

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201491956 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.04.30

(22) Дата подачи заявки
2013.04.24

(51) Int. Cl. *A01H 5/10* (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)

(54) МАСЛА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(31) 61/638,447; 2012903992

(32) 2012.04.25; 2012.09.11

(33) US; AU

(86) PCT/AU2013/000426

(87) WO 2013/159149 2013.10.31

(71) Заявитель:

КОММОНВЕЛТ САЙНТИФИК
ЭНД ИНДАСТРИЭЛ РИСЕРЧ
ОРГАНИЗЭЙШН; ГРЕЙНЗ
РИСЕРЧ ЭНД ДИВЕЛОПМЕНТ
КОРПОРЕЙШН (AU)

(72) Изобретатель:

Вуд Крейг Кристофер, Лю Цин,
Чжоу Сюэ-Жун, Грин Аллан, Сингх
Суриндер Пал, Као Шицзюан (AU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к экстрагированному липиду с высокими уровнями, например 90-95% в весовом отношении, олеиновой кислоты. Настоящим изобретением также обеспечиваются генетически модифицированные растения, в частности семена масличных растений, таких как сафлор, которые могут использоваться для продукции липида. Кроме того, обеспечиваются способы генотипирования и отбора растений, которые могут использоваться для продукции липида.

A1

201491956

201491956

A1

МАСЛА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к экстрагированному липиду с высокими уровнями, например, 90-95% в весовом отношении, олеиновой кислоты. Настоящим изобретением также обеспечиваются генетически модифицированные растения, в частности, семена масличных растений, таких как сафлор, которые могут использоваться для продукции липида. Кроме того, обеспечиваются способы генотипирования и отбора растений, которые могут использоваться для продукции липида.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Растительные масла являются важным источником жира, входящего в рацион людей, представляя приблизительно 25% калорийности потребляемой пищи в развивающихся странах (Broun et al., 1999). Мировое производство растительных масел составляет по крайней мере приблизительно 110 миллионов тонн в год, из которых 86% используются для потребления людьми. Почти все эти масла получают из масличных культур, таких как соя, канола, сафлор, подсолнечник, хлопчатник и арахис подземный, или выращиваемых на плантациях деревьев, таких как пальма, маслина европейская и кокосовая пальма (Gunstone, 2001; Oil World Annual, 2004). Возрастающее научное понимание и осознание обществом влияния отдельных, жирнокислотных компонентов пищевых жиров на различные аспекты здоровья людей служит причиной разработки модифицированных растительных масел, которые обладают увеличенной пищевой ценностью при сохранении необходимой функциональной возможности для применений в различных продуктах питания. Для этих модификаций необходимо знание метаболических путей для синтеза жирных кислот растений и генов, кодирующих ферменты для этих путей (Liu et al., 2002a; Thelen and Ohlrogge, 2002).

Немалое внимание уделяется влиянию различных жиров и масел в пище, в частности, влиянию составных частей жиров и масел на сердечнососудистое заболевание, рак и различные воспалительные состояния. Полагают, что высокие уровни холестерина и

насыщенных жирных кислот в рационе увеличивают риск развития болезни сердца, и это привело к рекомендации в отношении питания уменьшить потребление богатых холестерином, насыщенных животных жиров во имя не содержащих холестерин, ненасыщенных растительных масел (Liu et al., 2002a).

Хотя потребление с пищей холестерина, присутствующего в животных жирах, может значительно увеличивать уровни общего холестерина в крови, также было установлено, что жирные кислоты, которые составляют жиры и масла, могут сами оказывать значительные эффекты на уровни холестерина в сыворотке крови. Особый интерес представляет эффект жирных кислот в пище на формы холестерина в крови: нежелательный липопротеин низкой плотности (LDL) и желательный липопротеин высокой плотности (HDL). Вообще, насыщенные жирные кислоты, в частности, миристиновая кислота (14:0) и пальмитиновая кислота (16:0), основные насыщенные углеводороды, присутствующие в растительных маслах, обладают нежелательной способностью повышать уровни LDL-холестерина в сыворотке и, следовательно, увеличивать риск развития сердечнососудистого заболевания (Zock et al., 1994; Hu et al., 1997). Однако точно установлено, что стеариновая кислота (18:0), другой основной ненасыщенный углеводород, присутствующих в растительных маслах, не повышает LDL-холестерин и может в действительности понизить общий холестерин (Bonanome and Grundy, 1988; Dougherty et al., 1995). По этой причине, как правило, полагают, что стеариновая кислота является по крайней мере нейтральной, что касается риска развития сердечнососудистого заболевания (Tholstrup, et al., 1994). С другой стороны, ненасыщенные жирные кислоты, такие как мононенасыщенная олеиновая кислота (18:1), обладает целебной способностью понижать LDL-холестерин (Mensink and Katan, 1989; Roche and Gibney, 2000), тем самым уменьшая риск развития сердечнососудистого заболевания.

Богатое олеиновой кислотой масло также имеет множество промышленных применений, таких как, но без ограничения, смазочные материалы часто в форме сложных эфиров жирных кислот, биотопливо, исходные материалы для спиртов жирного ряда,

пластификаторы, воск, стеараты металлов, эмульгаторы, товары для личной гигиены, мыло и детергенты, поверхностно-активные вещества, фармацевтические средства, добавки для обработки металлов, исходные материалы для смягчителей тканей, чернила, прозрачное мыло, стабилизатор ПВХ, алкидные смолы и промежуточные продукты для многих других типов последующих oleохимических производных.

Маслоперерабатывающие предприятия и пищевые предприятия-изготовители традиционно опирались на гидрогенизацию для уменьшения уровня ненасыщенных жирных кислот в маслах, тем самым увеличивая их устойчивость к окислению при жарке, а также обеспечивая твердые жиры для применения в маргарине и для добавлений в тесто для рассыпчатости. Гидрогенизация представляет собой химический процесс, в ходе которого уменьшается степень ненасыщенности масел в результате превращения углерод-углеродных двойных связей в углерод-углеродные одинарные связи. Полная гидрогенизация дает полностью насыщенный жир. Однако процесс частичной гидрогенизации приводит к увеличению уровней и насыщенных жирных кислот, и мононенасыщенных жирных кислот. Некоторые из мононенасыщенных углеводородов, образуемых во время частичной гидрогенизации, находятся в форме трансизомера (такой как элаидиновая кислота, трансизомер олеиновой кислоты), а не во встречающейся в природе форме цис-изомера (Sebedio et al., 1994; Fernandez San Juan, 1995). В настоящее время известно, что в отличие от цис-ненасыщенных жирных кислот, трансжирные кислоты столь же эффективны, как и пальмитиновая кислота, в повышении уровней LDL-холестерина в сыворотке (Mensink and Katan, 1990; Noakes and Clifton, 1998) и понижении HDL-холестерина в сыворотке (Zock and Katan, 1992) и, таким образом, вносят вклад в увеличенный риск развития сердечнососудистого заболевания (Ascherio and Willett, 1997). В результате увеличения информированности об антипитательных эффектах трансжирных кислот, в настоящее время растет тенденция отказа от использования гидрогенизированного жира в пищевой промышленности в пользу жиров и масел, которые являются как

ценными в пищевом отношении, так и могут обеспечить необходимую функциональную возможность без гидрогенизации, в особенности тех, которые богаты или олеиновой кислотой, в случаях, когда требуется жидкие масла, или стеариновой кислотой, в случаях, когда предпочтительным является твердый или полутвердый жир.

Существуют потребность в дополнительных липидах и маслах с высоким содержанием олеиновой кислоты и их источниках.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения создали новые липидные композиции и способы их получения.

В первом аспекте настоящим изобретением обеспечивается липид, экстрагированный из масличного семени, при этом липид включает триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении липида составляет TAG,

iii) приблизительно 90% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 3,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота, и

v) липид характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,037, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,063.

В варианте осуществления липид имеет одну или более или все из следующих особенностей,

a) приблизительно 90% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,3% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота,

c) приблизительно 0,1% – приблизительно 3%, или приблизительно 2% – приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет линолевая кислота,

e) менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,5% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет α -линоленовая кислота (ALA),

f) приблизительно 0,5% – приблизительно 1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет 18:1 Δ 11,

g) ODP для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,033 – приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 – приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 – приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01,

h) значение PLO для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,020 – приблизительно 0,063, или приблизительно 0,020 – приблизительно 0,055, или приблизительно 0,020 – приблизительно 0,050, или приблизительно 0,050 – приблизительно 0,055, или приблизительно 0,063, или приблизительно 0,055, или приблизительно 0,050, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020,

i) приблизительно 90% – приблизительно 96%, или приблизительно 92% – приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют моновенасыщенные жирные кислоты,

j) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в моновенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 – приблизительно 0,02,

k) липид находится в форме очищенного масла, и

l) липид является негидрогенизированным.

В варианте осуществления,

1) приблизительно 91% – приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

2) менее чем приблизительно 2,75% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота,

3) менее чем приблизительно 3% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет линолевая кислота,

4) α -линоленовая кислота является необнаруживаемой в жирнокислотном составе липида,

5) ODP для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,033 – приблизительно 0,023, или приблизительно 0,033 – приблизительно 0,018,

6) значение PLO для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,020 – приблизительно 0,063,

7) приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют моновенасыщенные жирные кислоты, и

8) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в моновенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно

0,005 –приблизительно 0,02.

В дальнейшем варианте осуществления,

1) приблизительно 91% – приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

2) менее чем приблизительно 2,75% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота,

3) менее чем приблизительно 3% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет линолевая кислота,

4) α -линоленовая кислота является необнаруживаемой в жирнокислотном составе липида,

5) приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты, и

6) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 – приблизительно 0,02.

В варианте осуществления PUFA является линолевая кислота.

В варианте осуществления α -линоленовая кислота является необнаруживаемой в жирнокислотном составе липида.

В дальнейшем варианте осуществления приблизительно 55% – приблизительно 80%, или приблизительно 60% – приблизительно 80%, или приблизительно 70% – приблизительно 80%, или по крайней мере приблизительно 60%, или по крайней мере приблизительно 70%, или приблизительно 60%, или приблизительно 70%, или приблизительно 80% от содержания TAG в липиде составляет триолеин.

В другом варианте осуществления менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 2%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 5% от содержания олеиновой кислоты в липиде находится в форме диацилглицеринов (DAG).

В дальнейшем варианте осуществления липид находится в форме масла, причем по крайней мере 90%, или по крайней мере 95%, по крайней мере приблизительно 98%, или приблизительно 95% – приблизительно 98% в весовом отношении масла составляет липид.

В предпочтительном варианте осуществления масличным семенем является нефотосинтезирующее масличное семя. Примеры нефотосинтезирующего масличного семени включают, но без обязательного ограничения, семя сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клещевины обыкновенной. В предпочтительном варианте осуществления нефотосинтезирующим семенем масличного растения является семя сафлора.

В варианте осуществления липид, кроме того, включает один или более стеролов.

В дальнейшем варианте осуществления липид находится в форме масла, и этот липид включает менее чем приблизительно 5 мг стеролов/г масла, или приблизительно 1,5 мг стеролов/г масла – приблизительно 5 мг стеролов/г масла.

В варианте осуществления липид включает одно или более или все из

а) приблизительно 1,5% – приблизительно 4,5%, или приблизительно 2,3% – приблизительно 4,5% от общего содержания стеролов составляет эргост-7-ен-3 β -ол,

б) приблизительно 0,5% – приблизительно 3%, или приблизительно 1,5% – приблизительно 3% от общего содержания стеролов составляет от общего содержания стеролов составляет тритерпеновый спирт,

с) приблизительно 8,9% – приблизительно 20% от общего содержания стеролов составляет Δ 7-стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 β -ол, и

д) приблизительно 1,7% – приблизительно 6,1% от общего содержания стеролов составляет Δ 7-авенастерол.

В дальнейшем варианте осуществления липид имеет объем, составляющий по крайней мере 1 литр, и/или вес, составляющий по крайней мере 1 кг, и/или этот липид экстрагирован из масличного

семени, полученного от выращенных в поле растений.

В варианте осуществления липид экстрагирован из масличного семени посредством раздавливания и включает менее чем приблизительно 7% воды в весовом отношении. В другом варианте осуществления липид является очищенным липидом (экстрагированным растворителем и рафинированным) и включает менее чем приблизительно 0,1%, или менее чем приблизительно 0,05% воды, в весовом отношении.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается композиция, включающая первый компонент, который является липидом настоящего изобретения, и второй компонент, предпочтительно в случаях, когда композиция получена посредством смешивания липида со вторым компонентом.

Как будет понятно квалифицированному специалисту, второй компонент можно выбрать из широкого ряда различных соединений/композиций. В одном примере вторым компонентом является не являющееся липидом вещество, такое как фермент, небелковый (неферментный) катализатор или химическое вещество (например, гидроксид натрия, метанол или металл), или один или более ингредиентов пищи.

Настоящим изобретением также обеспечивается способ получения масла, включающий

i) получение масличного семени, которое включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует масличное семя, которое включает, масло, причем содержащим в виде масла масличного семени является определенный здесь липид, и

ii) экстрагирование масла из масличного семени для того, чтобы получить масло.

В предпочтительном варианте осуществления масличное семя включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся масличном семени по сравнению с соответствующим масличным семенем, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем полинуклеотид функционально связан с промотором, который

управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ получения масла, включающий

i) получение семени сафлора, содержащее в виде масла которого включает, и/или которое способно породить растение, которое образует масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

a) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

b) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности семени составляет TAG,

c) приблизительно 75% – приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

d) менее чем приблизительно 5,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота, и

e) содержащее в виде масла семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,17, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,26, и

ii) экстрагирование масла из семени сафлора для того, чтобы получить масло,

причем семя сафлора включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся семени сафлора по сравнению с соответствующим семенем сафлора, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся семени сафлора.

