGCGTCTGGGTTCATAGCCCACGAGTGGGCCACCACGCCTTCAGCGAC 200
|||||

151 CCGGCGTCTGGGTTCATAGCCCACGAGTGGGCCACCACGCCTTCAGCGAC 200
.

201 TACCAGTGGCTGGACGACACCGTCGGCCTCATCTTCCACTCCTTCCTCCT 250
|||||

201 TACCAGTGGCTGGACGACACCGTCGGCCTCATCTTCCACTCCTTCCTCCT 250
.

251 CGTCCCTTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTCCAACA 300
|||||

251 CGTCCCTTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTCCAACA 300
.

301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTTTGTCCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350
|||||

301 CTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTTTGTCCCCAAGAAGAAGTCAGAC 350
.

351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCCTTTGGGACGCACCGTGAT 400
|||||

351 ATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAACAACCCTTTGGGACGCACCGTGAT 400
Прямий

401 GTTAACGGTTTAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGTAAGCTTCAACG 450
|||||

401 GTTAACGGTTTAGTTCACTCTCGGCTGGCCTTTGTAAGCTTCAACG 450
праймер ▼

451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCCACCCCAAC 500
|||||

451 TCTCGGGGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTTCCACCCCAAC 500
.

501 GCTCCCATCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550
|||||

501 GCTCCCATCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATATACATCTCCGACGC 550
.

551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTTACCGCTACGCTGCTGTCCAAG 600
|||||

551 TGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTCTTACCGCTACGCTGCTGTCCAAG 600

---- Continued

Fig. 1a

```

601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650
    |||
601 GAGTTGCCTCGATGGTCTGCTTCTACGGAGTTCCTCTTCTGATTGTCAAC 650
    .
651 GGGTTCTTAGTTTTTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700
    |||
651 GGGTTCTTAGTTTTTGATCACTTACTTGCAGCACACGCATCCTTCCCTGCC 700
    .
701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750
    |||
701 TCACTATGACTCGTCTGAGTGGGATTGGTTGAGGGGAGCTTTGGCCACCG 750
    .
751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
    |||
751 TTGACAGAGACTACGGAATCTTGAACAAGGTCTTCCACAATATCACGGAC 800
    Зворотний праймер
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATGCGAT 850
    |||
801 ACGCACGTGGCGCATCACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCATGCGAT 850
    .
851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACTGGGAGAGTATTATCAGTTTCG 900
    |||
851 GGAAGCTACGAAGGCGATAAAGCCGATACTGGGAGAGTATTATCAGTTTCG 900
    .
901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCCGAAGGAGTGTATC 950
    |||
901 ATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAGGCCGAAGGAGTGTATC 950
    .
951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985
    |||
951 TATGTGGAACCGGACAGGGAAGGTGACAAGAAAGG 985

```

Fig. 1b

| | | | | | |
|---------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | | | | 50 |
| DMS100 | ----- | ----- | ----- | ----- | -----IP |
| Quantum | ----- | ----- | ----- | ----- | -----IP |
| Bnfad2 | MGAGGRMQVS | PPSKKSETDT | IKRVPCETPP | FTVGELKKAI | PPHCFKRSIP |
| | 51 | | | | 100 |
| DMS100 | RSFSYLIWDI | IIASCFYYVA | TTYFPLLPH | LSYFAWPLYW | ACQGCVLTV |
| Quantum | RSFSYLIWDI | IIASCFYYVA | TTYFPLLPH | LSYFAWPLYW | ACQGCVLTV |
| Bnfad2 | RSFSYLIWDI | IIASCFYYVA | TTYFPLLPH | LSYFAWPLYW | ACQGCVLTV |
| | 101 | | | | 150 |
| DMS100 | WVIAHECGHH | AFSDYQWLDD | TVGLIFHSFL | LVPYFSWKYS | HRRHHSNTGS |
| Quantum | WVIAHECGHH | AFSDYQWLDD | TVGLIFHSFL | LVPYFSWKYS | HRRHHSNTGS |
| Bnfad2 | WVIAHECGHH | AFSDYQWLDD | TVGLIFHSFL | LVPYFSWKYS | HRRHHSNTGS |
| | 151 | | | | 200 |
| DMS100 | LERDEVFVPK | KKSDIKWYK | YLNPLGRTV | MLTV*----- | ----- |
| Quantum | LERDEVFVPK | KKSDIKWYK | YLNPLGRTV | MLTVQFTLW | PLYLAFNVSG |
| Bnfad2 | LERDEVFVPK | KKSDIKWYK | YLNPLGRTV | MLTVQFTLW | PLYLAFNVSG |
| | 201 | | | | 250 |
| DMS100 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Quantum | RPYDGGFACH | FHPNAPIYND | RERLQIYISD | AGILAVCYGL | YRYAAVQGV |
| Bnfad2 | RPYDGGFACH | FHPNAPIYND | RERLQIYISD | AGILAVCYGL | FRYAAAQGV |
| | 251 | | | | 300 |
| DMS100 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Quantum | SMVCFYGVPL | LIVNGFLVLI | TYLQHTHPSL | PHYDSSEWDW | LRGALATVDR |
| Bnfad2 | SMVCFYGVPL | LIVNGLLVLI | TYLQHTHPSL | PHYDSSEWDW | LRGALATVDR |
| | 301 | | | | 350 |
| DMS100 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Quantum | DYGILNKVFH | NITDTHVAHH | LFSTMPHYHA | MEATKAIKPI | LGEYYQFDGT |
| Bnfad2 | DYGILNKVFH | NITDTHVAHH | LFSTMPHYHA | MEATKAIKPI | LGEYYQFDGT |
| | 351 | | | 384 | |
| DMS100 | ----- | ----- | ----- | ----- | |
| Quantum | PVVKAMWREA | KECIYVEPDR | EGDKK----- | ---- | |
| Bnfad2 | PVVKAMWREA | KECIYVEPDR | QGEKKGVFWY | NNKL | |