В другом варианте осуществления масличное семя или семя

сафлора включает второй экзогенный полинуклеотид, который кодирует вторую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пальмитоил-АСР-тиоэстеразы (FATB) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует второй экзогенный полинуклеотид, и причем второй экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

В другом варианте осуществления масличное семя или семя сафлора включает третий экзогенный полинуклеотид, который кодирует третью вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пластидной десатуразы ω6 жирных кислот (FAD6) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует третий экзогенный полинуклеотид, и причем третий экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

В варианте осуществления

1) ген FAD2 представляет собой один или более или каждый из гена CtFAD2-1, гена CtFAD2-2 и гена CtFAD2-10, предпочтительно гена CtFAD2-1 и/или гена CtFAD2-2, и/или

2) ген FATB представляет собой ген CtFATB-3, и/или

3) ген FAD6 представляет собой ген CtFAD6.

В варианте осуществления содержимое в виде масла семени сафлора имеет одну или более или все из следующих особенностей,

а) приблизительно 80% – приблизительно 94%, или приблизительно 85% – приблизительно 94%, или приблизительно 90% – приблизительно 94%, или приблизительно 91% – приблизительно 94%, или приблизительно 91% – приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота,

c) приблизительно 0,1% - приблизительно 15%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 10%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 7,5%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 5%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 3%, или приблизительно 2% - приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляют полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет линолевая кислота (LA),

e) приблизительно 80% - приблизительно 96%, или приблизительно 90% - приблизительно 96%, или приблизительно 92% - приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты,

f) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,05, или менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,05, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,02,

g) ODP для содержимого в виде масла семени составляет приблизительно 0,17 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,15 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,1 -

приблизительно 0,01, или приблизительно 0,075 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,050 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01, и

h) значение PLO для содержащего в виде масла семени составляет приблизительно 0,20 - приблизительно 0,026, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,2, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,15, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,1, или приблизительно 0,020 и приблизительно 0,075, или приблизительно 0,050 и приблизительно 0,055, или составляет приблизительно 0,05, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020.

В варианте осуществления стадия экстракции масла включает раздавливание масличного семени или семени сафлора.

Тем не менее, в другом варианте осуществления способ, кроме того, включает стадию очистки масла, экстрагированного из масличного семени или семени сафлора, причем стадия очистки включает одно или более или все из группы, состоящей из: рафинирования гидратацией, дезодорации, обесцвечивания, сушки и/или фракционирования экстрагированного масла, и/или удаления по крайней мере некоторых, предпочтительно по существу всех, восков и/или восковых эфиров из экстрагированного масла.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности масличного семени составляет TAG,

iii) приблизительно 90% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержащем в

виде масла масличного семени составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 3,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла масличного семени составляет пальмитиновая кислота, и

v) содержимое в виде масла масличного семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,037, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,063.

В варианте осуществления масличным семенем является нефотосинтезирующее масличное семя, предпочтительно семя сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клеверины обыкновенной.

В другом варианте осуществления масличное семя включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся масличном семени по сравнению с соответствующим масличным семенем, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем первый экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени.

Тем не менее, в другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается семя сафлора, содержимое в виде масла которого включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует семя, содержимое в виде масла которого включает, триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности семени составляет TAG,

iii) приблизительно 75% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 5,1% в весовом отношении от

общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота, и

v) содержимое в виде масла семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,17, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,26, и

причем семя сафлора включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся семени сафлора по сравнению с соответствующим семенем сафлора, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем первый экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся семени сафлора.

В варианте осуществления содержимое в виде масла семени сафлора имеет одну или более из следующих особенностей,

a) приблизительно 80% - приблизительно 94%, или приблизительно 85% - приблизительно 94%, или приблизительно 90% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота,

c) приблизительно 0,1% - приблизительно 15%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 10%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 7,5%, или приблизительно 0,1% -

приблизительно 5%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 3%, или приблизительно 2% - приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляют полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет линолевая кислота (LA),

e) приблизительно 80% - приблизительно 96%, или приблизительно 90% - приблизительно 96%, или приблизительно 92% - приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты,

f) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,05, или менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,05, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,02,

g) ODP для содержимого в виде масла семени составляет приблизительно 0,17 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,15 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,1 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,075 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,050 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01, и

h) значение PLO для содержимого в виде масла семени составляет приблизительно 0,20 - приблизительно 0,026, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,2, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,15, или приблизительно 0,020 -

приблизительно 0,1, или приблизительно 0,020 и приблизительно 0,075, или приблизительно 0,050 и приблизительно 0,055, или составляет приблизительно 0,05, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020.

В дальнейшем варианте осуществления содержащим в виде масла масличного семени или семени сафлора является липид, который, кроме того, характеризуется одной или более вышеупомянутых особенностей.

В другом варианте осуществления масличное семя или семя сафлора включает второй экзогенный полинуклеотид, который кодирует вторую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пальмитоил-АСР-тиоэстеразы (FATB) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует второй экзогенный полинуклеотид, и причем второй экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

В дальнейшем варианте осуществления масличное семя или семя сафлора включает третий экзогенный полинуклеотид, который способен уменьшить экспрессию гена пластидной десатуразы ω6 жирных кислот (FAD6) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует третий экзогенный полинуклеотид, и причем третий экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

В другом варианте осуществления первая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию более чем одного эндогенного гена, кодирующего FAD2, в развивающемся масличном семени или семени сафлора, и/или причем вторая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию более чем одного эндогенного гена, кодирующего FATB, в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

Тем не менее, в дальнейшем варианте осуществления первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида ковалентно соединены в одной молекуле ДНК, необязательно с помощью связывающих последовательностей ДНК между первым, вторым и/или третьим экзогенными полинуклеотидами.

В другом варианте осуществления первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида находятся под контролем одного промотора, так что, когда первый экзогенный полинуклеотид и второй экзогенный полинуклеотид и/или третий экзогенный полинуклеотид транскрибируются в развивающемся масличном семени или семени сафлора, первая вызывающая генный сайленсинг РНК и вторая вызывающая генный сайленсинг РНК и/или третья вызывающая генный сайленсинг РНК ковалентно связаны в виде частей одного РНК-транскрипта.

В другом варианте осуществления масличное семя или семя сафлора включает одну транспортную (перенесенную) ДНК, интегрированную в геном масличного семени или семени сафлора, и причем одна транспортная ДНК включает первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида.

Предпочтительно масличное семя или семя сафлора является гомозиготным по транспортной ДНК.

В варианте осуществления каждую из первой вызывающей генный сайленсинг РНК, второй вызывающей генный сайленсинг РНК и третьей вызывающей генный сайленсинг РНК независимо выбирают из группы, состоящей из антисмыслового полинуклеотида, смыслового полинуклеотида, каталитического полинуклеотида, микроРНК и двухцепочечной РНК.

В дальнейшем варианте осуществления любой один или более, предпочтительно все, из промоторов являются специфическими для семени и предпочтительно преимущественно экспрессируются в зародыше развивающегося масличного семени или семени сафлора.

В другом варианте осуществления масличное семя или семя

сафлора включает одну или более мутаций в одном или более генов FAD2, причем мутация(и) уменьшает активность одного или более генов FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует мутация(и).

В другом варианте осуществления масличное семя или семя сафлора включает, по сравнению с геном FAD2 дикого типа в соответствующем масличном семени или семени сафлора, мутацию в гене FAD2, которая представляет собой делецию, вставку, инверсию, сдвиг рамки считывания, стоп-кодон преждевременной трансляции или одну или более неконсервативных аминокислотных замен.

В дальнейшем варианте осуществления мутацией является нуль-мутация в гене FAD2.

В другом варианте осуществления по крайней мере одна из мутаций находится в гене FAD2, который кодирует большую степень активности FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора, в котором отсутствует мутация(и), чем любой другой ген FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

В другом варианте осуществления семенем является семя сафлора, и геном FAD2 является ген CtFAD2-1. В этом варианте осуществления также предпочтительно, когда первая вызывающая генный сайленсинг РНК по крайней мере способна уменьшить экспрессию гена CtFAD2-2.

В другом варианте осуществления семенем является семя сафлора, включающее аллель ol гена CtFAD2-1 или аллель ol1 гена CtFAD2-1, или оба аллеля. В варианте осуществления аллель ol или аллель ol1 гена CtFAD2-1 присутствует в гомозиготном состоянии.

В другом варианте осуществления белок FAD2 является необнаруживаемым в масличном семени или семени сафлора.

В другом варианте осуществления семенем является семя сафлора, и первая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию обоих генов CtFAD2-1 и CtFAD2-2.

В другом варианте осуществления семенем является семя сафлора, в котором

1) геном FAD2 является один или более из гена CtFAD2-1, гена CtFAD2-2 и гена CtFAD2-10, предпочтительно гена CtFAD2-1 и/или гена CtFAD2-2, и/или

2) геном FATB является ген CtFATB-3, и/или

3) геном FAD6 является ген CtFAD6.

Также обеспечивается масличное растение или растение сафлор, способное образовывать семя настоящего изобретения.

В варианте осуществления растение является трансгенным и гомозиготным по каждому экзогенному полинуклеотиду и/или включает первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида или третьего экзогенного полинуклеотида.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается в значительной степени очищенный и/или рекомбинатный полипептид, который включает аминокислоты с последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 27-37, 44, 45 или 48, его биологически активный фрагмент или аминокислотная последовательность, идентичная на по крайней мере 40% любой одной или более из SEQ ID NO: 27-37, 44, 45 или 48.

В варианте осуществления полипептидом является модифицирующий жирные кислоты фермент, предпочтительно олеат- $\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 12$ -ацетиленаз, пальмитолеат- $\Delta 12$ -десатураза или пальмитоил--АСР-тиоэстераза (FATB).

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается выделенный и/или экзогенный полинуклеотид, включающий одно или более из

i) нуклеотидов, имеющих последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46 или 47,

ii) нуклеотидов, имеющих последовательность, кодирующую полипептид настоящего изобретения,

iii) нуклеотидов, которые гибридизуются с последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46 или 47, и

iv) нуклеотидов, имеющих такую последовательность, что после экспрессии в семени масличного растения уменьшается

экспрессия гена, кодирующего по крайней мере один полипептид настоящего изобретения.

В особенно предпочтительном варианте осуществления полинуклеотид включает нуклеотиды, имеющие такую последовательность, что после экспрессии в семени масличного растения уменьшается экспрессия гена, кодирующего по крайней мере один полипептид настоящего изобретения.

В варианте осуществления полинуклеотид элемента iv) включает последовательность нуклеотидов, представленную в любой из SEQ ID NO: 49-51 (в случаях, когда тимин (Т) заменяется урацилом (U)).

В варианте осуществления полинуклеотид элемента iv) выбирают из антисмыслового полинуклеотида, смыслового полинуклеотида, каталитического полинуклеотида, микроРНК, молекулы двухцепочечной РНК (дцРНК) и ее подвергнутого процессингу РНК-продукта.

В дальнейшем варианте осуществления полинуклеотидом является молекула дцРНК или ее подвергнутый процессингу РНК-продукт, включающий по крайней мере 19 следующих друг за другом нуклеотидов, которые идентичны на по крайней мере 95% комплементу любой одной или более из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46, 47 или 49-51 (в случаях, когда тимин (Т) заменяется урацилом (U)).

В другом варианте осуществления молекула дцРНК является предшественником микроРНК, и/или причем ее подвергнутым процессингу РНК-продуктом является микроРНК.

Тем не менее, в дальнейшем варианте осуществления полинуклеотид транскрибируется в развивающемся масличном семени или семени сафлора под контролем одного промотора, причем молекула дцРНК включает комплементарные смысловую и антисмысловую последовательности, которые способны гибридизоваться друг с другом, связанные с помощью одноцепочечного участка РНК.

Тем не менее, в дальнейшем варианте осуществления полинуклеотид, в случае присутствия в развивающемся семени сафлора,

i) уменьшает экспрессию эндогенного гена, кодирующего олеат- $\Delta 12$ -десатуразу (FAD2), в развивающемся семени, при этом FAD2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой одной или более из SEQ ID NO: 27, 28 или 36, предпочтительно по крайней мере одной или обеих из SEQ ID NO: 27 и 28;

ii) уменьшает экспрессию эндогенного гена, кодирующего пальмитоил-АСР-тиоэстеразу (FATB), в развивающемся семени, при этом FATB имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; и/или

iii) уменьшает экспрессию гена, кодирующего десатуразу $\omega 6$ жирных кислот (FAD6), в развивающемся семени, при этом FAD6 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

Также обеспечивается химерный вектор, включающий полинуклеотид настоящего изобретения, функционально связанный с промотором.

В варианте осуществления промотор является функционирующим в масличном семени или является специфическим для семени промотором, предпочтительно является преимущественно экспрессируемым в зародыше развивающегося масличного семени.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается рекомбинантная клетка, включающая экзогенный полинуклеотид настоящего изобретения и/или вектор настоящего изобретения.

Клеткой может быть клетка любого типа, например, но без ограничения, бактериальная клетка, дрожжевая клетка или клетка растения.

Предпочтительно, клеткой является клетка растения, предпочтительно клетка семени растения. Более предпочтительно клеткой растения является клетка масличного растения. Даже более предпочтительно клеткой растения является клетка нефотосинтезирующего семени, предпочтительно клетка семени сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клещевины обыкновенной.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается трансгенный не являющийся человеком организм, включающий один

или более полинуклеотидов настоящего изобретения, вектор настоящего изобретения и клетку настоящего изобретения.

Предпочтительно трансгенным не являющимся человеком организмом является растение, более предпочтительно масличное растение.

Тем не менее, в другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ создания клетки настоящего изобретения, включающий стадию введения полинуклеотида настоящего изобретения и/или вектора настоящего изобретения в клетку.

Также обеспечивается применение полинуклеотида настоящего изобретения и/или вектора настоящего изобретения для создания рекомбинантной клетки.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ создания трансгенного масличного растения, которое образует семя настоящего изобретения, или его семени, при этом способ включает

i) введение по крайней мере одного полинуклеотида настоящего изобретения и/или по крайней мере одного вектора настоящего изобретения в клетку масличного растения,

ii) регенерацию трансгенного растения из клетки, и

iii) необязательно, получение одного или более растений-потомков трансгенного растения или их семени,

тем самым создавая трансгенное масличное растение или его семя.

В варианте осуществления семенем является семя сафлора настоящего изобретения.

В дальнейшем варианте осуществления одно или более растений-потомков или его семя включает

i) первый экзогенный полинуклеотид, и/или

ii) второй экзогенный полинуклеотид, и/или

iii) третий экзогенный полинуклеотид,

предпочтительно все три экзогенных полинуклеотида.

В дальнейшем варианте осуществления одно или более растений-потомков или его семя включает одну или более мутаций, определенных выше.

Тем не менее, в дополнительном аспекте настоящим

изобретением обеспечивается способ создания масличного растения, включающий

i) скрещивание первого родительского масличного растения, которое включает первый полинуклеотид настоящего изобретения, или первый вектор настоящего изобретения, со вторым родительским масличным растением, которое включает второй полинуклеотид настоящего изобретения или второй вектор настоящего изобретения,

ii) скрининг растений-потомков, образующихся в результате скрещивания, на присутствие обоих полинуклеотидов или обоих векторов; и

iii) отбор растения-потомка, включающего как (a) первый полинуклеотид или первый вектор, так и (b) второй полинуклеотид или второй вектор, и, кроме того, характеризующегося увеличенной долей олеиновой кислотой и уменьшенной долей пальмитиновой кислоты в составе масла из семени растения.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ генотипирования растения сафлора, включающий детектирования молекулы нуклеиновой кислоты растения, причем молекула нуклеиновой кислоты сцеплена с, и/или включает крайней мере часть, одним (одного) или более генов CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10, предпочтительно по крайней мере одним или обоими из генов CtFAD2-1 и CtFAD2-2, или по крайней мере геном CtFAD2-1, растения сафлора.

В варианте осуществления способ включает определение уровня экспрессии и/или последовательности одного или более из генов CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10 растения.

В варианте осуществления способ включает:

i) гибридизацию второй молекулы нуклеиновой кислоты с указанной молекулой нуклеиновой кислоты растения,

ii) необязательно, гибридизацию по крайней мере одной другой молекулы нуклеиновой кислоты с указанной молекулой нуклеиновой кислоты растения; и

iii) детектирование продукта указанной стадии (й) гибридизации или отсутствие продукта в результате указанной стадии (й) гибридизации.

Тем не менее, в дальнейшем варианте осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты используется в качестве праймера для обратной транскрипции или репликации по крайней мере части молекулы нуклеиновой кислоты растения.

Нуклеиновую кислоту можно детектировать, используя ряд хорошо известных методов, таких как, но без ограничения, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов, амплификация микросателлитных локусов, секвенирование нуклеиновой кислоты и/или амплификация нуклеиновой кислоты.

В варианте осуществления способ детектирует отсутствие или присутствие аллеля гена CtFAD2-1, предпочтительно аллеля ol.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ отбора растения сафлора из популяции растений, включающий:

i) генотипирование указанной популяции растений, используя способ настоящего изобретения, причем указанная популяция растений была получена в результате скрещивания между двумя растениями, по крайней мере одно из которых включает аллель гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10, предпочтительно по крайней мере одного или обоих из генов CtFAD2-1 и CtFAD2-2, или по крайней мере гена CtFAD2-1, который наделяет развивающееся семя указанного растения уменьшенным уровнем активности $\Delta 12$ -десатуразы, по сравнению с соответствующим семенем растения сафлора, в котором отсутствует указанный аллель, и

ii) отбор растения сафлора на основе присутствия или отсутствия указанного аллеля.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ введения аллеля гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10 в растение сафлор, в котором отсутствует этот аллель, при этом способ включает;

i) скрещивание первого родительского растения сафлора со вторым родительским растением сафлором, причем второе растение включает указанный аллель гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10, и

ii) возвратное скрещивание потомка, полученного в результате скрещивания стадии i), с растениями с тем же генотипом, что и первое родительское растение, достаточное число раз для получения растения с преобладанием генотипа первого растения, но включающего указанный аллель,

причем аллель наделяет развивающееся семя указанного растения уменьшенным уровнем активности $\Delta 12$ -десатуразы, по сравнению с соответствующим семенем растения сафлора, в котором отсутствует указанный аллель, и причем растения-потомков генотипируют на присутствие или отсутствие указанного аллеля, используя способ настоящего изобретения.

Также обеспечивается трансгенное растение, или растения - его потомки, или его семя, созданное, используя способ настоящего изобретения.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ производства семени, включающий

a) выращивание растения настоящего изобретения, предпочтительно в поле в виде части популяции по крайней мере 1000 таких растений и

b) сбор урожая семян.

Тем не менее, в дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается масло, полученное или получаемое с помощью одного или более способов настоящего изобретения, из масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, из растения или его части настоящего изобретения, из клетки настоящего изобретения и/или из не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается композиция, включающая одно или более из липида настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, полипептида настоящего изобретения, полинуклеотида настоящего изобретения, вектора настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения или масла настоящего изобретения и один или более приемлемых носителей.

Также обеспечивается применение одного или более из липида

настоящего изобретения, композиции настоящего изобретения, способа настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения для производства промышленного продукта.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ производства промышленного продукта, включающий стадии:

i) получения одного или более из липида настоящего изобретения, композиции настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения,

ii) необязательно, физической обработки одного или более из липида настоящего изобретения, композиции настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения, стадии i),

ii) превращения по крайней мере некоторой части липида настоящего изобретения, или липида в одном или более из композиции настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или части растения настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения, или подвергнутого физической обработке продукта стадии ii), в промышленный продукт посредством использования нагревания, химического или ферментативного способа, или любой их комбинации, в отношении липида, и

iii) получения промышленного продукта,

тем самым осуществляя производство промышленного продукта.

Тем не менее, в дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ производства топлива, включающий

i) осуществление реакции одного или более из липида настоящего изобретения, или липида в одном или более из композиции настоящего изобретения, масличном семени или семени сафлора настоящего изобретения, растении или части растения настоящего изобретения, клетке-хозяине настоящего изобретения, не являющемся человеком трансгенном организме или его части настоящего изобретения, или масле настоящего изобретения, со спиртом, необязательно в присутствии катализатора, для образования алкиловых эфиров, и

ii) необязательно, смешивание алкиловых эфиров с топливом на нефтяной основе.

В варианте осуществления алкиловыми эфирами являются метиловые эфиры.

В дальнейшем аспекте настоящим изобретением обеспечивается способ производства продукта питания, включающий смешивание одного или более из липида настоящего изобретения, композиции настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения, с по крайней мере одним другим пищевым ингредиентом.

Также обеспечиваются продукты питания, косметические средства или химические продукты, включающие одно или более из липида настоящего изобретения, композиции настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина в соответствии с настоящим изобретением, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения.

Тем не менее, в дальнейшем аспекте обеспечивается продукт, полученный из одного или более, или используя одно или более, из липида настоящего изобретения, липида в одном или более из

композиции настоящего изобретения, способа настоящего изобретения, масличного семени или семени сафлора настоящего изобретения, растения или его части настоящего изобретения, клетки-хозяина настоящего изобретения, не являющегося человеком трансгенного организма или его части настоящего изобретения, или масла настоящего изобретения.

Предполагается, что любой вариант осуществления здесь применим с необходимыми изменениями к любому другому варианту осуществления, кроме особо оговоренных случаев.

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными здесь, которые предназначены лишь для иллюстрации. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы, несомненно, находятся в объеме настоящего изобретения, описанного здесь.

На всем протяжении этого описания, кроме особо оговоренных случаев или, если контекст не подразумевает иное, ссылка на одну стадию, композицию, являющуюся объектом изобретения, группу стадий или группу композиций, являющихся объектами изобретения, как предполагается, охватывает одну или множество (т.е. одну или более) этих стадий, композиций, являющихся объектами изобретения, групп стадий или групп композиций, являющихся объектами изобретения.

Ниже настоящее изобретение описывается через следующие неограничивающие примеры и со ссылкой на сопроводительные фигуры.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СОПРОВОДИТЕЛЬНЫХ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1. Филогенетическое сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых семейством FAD2-подобных генов сафлора, и дивергентных FAD2-подобных ферментов из других растений. Представленное филогенетическое древо было построено, используя Vector NTI (Invitrogen). Включенными в процесс совмещения были десатуразы FAD2 (DES), гидролазы (OH), эпоксигеназы (EPOX), ацетиленазы (ACET) и конъюгазы (CONJ). Идентификационными номерами в GeneBank аминокислотных последовательностей, представленных на филогенетическом древе, являются: coCONJ, AAK26632.1; saACET, ABC00769.1; srEPOX,

CAA76156.1; haACET, ABC59684.1; dsACET, AAO38036.1; dcACET, AAO38033.1; hhACET, AAO38031.1; haDES-2, AAL68982.1; haDES-3, AAL68983.1; luDES, ACF49507; haDES-1, AAL68982.1; ntDES, AAT72296.2; oeDES, AAW63040; siDES, AAF80560.1; ghDES-1, CAA65744.1; rcOH, AAC49010.1; atDES, AAM61113.1; pfOH:DES, AAC32755.1; plOH, ABQ01458.1; ghDES-4, AAQ16653.1; ghDES-2, CAA71199.1. (co, *Calendula officinalis*; ca, *Crepis alpine*; cp, *Crepis palaestina*; ha, *Helianthus annum*; ds, *Dimorphotheca sinuate*; dc, *Daucus carota*; hh, *Hedera helix*; lu, *Linum usitatissimum*; nt, *Nicotiana tabacum*; oe, *Olea europaea*; si, *Sesamum indicum*; rc, *Ricinus communis*; at, *Arabidopsis thaliana*; pf, *Physaria fendleri*; pl, *Physaria lindheimeri*.

Фиг. 2. Анализ с помощью блот-гибридизации по Саузерну CtFAD2-подобной геномной структуры в генотипе SU сафлора. Геномную ДНК расщепляли восемью различными рестриктазами до деления в агарозном геле. Этими ферментами были AccI (дорожка 1), BglII (2), BamHI (3), EcoRI (4), EcoRV (5), HindIII (6), XbaI (7) и XhoI (8). Блот зондировали с использованием меченной радиоактивным изотопом полной кодирующей области CtFAD2-6 и промывали в условиях пониженной жесткости.

Фиг. 3. GC-MS анализ жирнокислотного состава дрожжей, экспрессирующих CtFAD2-1 (B), CtFAD2-2 (C), CtFAD2-9 (D), QFAD2-10 (E) и CtFAD2-11 (F). Пустой вектор (A) и GC кривая для смеси C18:2 изомеров (G).

Фиг. 4. GC-MS анализ жирнокислотного состава после транзитной экспрессии CtFAD2-11 в листьях *N. benthamiana*.

Фиг. 5. Анализ с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени экспрессии генов CtFAD2 сафлора.

Фиг. 6. Сравнение нуклеотидных последовательностей участка аллелей CtFAD2-1 из генотипа дикого типа SU и трех генотипов, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты, а именно S-317, CW99-OL и Lesaf496, демонстрирующее делецию нуклеотида в середине кодирующей CtFAD2-1 области у мутантов.

Фиг. 7. Сравнение ДНК-последовательностей интронов в 5'UTR в CtFAD2-1 в сорте дикого типа SU и генотипе, определяющем

высокое содержание олеиновой кислоты, S-317. Заключенные в рамку последовательности ДНК использовались для конструирования идеальных ПЦР-маркеров для продуктов ПЦР, специфических для генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, и специфических для дикого типа.

Фиг. 8. Анализ с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени уровней мРНК для CtFAD2-1 и CtFAD2-2 в развивающихся зародышах трех стадий развития, ранней (7 DPA), средней (15 DPA) и поздней (20 DPA). Сорты сафлора включают сорт дикого типа SU и три сорта с высоким содержанием олеиновой кислоты: S-317, CW99-OL и Lesaf496.

Фиг. 9. Анализ с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени генов CtFatB в листе, корне и развивающихся зародышах сафлора сорта SU. Em-1 (ранняя стадия), Em-2 (средняя стадия) и Em-3 (поздняя стадия).

Фиг. 10. Дендрограмма, демонстрирующая филогенетическую связь между последовательностями FAD6 сафлора и типичной пластидной $\Delta 12$ десатуразой FAD6, идентифицированной у высших растений *Jatropha curcas* (EU106889); *Olea europaea* (AY733075); *Populus trichocarpa* (EF147523); *Arabidopsis thaliana* (AY079039); *Descuriana sophia* (EF524189); *Glycine max* (AK243928); *Brassica napus* (L29214); *Portulaca oleracea* (EU376530); *Arachis hypogaea* (FJ768730); *Ginkgo biloba* (HQ694563).

Фиг. 11. Состав диацилглицеринов (DAG) (моль%) в S317 в сравнении с S317+603.9, определенный с использованием анализа с помощью LC-MS одного семени.

Фиг. 12. Состав триацилглицеринов (DAG) (моль%) в S317 в сравнении с S317+603.9, определенный с использованием анализа с помощью LC-MS одного семени.

Фиг. 13. Содержание олеиновой кислоты в сортах сафлора, выращенных в полевых условиях в Narrabri австралийским летом 2011/2012.

Фиг. 14. (А) Базовая структура фитостерола с нумерацией циклов и боковых цепей. (В) Химические структуры некоторых из

фитостеролов.

РАЗЪЯСНЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 - кДНК, кодирующая FAD2-1 сафлора.

SEQ ID NO: 2 - кДНК, кодирующая FAD2-2.

SEQ ID NO: 3 - кДНК, кодирующая FAD2-3 сафлора.

SEQ ID NO: 4 - кДНК, кодирующая FAD2-4 сафлора.

SEQ ID NO: 5 - кДНК, кодирующая FAD2-5 сафлора.