Fig. 2

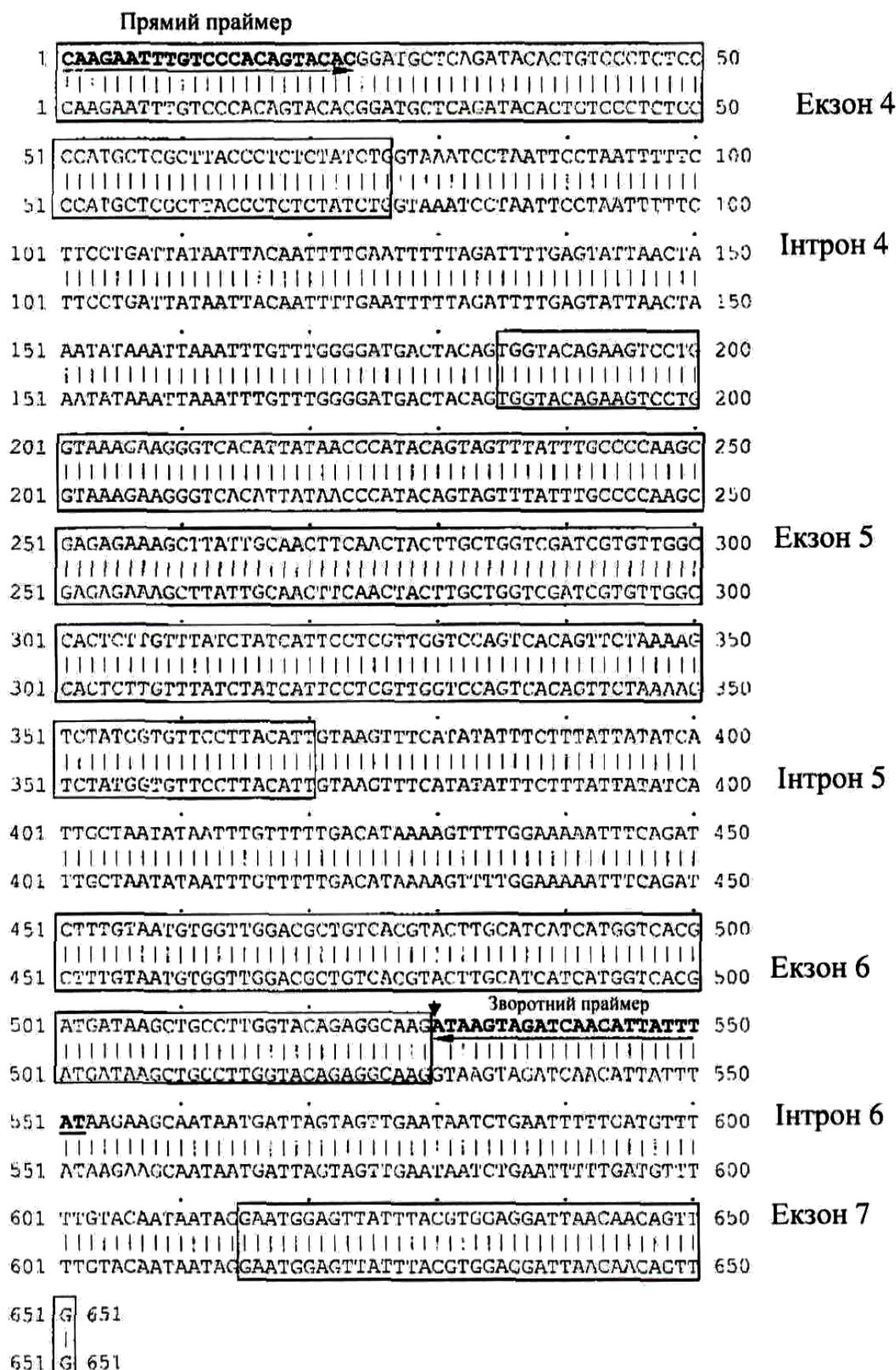


Fig. 3

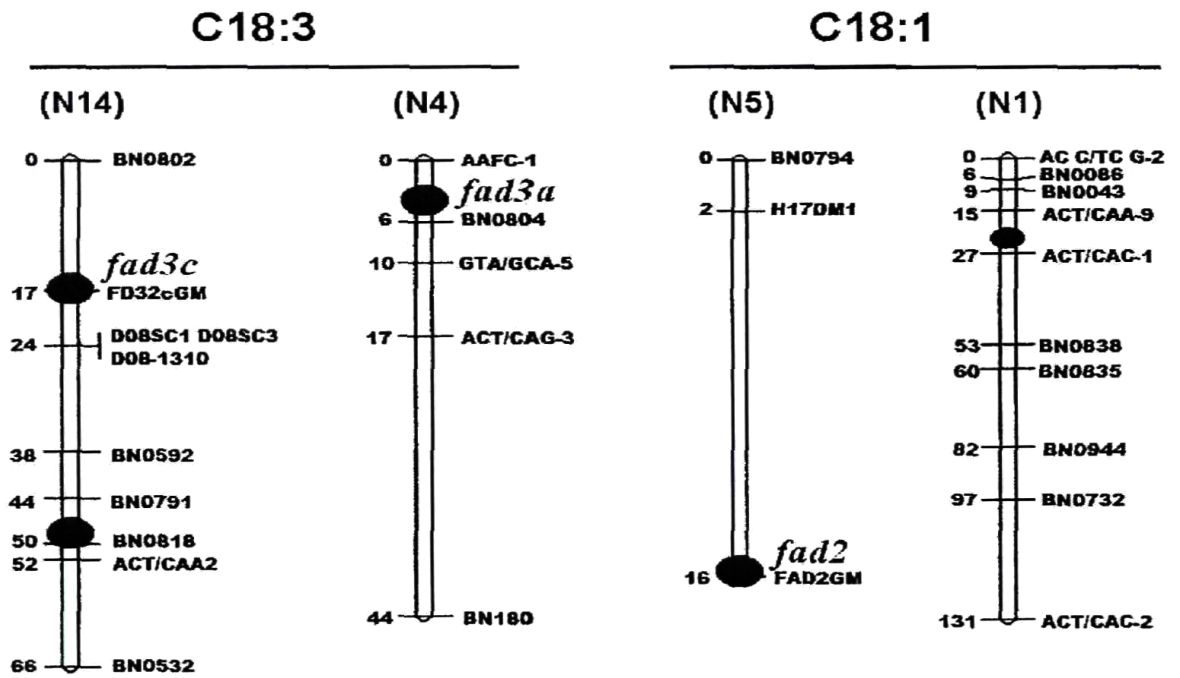
Таблиця 1

| Маркер | Ознака | No. тестованих ліній | | Середній вміст жирних кислот | | Т-критерій |
|---------|--------|----------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------|
| | | З маркером | Без маркера | З маркером | Без маркера | |
| FAD2GM | C18:1 | 85 | 98 | 75.67 | 64.23 | 15.49** |
| FAD3cGM | C18:3 | 74 | 99 | 2.81 | 5.42 | 13.13** |