SEQ ID NO: 6 - кДНК, кодирующая FAD2-6 сафлора.

SEQ ID NO: 7 - кДНК, кодирующая FAD2-7 сафлора.

SEQ ID NO: 8 - кДНК, кодирующая FAD2-8 сафлора.

SEQ ID NO: 9 - кДНК, кодирующая FAD2-9 сафлора.

SEQ ID NO: 10 - кДНК, кодирующая FAD2-10 сафлора

SEQ ID NO: 11 - кДНК, кодирующая FAD2-11 сафлора.

SEQ ID NO: 12 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-1 сафлора.

SEQ ID NO: 13 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-2 сафлора.

SEQ ID NO: 14 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-3 сафлора.

SEQ ID NO: 15 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-4 сафлора.

SEQ ID NO: 16 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-5 сафлора.

SEQ ID NO: 17 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-6 сафлора.

SEQ ID NO: 18 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-7 сафлора.

SEQ ID NO: 19 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-8 сафлора.

SEQ ID NO: 20 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-9 сафлора.

SEQ ID NO: 21 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-10 сафлора.

SEQ ID NO: 22 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD2-11 сафлора.

SEQ ID NO: 23 - Последовательность интрона в гене FAD2-1

сафлора.

SEQ ID NO: 24 - Последовательность интрона в гене FAD2-2 сафлора.

SEQ ID NO: 25 - Последовательность интрона в гене FAD2-10 сафлора.

SEQ ID NO: 26 - кДНК, кодирующая усеченный FAD2-1 сафлора (мутант HO).

SEQ ID NO: 27 - FAD2-1 сафлора.

SEQ ID NO: 28 - FAD2-2 сафлора.

SEQ ID NO: 29 - FAD2-3 сафлора.

SEQ ID NO: 30 - FAD2-4 сафлора.

SEQ ID NO: 31 - FAD2-5 сафлора.

SEQ ID NO: 32 - FAD2-6 сафлора.

SEQ ID NO: 33 - FAD2-7 сафлора.

SEQ ID NO: 34 - FAD2-8 сафлора.

SEQ ID NO: 35 - FAD2-9 сафлора.

SEQ ID NO: 36 - FAD2-10 сафлора.

SEQ ID NO: 37 - FAD2-11 сафлора.

SEQ ID NO: 38 - Усеченный FAD2-1 сафлора (мутант HO).

SEQ ID NO: 39 - кДНК, кодирующая FATB-1 сафлора.

SEQ ID NO: 40 - кДНК, кодирующая FATB-2 сафлора.

SEQ ID NO: 41 - кДНК, кодирующая FATB-3 сафлора.

SEQ ID NO: 42 - Открытая рамка считывания, кодирующая FATB-2 сафлора.

SEQ ID NO: 43 - Открытая рамка считывания, кодирующая FATB-3 сафлора.

SEQ ID NO: 44 - FATB-2 сафлора.

SEQ ID NO: 45 - FATB-3 сафлора.

SEQ ID NO: 46 - кДНК, кодирующая FAD6 сафлора.

SEQ ID NO: 47 - Открытая рамка считывания, кодирующая FAD6 сафлора.

SEQ ID NO: 48 - FAD6 сафлора.

SEQ ID NO: 49 - Последовательность CtFAD2-2, используемая в вызывающей генный сайленсинг, опосредованный РНК, конструкции.

SEQ ID NO: 50 - Последовательность CtFATB-3, используемая

в вызывающей генный сайленсинг, опосредованный РНК, конструкции.

SEQ ID NO: 51 - Последовательность CtFAD6, используемая в вызывающей генный сайленсинг, опосредованный РНК, конструкции.

SEQ ID NO: 52 - Промотор олеозина *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO: 53 - Промотор линина льна.

SEQ ID NO: 54 - Сигнал полиаденилирования Nos.

SEQ ID NO: 55 - Сигнал полиаденилирования Ocs.

SEQ ID NO: 56 - Последовательность CtFAD2-1 дикого типа, соответствующая участку аллеля ol.

SEQ ID NO: 57 - Относящаяся к аллелю ol последовательность CtFAD2-2 со сдвигом рамки считывания (то же для S-317, CW99-OL и LeSaf496).

SEQ ID NO: 58-158 - Олигонуклеотидные праймеры.

SEQ ID NO: 159-169 - Мотивы ферментов CtFAD2.

SEQ ID NO: 170 - Интрон в 5'UTR в CtFAD2-1 сорта SU сафлора дикого типа.

SEQ ID NO: 171 - Интрон в 5'UTR в CtFAD2-1 сорта S-317 сафлора с высоким содержанием олеиновой кислоты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общие методы и определения

Кроме особо оговоренных случаев, предполагается, что все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, что и значение, в котором их обычно понимает специалист со средним уровнем компетентности в данной области техники (например, культивирования клеток, молекулярной генетики, иммунологии, иммуногистохимии, химии белков и биохимии).

Если не указано иное, методы рекомбинантных белков, культивирования клеток и иммунологические методы, используемые в настоящем изобретении, являются стандартными процедурами, хорошо известными квалифицированным в данной области техники специалистам. Такие методы описаны и объяснены полностью в литературе в таких источниках, как J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 и 1996), и F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, включая все исправленные и дополненные издания до настоящего времени), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), и J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (включая все исправленные и дополненные издания до настоящего времени).

Термин «и/или», например, «X и/или Y», как подразумевается, означает или «X и Y», или «X или Y», и, как предполагается, подтверждает в явной форме оба значения или то или другое значение.

Используемый здесь термин «приблизительно», если только не указано иное, относится к $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, более предпочтительно $\pm 4\%$, более предпочтительно $\pm 3\%$, более предпочтительно $\pm 2\%$, более предпочтительно $\pm 1,5\%$, более предпочтительно $\pm 1\%$, даже более предпочтительно $\pm 0,5\%$, от присвоенного значения.

На протяжении всего этого описания слово «включать» или такие варианты, как «включает» или «включающий», как будет подразумеваться, означает включение определенного элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий, но без исключения любого другого элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий.

Используемый здесь термин «экстрагированный липид» относится к липидной композиции, которая включает по крайней мере 60% (в весовом отношении) липида и которая была экстрагирована, например, с помощью раздавливания, из трансгенного организма или его части. Кроме того, используемый здесь термин «экстрагированное масло» относится к масляной композиции, которая включает по крайней мере 60% (в весовом отношении) масла и которая была экстрагирована из трансгенного

организма или его части.

Используемый здесь термин «очищенный» при использовании в связи с липидом или маслом настоящего изобретения типично означает, что экстрагированный липид или масло был подвергнут одной или более стадий обработки для увеличения степени чистоты компонента в виде липида/масла. Например, стадия очистки может включать одно или более или все из группы, состоящей из: рафинирования гидратацией, дезодорации, обесцвечивания, сушки и/или фракционирования экстрагированного масла. Однако используемый здесь термин «очищенный» не включает процесс переэтерификации или другой процесс, который изменяет жирнокислотный состав липида или масла настоящего изобретения для увеличения содержания олеиновой кислоты в виде процента от общего содержания жирных кислот. Другими словами, жирнокислотный состав очищенного липида или масла является по существу таким же, как и таковой неочищенного липида или масла. Жирнокислотный состав экстрагированного липида или масла, такой как, например, доли олеиновой, линолевой и пальмитиновой кислот, является по существу таким же, как и жирнокислотный состав липида или масла в семени растения, из которого его получают. В этом контексте «по существу такой же» означает $\pm 1\%$, или, предпочтительно, $\pm 0,5\%$.

Используемый здесь термин «доля десатурации олеиновой кислоты» или «ODP» относится к расчету, который включает деление относительного количества линолевой кислоты и α -линоленовой кислоты, представленного в виде процента от смеси жирных кислот липида, на сумму относительных количеств олеиновой кислоты, линолевой и α -линоленовой кислоты, каждая из которых представлена в виде процента. Формула является следующей:

$$ODP = (\% \text{ линолевой кислоты} + \% \alpha\text{-линоленовой кислоты}) / (\% \text{ олеиновой кислоты} + \% \text{ линолевой кислоты} + \% \alpha\text{-линоленовой кислоты})$$

Например, TG603.12(5) примера 15 имеет общее содержание линолевой кислоты и α -линоленовой кислоты, составляющее 2,15%, и содержание линолевой кислоты, α -

линоленовой кислоты и олеиновой кислоты, составляющее 93,88%, что составляет $ODP=0,0229$.

Используемый здесь термин «значение отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту» или «PLO» относится к расчету, который включает деление относительного количества линолевой кислоты и пальмитиновой кислоты, представленного в виде процента от смеси жирных кислот липида, на относительное количество олеиновой кислоты, представленное в виде процента. Формула является следующей:

$$PLO = (\% \text{ пальмитиновой кислоты} + \% \text{ линолевой кислоты}) / \% \text{ олеиновой кислоты}.$$

Например, TG603.12(5) примера 15 имеет общее содержание линолевой кислоты и пальмитиновой кислоты, составляющее 4,71%, и содержание олеиновой кислоты, составляющее 91,73%, что составляет $PLO=0,0513$.

Используемый здесь термин «доля олеиновой кислоты в моновенасыщенности» или «OMP» относится к расчету, который включает деление относительного количества не являющихся олеиновой кислоты моновенасыщенных жирных кислот, представленного в виде процента от смеси жирных кислот липида, на относительное количество олеиновой кислоты, представленное в виде процента. Формула является следующей:

$$OMP = (\% \text{ моновенасыщенных жирных кислот} - \% \text{ олеиновой кислоты}) / \% \text{ олеиновой кислоты}.$$

Например, TG603.12(5) примера 15 имеет общее содержание моновенасыщенных жирных кислот за исключением олеиновой кислоты (0,84% C18:1Δ11 + 0,29% C20:1), составляющее 1,13%, и содержание олеиновой кислоты, составляющее 91,73%, что составляет $OMP=0,0123$.

Термин «соответствующая» относится к клетке, или растению или его части (такой как семя), которая(ое) имеет такой же или схожий генетический фон, что и клетка, или растение или его часть (семя) настоящего изобретения, но которая(ое) не было модифицировано, как здесь описывается (например, клетка, или растение или его часть, в которой(ом) отсутствует экзогенный

полинуклеотид настоящего изобретения). Соответствующая клетка или растение или его часть (семя) может использоваться в качестве контроля для сравнения, например, одного или более количеств продуцированной олеиновой кислоты, активности FAD2, активности FATB или активности FAD6 с клеткой, или растением или его частью (семенем), модифицированной(ым), как здесь описывается. Квалифицированный в данной области техники специалист может без труда определить подходящую «соответствующую» клетку, растение или его часть (семя) для такого сравнения.

Используемый здесь термин «масло из семени» относится к композиции, полученной из семени растения, которая включает по крайней мере 60% (в весовом отношении) липида, или получаемому из семени, если масло из семени все еще присутствует в семени. Т.е. масло из семени настоящего изобретения, или полученное, используя, настоящего изобретения включает масло из семени, которое присутствует в семени или его части, такой как семядоли или зародыш, если только оно не относится к «экстрагированному маслу из семени» или схожим терминам, в случае которых оно представляет собой масло, которое было экстрагировано из семени. Маслом из семени предпочтительно является экстрагированное масло из семени. Масло из семени типично является жидкостью при комнатной температуре. Предпочтительно общим жирнокислотным составом (TFA) масла из семени является >70% C18 жирных кислот, предпочтительно >90% олеиновой кислоты (C18:1Δ9). Жирные кислоты типично находятся в этерифицированной форме, такой как, например, TAG, DAG, ацил-КоА или фосфолипид. Кроме особо оговоренных случаев, жирные кислоты могут быть свободными жирными кислотами и/или находиться в этерифицированной форме. В варианте осуществления по крайней мере 50%, более предпочтительно по крайней мере 70%, более предпочтительно по крайней мере 80%, более предпочтительно по крайней мере 90%, более предпочтительно по крайней мере 91%, более предпочтительно по крайней мере 92%, более предпочтительно по крайней мере 93%, более предпочтительно по

крайней мере 94%, более предпочтительно по крайней мере 95%, более предпочтительно по крайней мере 96%, более предпочтительно по крайней мере 97%, более предпочтительно по крайней мере 98%, более предпочтительно по крайней мере 99% жирных кислот в масле из семени настоящего изобретения можно обнаружить в виде TAG. В варианте осуществления масло из семени настоящего изобретения является «в значительной степени очищенным» или «очищенным» маслом, которое было отделено от одного или более других липидов, нуклеиновых кислот, полипептидов или других загрязняющих молекул, с которыми оно связано в семени или в неочищенном экстракте. Предпочтительно, когда в значительной степени очищенное масло из семени освобождено на по крайней мере 60%, более предпочтительно освобождено на по крайней мере 75% и более предпочтительно освобождено на по крайней мере 90% от других компонентов, с которыми оно связано в семени или экстракте. Масло из семени настоящего изобретения может, кроме того, включать не являющиеся жирными кислотами молекулы, такие как, но без ограничения, стеролы (см. пример 17). В варианте осуществления маслом из семени является сафлоровое масло (*Carthamus tinctorius*), подсолнечное масло (*Helianthus annuus*), хлопковое масло (*Gossypium hirsutum*), касторовое масло (*Ricinus communis*), масло канолы (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), горчичное масло (*Brassica juncea*), масло из других *Brassica* (например, *Brassica napobrassica*, *Brassica camelina*), льняное масло (*Linum usitatissimum*), соевое масло (*Glycine max*), кукурузное масло (*Zea mays*), табачное масло (*Nicotiana tabacum*), арахисовое масло (*Arachis hypogaea*), пальмовое масло (*Elaeis guineensis*), кокосовое масло (*Cocos nucifera*), масло авокадо (*Persea americana*), оливковое масло (*Olea europaea*), масло из анакардии западной (*Anacardium occidentale*), масло австралийского ореха (*Macadamia integrifolia*), миндальное масло (*Prunus amygdalus*), масло из семян овса (*Avena sativa*), рисовое масло (*Oryza sativa* или *Oryza glaberrima*), рыжиковое масло (*Camelina sativa*), масло крамбе (*Crambe abyssinica*) или масло из семени *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Масло из

семени можно экстрагировать из семени с помощью любого способа, известного в данной области техники. Это типично включает экстракцию с использованием неполярных растворителей, таких как гексан, диэтиловый эфир, петролейный эфир, смеси хлороформ/метанол или бутанол, обычно связанную с первым раздавливанием или вращением семян. Липиды, связанные с крахмалом в зерне, можно экстрагировать с использованием насыщенного водой бутанола. Масло из семени можно подвергнуть рафинации гидратацией с помощью способов, известных в данной области техники, для удаления полисахаридов и/или фосфолипидов или подвергнуть обработке другими способами для удаления загрязнений или увеличения степени чистоты, стабильности или цвета. TAG и другие сложные эфиры в масле из семени можно гидролизовать для высвобождения свободных жирных кислот, например, с использованием обработки кислотами или щелочами или под действием липаз, или масло из семени гидрогенизируют, подвергают химической или ферментативной обработке, как известно в данной области техники. Однако после обработки масла из семени, так что оно больше не включает TAG, его больше не считают маслом из семени, упоминаемым здесь.

Концентрации свободных и этерифицированных стеролов (например, ситостерола, кампестерина, стигмастерина, брассикастерина, Δ^5 -авенастерола, ситостанола, кампестанола и холестерина) в очищенном и/или экстрагированном липиде или масле могут быть концентрациями, описанными в Phillips et al. (2002) и/или представленными в примере 17. Стеролы в растительных маслах присутствуют в виде свободных спиртов, эфиров жирных кислот (этерифицированные стеролы), гликозидов и ацилированных гликозидов стеролов. Концентрации стеролов во встречающихся в природе растительных маслах (маслах из семян) находятся в пределах вплоть до максимального значения, составляющего приблизительно 1100 мг/100 г. Гидрогенизированное пальмовое масло имеет одну из самых низких концентраций из встречающихся в природе растительных масел, составляющую приблизительно 60 мг/100 г. Извлеченные или экстрагированные

масла из семян настоящего изобретения предпочтительно содержат между приблизительно 100 и приблизительно 1000 мг всех стеролов/100 г масла. В случае применения в качестве пищи или корма предпочтительно, когда стеролы присутствуют в основном в виде свободных или этерифицированных форм, а не гликозилированных форм. В маслах из семян настоящего изобретения предпочтительно по крайней мере 50% стеролов в маслах присутствуют в виде этерифицированных форм, за исключением масла из семян сои, которое содержит приблизительно 25% этерифицированных стеролов. Масло из семян сафлора настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 150 и приблизительно 400 мг всех стеролов/100 г, типично приблизительно 300 мг всех стеролов/100 г масла из семени, при этом ситостерол является основным стеролом. Масло из семян канола и рапсовое масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 500 и приблизительно 800 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом, а кампестерин - следующим из имеющихся в наибольшем относительном количестве Кукурузное масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 600 и приблизительно 800 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом. Соевое масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 150 и приблизительно 350 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом, а стигмастерин - следующим из имеющихся в наибольшем относительном количестве, и оно содержит больше свободных стеролов, чем этерифицированных стеролов. Хлопковое масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 200 и приблизительно 350 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом. Кокосовое масло и пальмовое масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 50 и приблизительно 100 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом. Арахисовое масло настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 100 и приблизительно 200 мг всех стеролов/100 г,

при этом ситостерол является основным стеролом. Масло из семян кунжута настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 400 и приблизительно 600 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом. Масло из семян сафлора настоящего изобретения предпочтительно содержит между приблизительно 200 и 400 мг всех стеролов/100 г, при этом ситостерол является основным стеролом.

Используемый здесь термин «жирная кислота» относится к карбоновой кислоте с длинным алифатическим хвостом длиной по крайней мере 8 атомов углерода, или насыщенной или ненасыщенной. Типично жирные кислоты имеют углеродную цепь длиной по крайней мере 12 атомов углерода. Большинство встречающихся в природе жирных кислот содержат четное число атомов углерода, поскольку в их биосинтезе участвует ацетат, который содержит два атома углерода. Жирные кислоты могут находиться в свободном состоянии (неэтерифицированном) или в этерифицированной форме, такой как связанная часть TAG, DAG, MAG, ацил-КоА (тиоэфира), или другой ковалентно связанной форме. Когда жирная кислота является ковалентно связанной в этерифицированной форме, ее называют здесь «ацильной» группой. Жирная кислота может быть этерифицирована в виде фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит или дифосфатидилглицерин. Насыщенные жирные кислоты не содержат какие-либо двойные связи или другие функциональные группы вдоль цепи. Термин «насыщенные» относится к водороду, в том плане, что все углероды (кроме карбоксильной группы $[-COOH]$) содержат максимально возможное число атомов водорода. Другими словами, омега (ω) конец содержит 3 водорода (CH_3-), и каждый углерод в цепи содержит 2 водорода ($-CH_2-$). Ненасыщенные жирные кислоты имеют схожую с насыщенными жирными кислотами форму, за исключением того, что одна или более алкеновых функциональных групп существует вдоль цепи, при этом каждый алкен замещает связанную одинарной связью часть « $-CH_2-CH_2-$ » цепи связанной двойной связью частью « $-CH=CH-$ » (т.е. углеродом, связанным с

помощью двойной связи с другим углеродом). Два соседних атома углерода в цепи, которые связаны с одной из двух сторон двойной связи, могут встречаться в цис- или транс-конфигурации.

Используемые здесь термины «полиненасыщенная жирная кислота» или «PUFA» относятся к жирной кислоте, которая включает по крайней мере 12 атомов углерода в своей углеродной цепи и по крайней мере две алкеновые группы (углерод-углеродные двойные связи).

Используемый здесь термин «мононенасыщенная жирная кислота» относится к жирной кислоте, которая имеет одну двойную связь в своей ацильной цепи, такой как олеиновая кислота (C18:1 Δ 9), C18:1D11 и C20:1.

«Триацилглицерид» или «TAG» является глицеридом, в котором глицерин превращен в сложный эфир с использованием трех жирных кислот. В пути Кеннеди синтеза TAG, образуется DAG, как описано выше, а затем третья ацильная группа образует сложноэфирную связь с остовом глицерина под действием активности DGAT. Альтернативные пути образования TAG включают путь, катализируемый ферментом PDAT, и путь с участием MGAT (PCT/AU2011/000794).

«Диацилглицерид» или «DAG» является глицеридом, в котором глицерин превращен в сложный эфир с использованием двух жирных кислот. Как здесь используется, DAG включает гидроксильную группу в sn-1,3 или sn-1,2/2,3 положении, и, следовательно, DAG не включает фосфорилированную молекулу, такую как PA или PC. Таким образом, DAG является компонентом нейтральных липидов в клетке. В пути Кеннеди синтеза DAG, предшественник sn-глицерин-3-фосфат (G-3-P) образует сложноэфирные связи с двумя ацильными группами, каждая из которых происходит из эфира, образованного из жирной кислоты и коэнзима А, в первой реакции, катализируемой глицерин-3-фосфат-ацилтрансферазой (GPAT), в положении sn-1 с образованием LysoPA, с последующим вторым ацилированием в положении sn-2, катализируемым (лизофосфатидная кислота)-ацилтрансферазой (LPAAT), с образованием фосфатидной кислоты (PA). Этот промежуточный продукт затем

дефосфорилируется с образованием DAG. В альтернативном анаболическом пути, DAG может образоваться в результате ацилирования или sn-1 MAG, или предпочтительно sn-2 MAG, катализируемого MGAT. DAG может также образовываться из TAG в результате удаления ацильной группы липазой, или из PC по существу в результате удаления концевой группы холина любым из ферментов CPT, PDCT или PLC.

Используемый здесь термин «десатураза» относится к ферменту, который способен вводить углерод-углеродную двойную связь в ацильную группу субстрата, включающего остатки жирных кислот, который типично находится в этерифицированной форме, такой как, например, эфиры, образуемые из КоА и жирной кислоты. Ацильная группа может этерифицироваться до фосфолипида, такого как фосфатидилхолин (PC), или до ацилпереносящего белка (ACP), до КоА, или в предпочтительном варианте осуществления до PC. Десатуразы, как правило, можно распределить по трем группам, соответственно. В одном варианте осуществления десатуразой является десатураза «переднего конца».

Используемые здесь термины « $\Delta 12$ -десатураза» и «FAD2» относятся к связанной с мембраной десатуразе жирных кислот, выполняющей удаление атома водорода в $\Delta 12$ положении, которая выполняет реакцию десатурации, превращая олеиновую кислоту ($18:1^{\Delta 9}$) в линолевую кислоту ($C18:2^{\Delta 9,12}$). Таким образом, термин « $\Delta 12$ -десатуразная активность» относится к превращению олеиновой кислоты в линолевую кислоту. Эти жирные кислоты могут находиться в этерифицированной форме, например, в виде части фосфолипида, предпочтительно в форме PC. В варианте осуществления фермент FAD2, определенный здесь, включает три богатых гистидином мотива (His-боксов) (см. таблицу 5 ради примеров His-боксов ферментов настоящего изобретения). Такие богатые His мотивы являются в высокой степени консервативными в ферментах FAD2 и, как установлено, вовлечены в образование дижелезного комплекса с молекулярным кислородом, используемым при биохимическом катализе (Shanklin et al., 1998).

Используемые здесь термины «FAD2-1» и «CtFAD2-1» и их

варианты относятся к полипептиду FAD2 сафлора, аминокислотная последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 27, такому как полипептид, кодируемый нуклеотидами, имеющими последовательность, представленную как SEQ ID NO: 12. Как здесь используется, ген FAD2-1 является геном, кодирующим такой полипептид, или его мутантным аллелем. Эти термины также включают встречающиеся в природе или искусственно индуцированные или полученные варианты представленных последовательностей. В варианте осуществления FAD2-1 настоящего изобретения включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 95%, более предпочтительно идентична на по крайней мере 99% последовательности, представленной как SEQ ID NO: 27. Гены CtFAD2-1 включают аллели, которые являются мутантами, т.е. которые кодируют полипептиды с измененной десатуразной активностью, например, уменьшенной активностью, или не кодируют функциональные полипептиды (молчащие аллели). Такие аллели могут быть встречающимися в природе или индуцированными искусственным мутагенезом. Примером такого аллеля является аллель ol FAD2-1, описываемый здесь.

Используемые здесь термины «FAD2-2» и «CtFAD2-2» и их варианты относятся к полипептиду FAD2 сафлора, аминокислотная последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 28, такому как полипептид, кодируемый нуклеотидами, имеющими последовательность, представленную как SEQ ID NO: 13. Как здесь используется, ген FAD2-2 является геном, кодирующим такой полипептид, или его мутантным аллелем. Эти термины также включают встречающиеся в природе или искусственно индуцированные или полученные варианты представленных последовательностей. В варианте осуществления FAD2-2 настоящего изобретения включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 95%, более предпочтительно идентична на по крайней мере 99% последовательности, представленной как SEQ ID NO: 28. Гены CtFAD2-2 включают аллели, которые являются мутантами, т.е. которые кодируют полипептиды с измененной десатуразной активностью, например,

уменьшенной активностью, или не кодируют функциональные полипептиды (молчащие аллели). Такие аллели могут быть встречающимися в природе или индуцированными искусственным мутагенезом.

Используемые здесь термины «FAD2-10» и «CtFAD2-10» и их варианты относятся к полипептиду FAD2 сафлора, аминокислотная последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 36, такому как полипептид, кодируемый нуклеотидами, имеющими последовательность, представленную как SEQ ID NO: 21. Как здесь используется, ген FAD2-10 является геном, кодирующим такой полипептид, или его мутантным аллелем. Эти термины также включают встречающиеся в природе или искусственно индуцированные или полученные варианты представленной последовательности. В варианте осуществления FAD2-10 настоящего изобретения включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 95%, более предпочтительно идентична на по крайней мере 99% последовательности, представленной как SEQ ID NO: 36. Гены CtFAD2-10 включают аллели, которые являются мутантами, т.е. которые кодируют полипептиды с измененной десатуразной активностью, например, уменьшенной активностью, или не кодируют функциональные полипептиды (молчащие аллели). Такие аллели могут быть встречающимися в природе или индуцированными искусственным мутагенезом.

Используемый здесь термин «пальмитоил-АСР-тиоэстераза» или «FATB» относится к белку, который гидролизует пальмитоил-АСР с образованием свободной пальмитиновой кислоты. Таким образом, термин «пальмитоил-АСР-тиоэстеразная активность» относится к гидролизу пальмитоил-АСР с образованием свободной пальмитиновой кислоты.

Используемые здесь термины «FATB-3» и «CtFATB-3» и их варианты относятся к полипептиду FATB сафлора, аминокислотная последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 45, такому как полипептид, кодируемый нуклеотидами, имеющими последовательность, представленную как SEQ ID NO: 43. Как здесь используется, ген FATB-3 является геном, кодирующим такой

полипептид, или его мутантным аллелем. Эти термины также включают встречающиеся в природе или искусственно индуцированные или полученные варианты представленных последовательностей. В варианте осуществления FATB-3 настоящего изобретения включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 95%, более предпочтительно идентична на по крайней мере 99% последовательности, представленной как SEQ ID NO: 45. Гены CtFATB-3 включают аллели, которые являются мутантами, т.е. которые кодируют полипептиды с измененной пальмитоил-АСР-тиоэстеразной активностью, например, уменьшенной активностью, или не кодируют функциональные полипептиды (молчащие аллели). Такие аллели могут быть встречающимися в природе или индуцированными искусственным мутагенезом.

Как здесь используются, «пластидная десатураза ω6 жирных кислот», его варианты, и «FAD6» относится к ферменту хлоропластов, который десатурирует 16:1 и 18:1 жирные кислоты до 16:2 и 18:2, соответственно, во всех 16:1- или 18:1-содержащих липидах мембран хлоропластов, включая фосфатидилглицерин, моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и сульфогвиновозилдиацилглицерин.