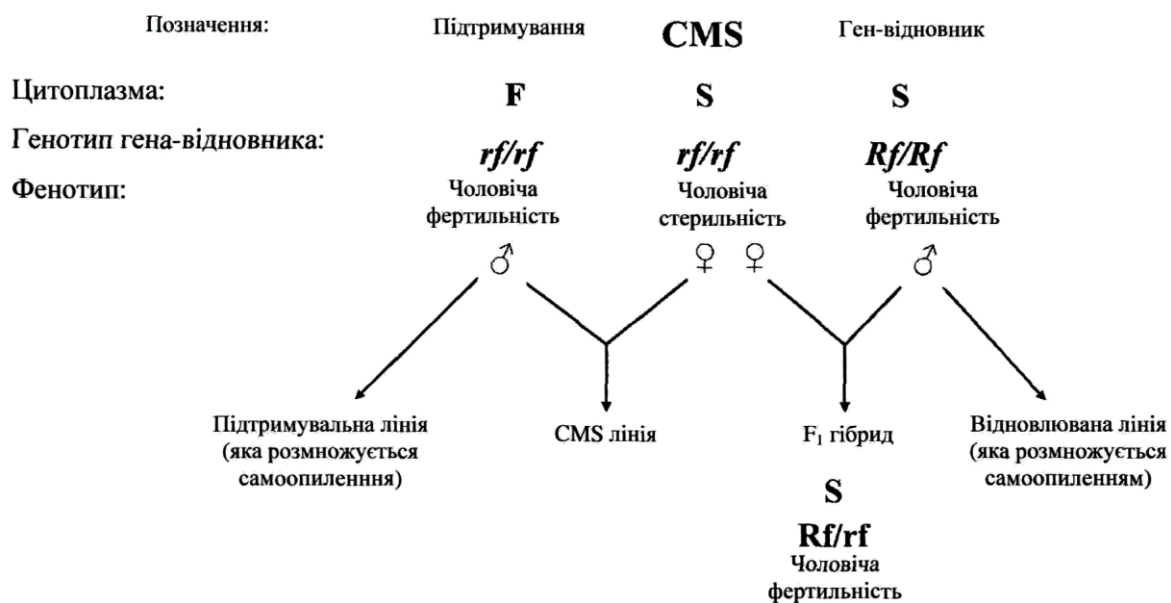
**значуще з $t = 0.01$.