Используемые здесь термины «FAD6» и «CtFAD6» и их варианты относятся к полипептиду FAD6 сафлора, аминокислотная последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 48, такому как полипептид, кодируемый нуклеотидами, имеющими последовательность, представленную как SEQ ID NO: 47. Как здесь используется, ген FAD6 является геном, кодирующим такой полипептид, или его мутантным аллелем. Эти термины также включают встречающиеся в природе или искусственно индуцированные или полученные варианты представленных последовательностей. В варианте осуществления FAD6 настоящего изобретения включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 95%, более предпочтительно идентична на по крайней мере 99% последовательности, представленной как SEQ ID NO: 48. Гены CtFAD6 включают аллели,

которые являются мутантами, т.е. которые кодирует полипептиды с измененной десатуразной активностью, например, уменьшенной активностью, или не кодируют функциональные полипептиды (молчащие аллели). Такие аллели могут быть встречающимися в природе или индуцированными искусственным мутагенезом.

Используемый здесь термин «ацетиленаз» или «ацетиленаз жирных кислот» относится к ферменту, который вводит тройную связь в жирную кислоту, приводя к образованию жирной кислоты ацетиленового ряда.

Термин «Ct» используется здесь перед такими терминами, как FAD2, FATB и FAD6, для указания на то, что фермент/ген происходит из сафлора.

Используемый здесь термин «вызывающая генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию» и его варианты относится к полинуклеотиду, который кодирует молекулу РНК, которая уменьшает (снижает) продукцию и/или активность, (например, кодирующую киРНК, шпилечную и-РНК), или сам снижает продукцию и/или активность (например, является киРНК, которую можно доставить непосредственно, например, в клетку), эндогенного фермента, например, $\Delta 12$ десатуразы, пальмитоил-АСР-тиоэстеразы, пластидной десатуразы $\omega 6$ жирных кислот или комбинации двух или более или всех трех ферментов. В варианте осуществления вызывающей генный сайленсинг РНК является экзогенная РНК, которая образуется с транскрипции в клетке и которая транскрипционно и/или посттранскрипционно уменьшает количество эндогенного фермента, который продуцируется в клетке, например, в результате уменьшения количества мРНК, кодирующей эндогенный фермент, или уменьшения его трансляции. Вызывающей генный сайленсинг РНК типично является РНК длиной 21–24 нуклеотида, которая является комплементарной эндогенной мРНК и которая может связываться с комплексом сайленсинга, известным как RISC, в клетке.

Используемый здесь термин «мутация(и), которая уменьшает активность», относится к встречающимся в природе или искусственным мутантам (например, созданным с помощью

химического мутагенеза или сайт-специфического мутагенеза), которые имеют более низкие уровни определенной ферментативной активности (например, FAD2 ферментативной активности в семени) по сравнению с фенотипически нормальными семенами (например, семенами, в которых образуются ферменты FAD2, которые включают аминокислотные последовательности, представленные как SEQ ID NO: 27, 28 и 36). Примеры фенотипически нормальных сортов сафлора включают, но без ограничения, Centennial, Finch, Nutrasaff и Cardinal. Первый идентифицированный признак высокого содержания олеиновой кислоты, обнаруженный при внедрении сафлора из Индии, контролировался частично рецессивным аллелем, обозначенным *ol*, в одном локусе *OL* (Knowles and Hill, 1964). Как здесь описано, локус *OL* соответствует гену *CtFAD2-1*. Содержание олеиновой кислоты в масле из семени в генотипах *olol* обычно составляло 71-75% в случае выращиваемых в теплице растений (Knowles, 1989). Knowles (1968) включил аллель *ol* в программу селекции сафлора и вывел первый сорт сафлора с высоким содержанием олеиновой кислоты (НО) «UC-1» в 1966 в США, с последующим выведением улучшенных сортов «Oleic Leed» и серии Saffola, в том числе Saffola 317 (S-317), S-517 и S-518. Генотипы *olol* (высокое содержание олеиновой кислоты) были относительно устойчивыми на уровне олеиновой кислоты при выращивании при различных температурах в поле (Bartholomew, 1971). Кроме того, Knowles (1972) также описал отличный аллель *ol*₁ в том же локусе, который порождал в гомозиготном состоянии между 35 и 50% олеиновой кислоты. В отличие от генотипа *olol*, генотип *ol*₁*ol*₁ продемонстрировал сильную реакцию на температуру (Knowles, 1972). Как здесь определено, мутацией аллеля *ol*, которая наделяет уменьшенной активностью FAD2-1 (и общей FAD2 активностью) в семени сафлора, является мутантный ген FAD2-1, включающий мутацию со сдвигом рамки считывания (вследствие делеции одного нуклеотида), изображенный на фиг. 6 (см. также пример 7 и SEQ ID NO: 26 и 38).

Используемое здесь выражение «которое способно порождать растение, которое образует семя, содержащее в виде масла

которого включает» или «которое способно порождать растение, которое образует масличное семя, содержащее в виде масла которого включает» или его варианты означает, что растение, развившееся из семени, предпочтительно масличное растение и более предпочтительно растение сафлор, обладает способностью продуцировать масло с определенными компонентами при выращивании в оптимальных условиях, например, в условиях теплицы, таких как те, которые упоминаются в разделе «Примеры». Владея семенем от растения, обычно выращивают растение-потомка из по крайней мере одного из семян в подходящих условиях теплицы и проверяют масличность и жирнокислотный состав масла семени от растения-потомка, используя стандартные процедуры, такие как те, которые здесь описываются. Соответственно, как будет понятно квалифицированному специалисту, хотя семя, выращенное в поле, может не удовлетворять всем требованиям, определенным здесь, вследствие неблагоприятных условий в конкретный год, таких как жара, холод, засуха, заводнение, мороз, воздействие вредителей и т.д., такое семя, тем не менее, охватывается настоящим изобретением, поскольку семя способно породить растение-потомка, которое дает определенную масличность или жирнокислотный состав при выращивании в более благоприятных условиях.

Используемый здесь термин «в весовом отношении» относится к весу вещества (например, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты или PUFA, такой как линолевая кислота или линоленовая кислота) в виде процента от веса композиции, включающей вещество, или компонента в композиции. Например, вес конкретной жирной кислоты, такой как олеиновая кислота, может определяться как процент от веса общего содержания жирных кислот в липиде или масле из семени, или в семени.

Используемый здесь термин «биотопливо» относится к любому типу топлива, типично используемому для приведения в действие машин, таких как автомобили, грузовые автомобили или приводимые в действие с использованием нефти моторы, энергия для которых возникает в результате биологической фиксации углерода, а не происходит от ископаемого топлива. Биотопливо включает топливо,

возникающее в результате превращения биомассы, а также происходящее из твердой биомассы, жидкого топлива и биогазов. Примеры биотоплива включают биоспирты, биодизель, синтетическое дизельное топливо, растительное масло, биологические простые эфиры, биогаз, сингаз, твердое биотопливо, топливо водорослевого происхождения, биоводород, биометанол, 2,5-диметилфуран (DMF), биодиметиловый эфир (биоDME), дизельное топливо, полученное методом Фишера-Тропша, биоводородный дизель, смешанные спирты и дизельное топливо из древесных отходов.

Используемый здесь термин «промышленный продукт» относится к углеводородному продукту, который в основном изготовлен из углерода и водорода, такому как метиловые и/или этиловые эфиры жирных кислот или алканы, такие как метан, смеси более длинноцепочечных алканов, которые типично являются жидкостями при температурах окружающей среды, биотопливо, окись углерода и/или водород, или биоспирт, такой как этанол, пропанол, или бутанол, или биоуголь. Термин «промышленный продукт», как предполагается, включает промежуточные продукты, которые можно превратить в другие промышленные продукты, например, сам сингаз считается промышленным продуктом, который может использоваться для синтеза углеводородного продукта, который также считается промышленным продуктом. Термин «промышленный продукт», как здесь используется, включает или чистые формы вышеотмеченных соединений, или чаще смеси различных соединений и компонентов, например, углеводородный продукт может содержать диапазон длин углеводных цепей, как это хорошо изучено в данной области техники.

Полинуклеотиды

Термины «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, или дезоксирибонуклеотидов, или рибонуклеотидов. Полинуклеотид настоящего изобретения может быть геномного, кДНК, полусинтетического или синтетического происхождения, двухцепочечным или одноцепочечным, и ввиду своего происхождения или вследствие его обработки он: (1) не

связан со всем полинуклеотидом или его частью, с которым он связан в природе, (2) связан с полинуклеотидом, отличным от такового, с которым он связан в природе, или (3) не встречается в природе. Неограничивающими примерами полинуклеотидов являются следующие полинуклеотиды: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенный в результате анализа групп сцепления, экзоны, интроны, информационная РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК (рРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, химерная ДНК с любой последовательностью, зонды и праймеры в виде нуклеиновых кислот. Предпочтительные полинуклеотиды настоящего изобретения включают молекулы двухцепочечных ДНК, которые могут быть транскрибированы в клетках растений и молекулы вызывающих генный сайленсинг РНК.

Используемый здесь термин «ген» следует понимать в его самом широком контексте и включает дезоксирибонуклеотидные последовательности, включающие транскрибируемый район и, в случае его трансляции, кодирующую белок область, структурного гена и включающие последовательности, которые расположены рядом с кодирующей областью и на 5', и на 3' концах на расстоянии, составляющем по крайней мере приблизительно 2 т.п.о., на том или другом конце и которые вовлечены в экспрессию гена. В связи с этим, ген включает контролирующие сигналы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы терминации и/или полиаденилирования, которые связаны в природе с конкретным геном, или гетерологичные контрольные сигналы, в этом случае ген называют «химерным геном». Последовательности, которые расположены 5' от кодирующей белок области и которые присутствуют в мРНК, называют 5' нетранслируемыми последовательностями. Последовательности, которые расположены 3' или ниже кодирующей белок области и которые присутствуют в мРНК, называют 3' нетранслируемыми последовательностями. Термин «ген» охватывает и кДНК, и геномные формы гена. Геномная форма или клон гена содержит кодирующую область, которую могут

прерывать некодирующие последовательности, называемые «интронами», «промежуточными районами» или «промежуточными последовательностями». Интроны являются сегментами гена, которые транскрибируются в ядерную РНК (яРНК). Интроны могут содержать регуляторные элементы, такие как энхансеры. Интроны удаляются или «вырезаются» из ядерного или первичного транскрипта; по этой причине интроны отсутствуют в мРНК-транскрипте. мРНК функционирует во время трансляции с установлением последовательности или порядка аминокислот в образующемся полипептиде. Термин «ген» включает синтетическую или слитую молекулу, кодирующую весь белок или его часть настоящего изобретения, описываемый здесь, и нуклеотидную последовательность, комплементарную любой из вышеприведенных последовательностей.

«Аллель» относится к одной конкретной форме генетической последовательности (такой как ген) в клетке, в отдельном растении или в популяции, при этом конкретная форма отличается от других форм того же гена по последовательности по крайней мере одного, а часто более чем одного, вариантного сайта в последовательности гена. Последовательности в этих вариантных сайтах, которые отличаются между различными аллелями, называют «вариансами», «полиморфизмами» или «мутациями».

Как здесь используется, «химерная ДНК» относится к любой молекуле ДНК, которая не встречается в природе; также называемой «ДНК-конструкцией». Типично химерная ДНК включает регуляторные и транскрибируемые или кодирующие белок последовательности, которые не встречаются в природе вместе. Соответственно, химерная ДНК может включать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые происходят из одного и того же источника, но располагаются в порядке, отличающемся от такового, встречающегося в природе. Открытая рамка считывания может или может не быть связана со своими природными 5' и 3' регуляторными элементами. Открытая рамка считывания может быть включена, например, в геном

растения, в неприродном положении, или в репликон или вектор, в котором она не встречается в природе, такой как бактериальная плазида или вирусный вектор. Термин «химерная ДНК» не ограничивается молекулами ДНК, которые могут реплицироваться в хозяине, но включает ДНК, которую можно подвергнуть лигированию в репликон с использованием, например, специфических адаптерных последовательностей.

«Трансген» является геном, который был введен в геном с помощью процедуры трансформации. Трансген может присутствовать в исходном трансформированном растении, полученным посредством регенерации из трансформированной клетки растения, или в растениях-потомках, полученных в результате самоопыления или скрещивания, исходя из исходного трансформанта, или в частях растения, таких как семена. Термин «генетически модифицированный» и его варианты включает введение гена в клетку с помощью трансформации или трансдукции, мутирование гена в клетке или генетическое изменение или модуляцию регуляции гена в клетке, или потомстве любой клетки, модифицированной, как описано выше.

«Геномный участок», как здесь используется, относится к месту, в которое трансген или группа трансгенов (также называемая здесь кластером) были введены в клетку, или ее предшественник, так что они являются совместно унаследованными в клетках-потомках после мейоза.

«Рекомбинантный полинуклеотид» или «экзогенный полинуклеотид» настоящего изобретения относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована или модифицирована с использованием методов искусственных рекомбинантных молекул. Рекомбинантный полинуклеотид может присутствовать в клетке в измененном количестве или экспрессироваться в измененной степени (например, в случае мРНК) по сравнению с его природным состоянием. Экзогенным полинуклеотидом является полинуклеотид, который был введен в клетку, которая обычно не включает этот полинуклеотид. Типично экзогенная ДНК используется в качестве матрицы для транскрипции мРНК, которая затем транслируется в непрерывную

последовательность аминокислотных остатков, кодирующую полипептид настоящего изобретения в трансформированной клетке. В другом варианте осуществления часть экзогенного полинуклеотида является эндогенной по отношению к клетке, и ее экспрессия изменена рекомбинантным способом, например, экзогенную контролирующую последовательность вводят 5' от эндогенного полинуклеотида, чтобы сделать возможной экспрессию трансформированными клетками полипептида, кодируемого полинуклеотидом. Например, экзогенный полинуклеотид может экспрессировать антисмысловую РНК по отношению к эндогенному полинуклеотиду.

Рекомбинантный полинуклеотид настоящего изобретения включает полинуклеотиды, которые были отделены от других компонентов клеточной или бесклеточной экспрессионной системы, в которой они присутствуют, и полинуклеотиды, продуцированные в указанной клеточной или бесклеточной экспрессионной системе, которые впоследствии очищают от по крайней мере некоторых других компонентов. Полинуклеотид может представлять собой непрерывный участок нуклеотидов, существующий в природе, или включать два или более непрерывных участков нуклеотидов из различных источников (встречающихся в природе и/или синтетических), соединенных с образованием одного полинуклеотида. Типично такие химерные полинуклеотиды включают по крайней мере открытую рамку считывания, кодирующую полипептид настоящего изобретения, функционально связанную с промотором, подходящим для активации транскрипции открытой рамки считывания в представляющей интерес клетке.

Что касается определенных полинуклеотидов, будет понятно, что процентные значения идентичности, превышающие значения, предоставленные выше, будут охватывать предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, где применимо, ввиду минимальных процентных значений идентичности, предпочтительно, когда полинуклеотид включает полинуклеотидную последовательность, которая идентична на по крайней мере 50%, более предпочтительно на по крайней мере 60%, более предпочтительно на по крайней мере 65%, более предпочтительно

на по крайней мере 70%, более предпочтительно на по крайней мере 75%, более предпочтительно на по крайней мере 80%, более предпочтительно на по крайней мере 85%, более предпочтительно на по крайней мере 90%, более предпочтительно на по крайней мере 91%, более предпочтительно на по крайней мере 92%, более предпочтительно на по крайней мере 93%, более предпочтительно на по крайней мере 94%, более предпочтительно на по крайней мере 95%, более предпочтительно на по крайней мере 96%, более предпочтительно на по крайней мере 97%, более предпочтительно на по крайней мере 98%, более предпочтительно на по крайней мере 99%, более предпочтительно на по крайней мере 99,1%, более предпочтительно на по крайней мере 99,2%, более предпочтительно на по крайней мере 99,3%, более предпочтительно на по крайней мере 99,4%, более предпочтительно на по крайней мере 99,5%, более предпочтительно на по крайней мере 99,6%, более предпочтительно на по крайней мере 99,7%, более предпочтительно на по крайней мере 99,8% и даже более предпочтительно на по крайней мере 99,9% соответствующей указанной SEQ ID NO.

Полинуклеотид, или применимый для, настоящего изобретения может селективно гибридизоваться, в жестких условиях, с определенным здесь полинуклеотидом. Как здесь используются, жесткие условия представляют собой условия, в которых: (1) используется во время гибридизации денатурирующий агент, такой как формамид, например, 50% (в объемном отношении) формамида вместе с 0,1% (в отношении веса к объему) бычьего сывороточного альбумина, 0,1% Фикола, 0,1% поливинилпирролидона, 50 мМ натрий-фосфатным буфером при pH 6,5 вместе с 750 мМ NaCl, 75 мМ цитратом натрия при 42°C; или (2) используется 50% формамида, 5 × SSC (0,75M NaCl, 0,075M цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 6,8), 0,1% пирогосфата натрия, 5 × раствор Денхардта, озвученная ультразвуком ДНК из молок лососевых (50 г/мл), 0,1% SDS и 10% декстрана сульфата при 42°C в 0,2 × SSC и 0,1% SDS, и/или (3) используется низкая ионная сила и высокая температура для промывки, например, 0,015M NaCl/0,0015M цитрат натрия/0,1% SDS при 50°C.

Полинуклеотиды настоящего изобретения могут обладать, по сравнению со встречающимися в природе молекулами, одной или более мутаций, которые представляют собой делеции, вставки или замены нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды, которые имеют мутации по сравнению со ссылкой последовательностью, могут быть или встречающимися в природе (другими словами, выделенными из природного источника) или синтетическими (например, в результате выполнения сайт-направленного мутагенеза или перетасовки участков ДНК на нуклеиновой кислоте, описанной выше).

Полинуклеотиды для уменьшения уровней экспрессии эндогенных белков

В одном варианте осуществления клетка/семя/растение/организм настоящего изобретения включает введенную мутацию или экзогенный полинуклеотид, которая(ый) снижает продукцию и/или активность эндогенного фермента, типично которая(ый) приводит к увеличенной продукции олеиновой кислоты и предпочтительно уменьшенной продукции пальмитиновой кислоты и PUFA, такой как линолевая кислота, по сравнению с соответствующей клеткой, в которой отсутствует введенная мутация или экзогенный полинуклеотид. Примеры таких полинуклеотидов включают антисмысловой полинуклеотид, смысловой полинуклеотид, каталитический полинуклеотид, микроРНК, полинуклеотид, который кодирует полипептид, который связывается с эндогенным ферментом и двухцепочечной РНК.

РНК-интерференция

РНК-интерференция, в частности, применима для специфического ингибирования продукции конкретного белка. Эта технология основывается на присутствии молекул дцРНК, которые содержат последовательность, которая по существу идентична мРНК с представляющего интерес гена или его части, и комплементарную ей последовательность. Без труда дцРНК можно продуцировать с одного промотора в рекомбинантном векторе или клетке-хозяине, причем смысловая и антисмысловая последовательности ковалентно соединены с помощью последовательности, предпочтительно неродственной последовательности, которая делает возможной

гибридизацию смысловой и антисмысловой последовательностей в соответствующем транскрипте с образованием молекулы дцРНК с соединяющей последовательностью, образующей петлевую структуру, хотя последовательность с идентичностью РНК-мишени или ее комплементу может образовывать петлевую структуру. Типично дцРНК кодируется двухцепочечной ДНК-конструкцией, которая содержит смысловую и антисмысловую последовательности в структуре инвертированного повтора, организованные в виде прерванного палиндрома, причем повторяющиеся последовательности транскрибируются с образованием гибридизующихся последовательностей в молекуле дцРНК, а последовательность прерывания транскрибируется с образованием петлевого участка в молекуле дцРНК. Разработка и продукция подходящих молекул дцРНК находится полостью в компетентности квалифицированного в данной области техники специалиста, особенно принимая во внимание Waterhouse et al. (1998), Smith et al. (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029 и WO 01/34815.

В одном примере вводят ДНК, которая направляет синтез по крайней мере продукта(ов) в виде частично двухцепочечной РНК с гомологией, предпочтительно по крайней мере 19 следующими друг за другом нуклеотидами, комплементарными участку, РНК-мишени, который должен быть инактивирован. Следовательно, ДНК включает и смысловую, и антисмысловую последовательности, которые, после транскрибирования в РНК, могут гибридизоваться с образованием района двухцепочечной РНК. В одном варианте осуществления настоящего изобретения смысловая и антисмысловая последовательности разделены районом-спейсером, который включает интрон, который, после транскрибирования в РНК, вырезается. Эта организация, как было установлено, приводит к большей эффективности сайленсинга гена. Район двухцепочечной РНК может включать одну или две молекулы РНК, транскрибированные или с одного района РНК, или с двух. Полагают, что присутствие двухцепочечной молекулы инициирует ответную реакцию эндогенной системы, которая разрушает как двухцепочечную РНК, так и гомологичный РНК-транскрипт с гена-мишени, эффективно уменьшая или устраняя активность гена-

мишени.

Длина каждой из смысловой и антисмысловой последовательностей, подвергаемых гибридизации, должна составлять по крайней мере 19 следующих друг за другом нуклеотидов, соответствующих части мРНК-мишени. Может использоваться полноразмерная последовательность, соответствующая транскрипту со всего гена. Степень идентичности смысловой и антисмысловой последовательностей с заданным транскриптом должна составлять по крайней мере 85%, по крайней мере 90% или по крайней мере 95-100%. Молекула РНК может, конечно, включать неродственные последовательности, которые могут функционировать для стабилизации молекулы. Молекула РНК может экспрессироваться под контролем промотора для РНК-полимеразы II или РНК-полимеразы III. Примеры последнего включают промоторы для тРНК или небольшой ядерной РНК.

Предпочтительные молекулы коротких интерферирующих РНК («киРНК») включают нуклеотидную последовательность, которая идентична приблизительно 19-21 следующим друг за другом нуклеотидам мРНК-мишени. Предпочтительно последовательность киРНК начинается с динуклеотида АА, характеризуется GC-содержанием, составляющим приблизительно 30-70% (предпочтительно, 30-60%, более предпочтительно 40-60% и более предпочтительно приблизительно 45-55%), и не обладает высоким процентом идентичности с любой нуклеотидной последовательности, отличной от мишени в геноме организма, в который ее вводят, например, как определено с помощью стандартного поиска BLAST.

В качестве примера, дцРНК настоящего изобретения включает нуклеотидную последовательность, представленную как любая из SEQ ID NO: 49-51 (в случаях, когда Т заменяется U).

микроРНК

МикроРНК (сокращенно миРНК), как правило, представляют собой молекулы (19-25)-нуклеотидных (обычно приблизительно (20-24)-нуклеотидных в растениях) некодирующих РНК, которые происходят из более больших предшественников, которые образуют несовершенные структуры «петля на стебле».

МикроРНК связываются с комплементарными

последовательностями в транскриптах – информационных РНК (мРНК), обычно приводя к подавлению трансляции или деградации мишени и сайленсингу гена.

В клетках растений молекулы-предшественники микроРНК, как полагают, вначале подвергаются процессингу в ядре. Исходная микроРНК (содержащая один или более локальных двухцепочечных или «шпилечных» районов, а также обычный 5' «кэп» и полиаденилированный хвост мРНК) подвергаются процессингу до более короткой молекулы-предшественника микроРНК, которая также включает структуру «петля на стебле» или самогибридирующуюся структуру и называется «пре-микроРНК». В растениях, пре-микроРНК расщепляется особыми DICER-подобными (DCL) ферментами, в частности, DCL-1, продуцируя дуплексы микроРНК:микроРНК*. До переноса из ядра, эти дуплексы метилируются. Напротив, молекулы шпилечных РНК, имеющие более длинные районы дцРНК, подвергаются процессингу, в частности, под действием DCL-3 и DCL-4.

В цитоплазме цепь микроРНК из дуплекса микроРНК:микроРНК селективно включается в активный РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) для распознавания мишени. RISC-комплексы содержат особую подгруппу белков Argonaute, которые вызывают специфическую в отношении последовательности репрессию гена посттранскрипционно (см., например, Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida and Allshire, 2005).

Косупрессия

Гены могут подавлять экспрессию родственных эндогенных генов и/или трансгенов, уже присутствующих в геноме, феномен, названный зависимым от гомологии сайленсингом генов. Большая часть случаев зависимого от гомологии сайленсинга генов разделяются на два класса – те, которые функционируют на уровне транскрипции трансгена, и те, которые функционируют посттранскрипционно.

Посттранскрипционный зависимый от гомологии сайленсинг генов (т.е. косупрессия) характеризуется уменьшением экспрессии трансгена и родственных эндогенных или вирусных генов в трансгенных растениях. Косупрессия часто, но не всегда, имеет место, когда транскрипты с трансгена присутствуют в большом

количестве, и она, как обычно считают, инициируется на уровне процессинга РНК, ее локализации и/или деградации. Существует несколько моделей, объясняющих, каким образом косупрессия работает (см. в Taylor, 1997).

Косупрессия включает введение дополнительной копии гена или его фрагмента в растение в смысловой ориентации по отношению к промотору для ее экспрессии. Квалифицированному специалисту будет понятно, что размер смыслового фрагмента, его соответствие районам гена-мишеням и степень идентичности его последовательности гену-мишени может варьировать. В некоторых случаях дополнительная копия последовательности гена мешает экспрессии гена-мишени в растении. Приводится ссылка на WO 97/20936 и EP 0465572 для способов осуществления методов косупрессии.

Экспрессионный вектор

Как здесь используется, «экспрессионный вектор» представляет собой ДНК или РНК-вектор, который способен трансформировать клетку-хозяина и осуществлять экспрессию одного или более определенных полинуклеотидов. Предпочтительно, когда экспрессионный вектор также способен реплицироваться в клетке-хозяине или интегрироваться в геном клетки-хозяина. Экспрессионные векторы типично являются вирусами или плазмидами. Экспрессионные векторы настоящего изобретения включают любые векторы, которые функционируют (т.е. управляют экспрессией генов) в клетках-хозяевах настоящего изобретения, включая клетки грибов, водорослей и растений.

«Функционально связанные», как здесь используется, относится к функциональной связи между двумя или более сегментами нуклеиновых кислот (например, ДНК). Типично он относится к функциональной связи регулирующего транскрипцию элемента (промотора) с транскрибируемой последовательностью. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью полинуклеотида, определенного здесь, если он стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в подходящей клетке. Как правило, регулирующие транскрипцию элементы промотора, которые

функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, являются физически соприкасающимися с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются действующими в цис-положении. Однако, некоторые регулирующие транскрипцию элементы, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически соприкасающимися с кодирующими последовательностями, чью транскрипцию они усиливают, или расположенными в непосредственной близости от них.

Экспрессионные векторы настоящего изобретения содержат регуляторные последовательности, такие как контролирующие транскрипцию последовательности, контролирующие трансляцию последовательности, начала репликации и другие регуляторные последовательности, которые совместимы с клеткой-хозяином и которые контролируют экспрессию полинуклеотидов настоящего изобретения. В частности, экспрессионные векторы настоящего изобретения включают контролирующие транскрипцию последовательности. Контролирующие транскрипцию последовательности представляют собой последовательности, которые контролируют инициацию, элонгацию и терминацию транскрипции. Особенно важными контролирующими транскрипцию последовательностями являются те, которые контролируют инициацию транскрипции, такие как последовательности промотора, энхансера, оператора и репрессора. Подходящие контролирующие транскрипции последовательности включают любую контролирующую транскрипцию последовательность, которая может функционировать в по крайней мере одной из рекомбинантных клеток настоящего изобретения. Выбор используемых регуляторных последовательностей зависит от организма-мишени, такого как растение, и/или являющегося мишенью органа или ткани, представляющего интерес. Такие регуляторные последовательности можно получить из любого эукариотического организма, такого как растения или вирусы растений, или можно химически синтезировать. Ряд таких контролирующих транскрипцию последовательностей известен квалифицированным в данной области техники специалистам. Особенно предпочтительными контролирующими транскрипцию последовательностями являются

промоторы, эффективные в управлении транскрипцией в растениях, или конститутивной, или специфической в отношении стадии и/или ткани, в зависимости от использования растения или его части(ей).