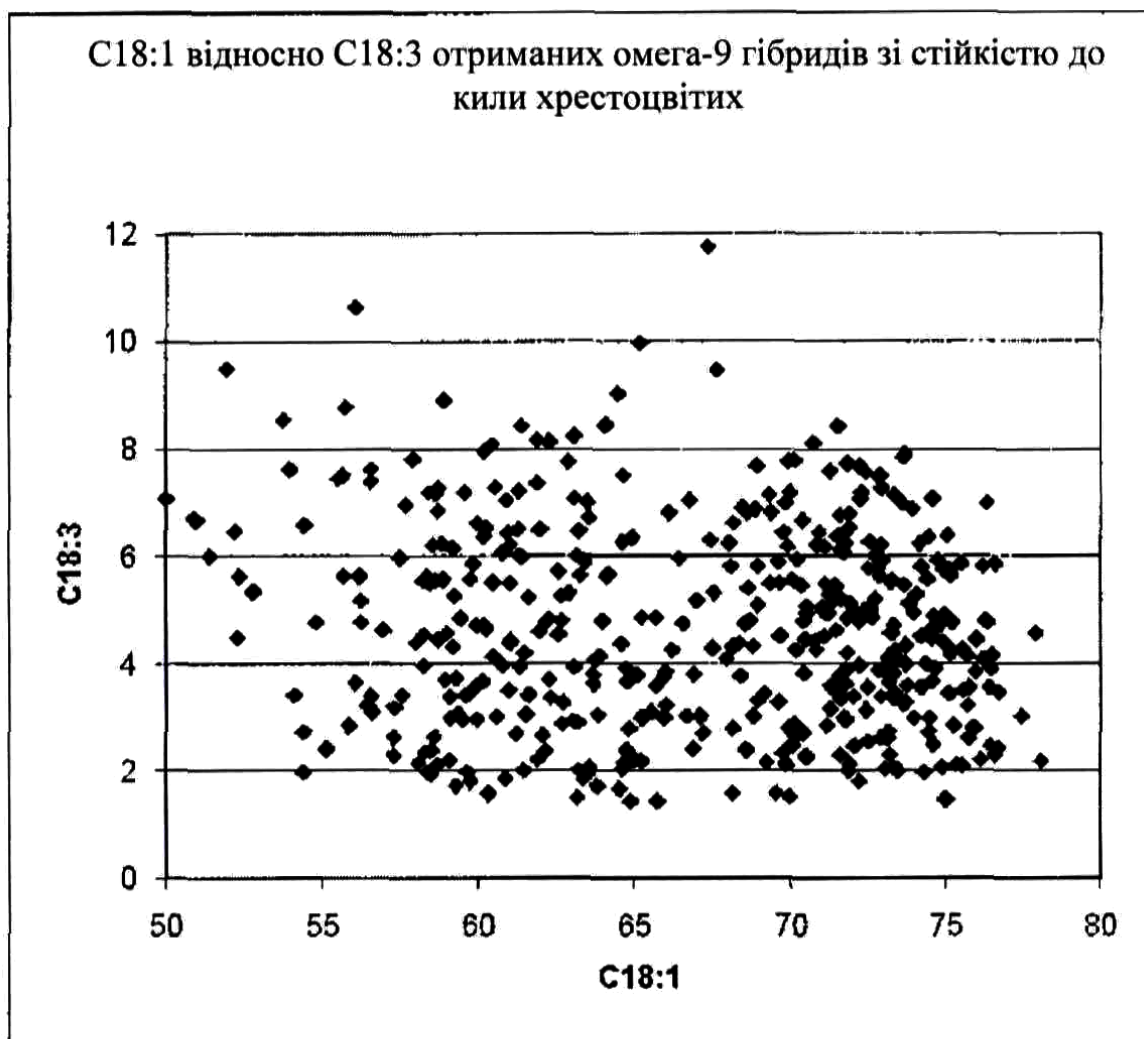
Фіг. 4



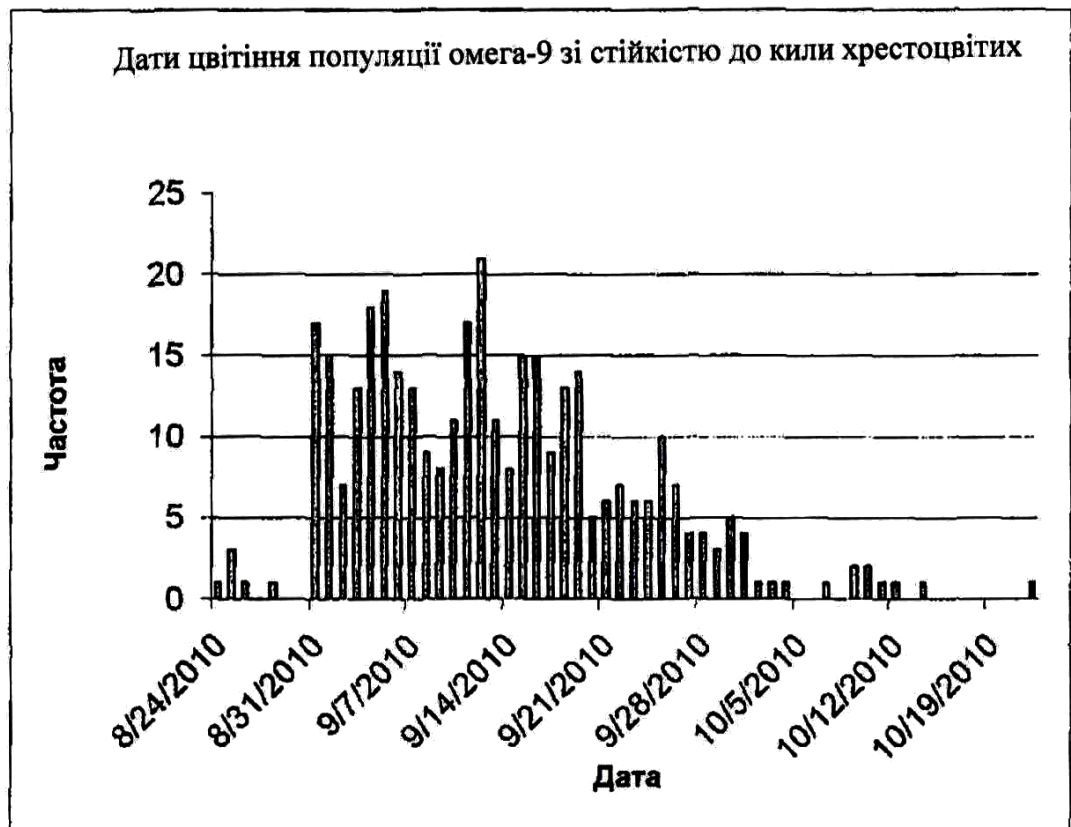
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9