Ряд векторов, подходящих для устойчивой трансфекции клеток растений или для создания трансгенных растений, был описан, например, в Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989, и Gelvin et al, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Типично векторы для экспрессии в растениях включают, например, один или более клонированных генов растений под транскрипционным контролем 5' и 3' регуляторных последовательностей и доминантный селектируемый маркер. Такие векторы для экспрессии в растениях также могут содержать промоторный регуляторный район (например, регуляторный район, контролирующий индуцируемую или конститутивную, регулируемую условиями окружающей среды или стадиями развития, или клеточно-или тканеспецифическую экспрессию), сайт начала транскрипции, участок связывания рибосомы, сигнал процессинга РНК, сайт терминации транскрипции и/или сигнал полиаденилирования.

Был описан ряд конститутивных промоторов, которые являются активными в клетках растений. Подходящие промоторы для конститутивной экспрессии в растениях включают, но без ограничения, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV), 35S вируса мозаики норичника (FMV), промотор бактериального вируса сахарного тростника, промотор вируса желтой мозаики Commelina, светоиндуцируемый промотор из гена малой субъединицы рибулозо-1,5-бис-фосфат-карбоксилазы, промотор гена цитозольной триозофосфатизомеразы риса, промотор гена аденин-фосфорибозилтрансферазы Arabidopsis, промотор гена актина 1 риса, промоторы генов моннопинсинтазы и октопинсинтазы, промотор Adh, промотор гена сахарозосинтазы, комплексный промотор гена R и промотор гена хлорофильного α/β связывающего белка. Эти промоторы использовались для создания

ДНК-векторов, которые были экспрессированы в растениях, см., например, WO 84/02913. Все из этих промоторов использовались для создания различных типов экспрессируемых в растениях рекомбинантных ДНК-векторов.

С целью экспрессии в исходных тканях растения, таких как лист, семя, корень или стебель, предпочтительно, когда промоторы, используемые в настоящем изобретении, характеризуются относительно высокой экспрессией в этих конкретных тканях. Для этой цели может быть выбран промотор из ряда промоторов для генов с ткане- или клеточноспецифической, или увеличенной в ткани(ях) или клетке(ях) экспрессией. Примеры таких промоторов, о которых сообщалось в литературе, включают промотор гена хлоропластной глутаминсинтазы GS2 гороха, промотор гена хлоропластной фруктозо-1,6-бисфосфатазы пшеницы, промотор ядерного фотосинтетического гена ST-LS1 картофеля, промотор гена серин/треонин-киназы и промотор гена глюкоамилазы (CHS) из *Arabidopsis thaliana*.

Для экспрессии генов РНК-связывающих белков в клетках растений может также использоваться ряд промоторов генов растений, которые регулируются в ответ на сигналы окружающей среды, гормональные, химические и/или относящиеся к развитию сигналы, в том числе промоторы, регулируемые с помощью (1) нагревания, (2) освещения (например, промотор RbcS-3A гороха, промотор RbcS кукурузы), (3) гормонов, таких как абсцизовая кислота, (4) скарификации (например, WunI) или (5) химических веществ, таких как метилжасмонат, салициловая кислота, стероидные гормоны, спирты, Сафенеры (WO 97/06269), и выгодным может также быть использование (6) органоспецифических промоторов.

Используемый здесь термин «специфический для органа запасаения растения промотор» относится к промотору, который предпочтительно, по сравнению с другими тканями, управляет транскрипцией гена в органе запасаения растения. Предпочтительно органом запасаения является семя. Предпочтительно промотор только управляет экспрессией представляющего интерес гена в органе запасаения, и/или экспрессия представляющего интерес гена

в других частях растения, таких как листья, является невыявляемой с помощью анализа с использованием Нозерн-блота и/или ПЦР в режиме реального времени. Типично промотор управляет экспрессией генов во время роста и развития органа запасаания, в частности, во время фазы синтеза и накопления запасаемых соединений в органе запасаания. Такие промоторы могут управлять экспрессией генов во всем органе запасаания растения или только в его части, такой как оболочка семени, зародыш или семядоля(и) в семенах двудольных растений или эндосперм или алейроновый слой семян однодольных растений.

Другие промоторы могут также использоваться для экспрессии белка в конкретных тканях, таких как семена или плоды. Может использоваться промотор для β -конглицинина или другие специфические для семени промоторы, такие как промоторы генов напина, зеина, линина и фазеолина. В одном варианте осуществления промотор управляет экспрессией в тканях и органах, в которых происходит биосинтез липидов. Такие промоторы функционируют в ходе развития семян в подходящий момент времени для модификации состава липидов в семени. В одном варианте осуществления промотором, специфическим для органа запасаания растения, является специфический для семени промотор. В более предпочтительном варианте осуществления промотор преимущественно управляет экспрессией в зародыше и/или семядолях двудольного растения или в эндосперме однодольного растения, по сравнению с экспрессией в других органах в растении, таких как листья. Предпочтительные промоторы для специфической в отношении семени экспрессии включают: 1) промоторы из генов, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе липидов и их накоплении в семенах, такие как десатуразы и элонгазы, 2) промоторы из генов, кодирующих запасаемые в семенах белки, и 3) промоторы из генов, кодирующих ферменты, участвующие в биосинтезе углеводов и их накоплении в семенах. Специфическими для семени промоторами, которые являются подходящими, являются промотор гена линина льна (например, промоторы Cnl1 или Cnl2), промотор гена напина

масличного рапса (патент США с № 5608152), промотор USP *Vicia fabar* (Baumlein et al., 1991), промотор гена олеозина *Arabidopsis* (WO 98/45461), промотор гена фазеолина *Phaseolus vulgaris* (патент США с № 5504200), промотор *Bce4* Brassica (WO 91/13980) или промотор гена легумина B4 (Baumlein et al., 1992), и промоторы, которые приводят к специфической в отношении семени экспрессии в однодольных растениях, таких как кукуруза, ячмень, пшеница, рожь, рис и т.п. Известными промоторами, которые являются подходящими, являются промотор гена *lpt2* или *lpt1* ячменя (WO 95/15389 и WO 95/23230) или промоторы, описанные в WO 99/16890 (промоторы из гена гордеина ячменя, гена глютелина риса, гена оризина риса, гена проламина риса, гена глиаина пшеницы, гена глютелина пшеницы, гена зеина кукурузы, гена глютелина овса, гена касирин сорго, гена секалина ржи). Другие промоторы включают промоторы, описанные Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), в US 20070192902 и US 20030159173. В варианте осуществления специфический для семени промотор преимущественно экспрессируется в определенных частях семени, таких как зародыш, семядоля(и) или эндосперм. Примеры специфических для семядоли промоторов включают, но без ограничения, промотор FP1 (Ellerstrom et al., 1996), промотор гена легумина гороха (Perrin et al., 2000) и промотор гена фитогемагглютинаина фасоли (Perrin et al., 2000). В дальнейшем варианте осуществления специфический для семени промотор не экспрессируется или экспрессируется лишь на низком уровне в зародыше и/или после прорастания семени.

В случае присутствия множества промоторов, каждый промотор может быть независимым одинаковым или отличным.

5' нетранслируемая лидерная последовательность может происходить из промотора, выбранного для экспрессии гетерологичной генной последовательности полинуклеотида, или может быть гетерологичной по отношению к области, кодирующей продуцируемый фермент, и может быть специфически модифицированной, при желании, для увеличения трансляции мРНК.

Терминация транскрипции осуществляется с помощью 3' нетранслируемой последовательности ДНК, функционально связанной

в экспрессионном векторе с представляющим интерес полинуклеотидом. 3' нетранслируемый район рекомбинантной молекулы ДНК содержит сигнал полиаденилирования, который функционирует в растениях с вызовом добавления нуклеотидов аденилатов к 3' концу РНК. 3' нетранслируемый район может быть получен из различных генов, которые экспрессируются, например, в клетках растений. 3' нетранслируемый район гена нопалинсинтазы, 3' нетранслируемый район из гена малой субъединицы Rubisco гороха, 3' нетранслируемый район из гена запасаемого в семени белка 7S сои обычно используются в этом объеме. 3' транскрибируемые, нетранслируемые районы, содержащие сигнал полиаденилирования из генов индуцирующей опухоль (Ti) плазмиды *Agrobacterium* (Ti) также являются подходящими.

Технологии рекомбинантных ДНК могут использоваться для увеличения экспрессии с трансформированного полинуклеотида посредством манипуляции, например, числом копий полинуклеотида в клетке-хозяине, эффективностью, с которой этот полинуклеотид транскрибируется, эффективностью, с которой получающиеся в результате транскрипты транслируются, и эффективностью, посттрансляционных модификаций.

Для облегчения идентификации трансформантов, рекомбинантный вектор желателно включает селектируемый или скринабельный ген-маркер в виде, или помимо, нуклеотидной последовательности полинуклеотида, определенного здесь. Под «геном-маркером» подразумевается ген, который придает особый фенотип клеткам, экспрессирующим ген-маркер, и, таким образом, позволяет отличить трансформированные клетки от клеток, которые не содержат маркер. Селектируемый ген-маркер придает особенность, по которой может осуществляться отбор на основе устойчивости к агенту для отбора (например, гербициду, антибиотику, излучению, нагреванию или другой обработке, причиняющей вред нетрансформированным клеткам). Скринабельный ген-маркер (или ген-репортер) придает особенность, которую можно идентифицировать благодаря наблюдению или проверке, т.е. посредством скрининга, (например, β -глюкуронидазную,

люциферазную, GFP или другую ферментативную активность, не присутствующую в нетрансформированных клетках). Ген-маркер и нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, не должны быть сцепленными, поскольку котрансформация несцепленных генов, описанная, например, в патенте США с № 4399216, также является эффективным процессом в случае, например, трансформации растений. Фактический выбор маркера не является критическим при условии, что он является функциональным (т.е. селективным) в комбинации с предпочтительными клетками, такими как клетка растения.

Приводимые в качестве примера селектируемые маркеры для отбора растений-трансформантов включают, но без ограничения, ген *hug*, который кодирует устойчивость к гигромицину В; ген неомисин-фосфотрансферазы (*nptII*), придающий устойчивость к канамицину, паромомицину, G418; ген глутатион-S-трансферазы из печени крысы, придающий устойчивость к гербицидам, являющимся производными глутатиона, который, например, описан в EP 256223; ген глутаминсинтетазы, придающий, при сверхэкспрессии, устойчивость к ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как фосфинотрицин, который, например, описан в WO 87/05327; ген ацетилтрансферазы из *Streptomyces viridochromogenes*, придающий устойчивость к агенту для отбора - фосфинотрицину, который, например, описан в EP 275957; ген, кодирующий 5-енолпирикат-3-фосфат-синтазу (EPSPS), придающий устойчивость к N-фосфометилглицину, который, например, описан Hinchey et al. (1988); ген *bar*, придающий устойчивость к биалофосу, который, например, описан в W091/02071; ген нитрилазы, такой как *bxn* из *Klebsiella ozaenae*, который придает устойчивость к бромоксилину (Stalker et al., 1988); ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), который придает устойчивость к метотрексату (Thillet et al., 1988); мутантный ген ацетолактатсинтазы (ALS), который придает устойчивость к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (EP 154204); мутированный ген антранилатсинтазы, который придает устойчивость к 5-метилтриптофану; или ген далапондегалогепазы, который придает устойчивость к гербициду.

Предпочтительные скринабельные маркеры включают, но без ограничения, ген *uidA*, кодирующий фермент β -глюкуронидазу (GUS), для которого известны различные хромогенные субстраты; ген β -галактозидазы, кодирующий фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты; ген экворина (Prasher et al., 1985), который может использоваться для чувствительного к кальцию биолюминесцентного детектирования; ген зеленого флуоресцентного белка (Niedz et al., 1995) или его производные; или ген люциферазы (*luc*) (Ow et al., 1986), который создает возможность для биолюминесцентного детектирования. Под «репортерной молекулой» подразумевается молекула, которая, по своей химической природе, обеспечивает аналитически идентифицируемый сигнал, который помогает определению активности промотора согласно белковому продукту.

Предпочтительно, когда рекомбинантный вектор устойчиво включается в геном клетки, такой как клетка растения. Соответственно, рекомбинантный вектор может включать соответствующие элементы, которые позволяют вектору включиться в геном, или в хромосому клетки.

Транспортные нуклеиновые кислоты

Транспортные нуклеиновые кислоты могут использоваться для доставки экзогенного полинуклеотида в клетку и включают одну, предпочтительно две, пограничные последовательности и представляющий интерес полинуклеотид. Транспортная нуклеиновая кислота может кодировать или может не кодировать селективируемый маркер. Предпочтительно, когда транспортная нуклеиновая кислота образует часть бинарного вектора в бактерии, причем бинарный вектор, кроме того, включает элементы, которые делают возможной репликацию вектора в бактерии, отбор или сохранение бактериальных клеток, содержащих бинарный вектор. После переноса в эукариотическую клетку, являющийся транспортной нуклеиновой кислотой компонент бинарного вектора способен к интеграции в геном эукариотической клетки.

Используемый здесь термин «экстрахромосомная транспортная нуклеиновая кислота» относится к молекуле нуклеиновой кислоты,

которая может быть перенесена из бактерии, такой как *Agrobacterium sp.*, в эукариотическую клетку, такую как клетка растения. Экстрахромосомная транспортная нуклеиновая кислота является генетическим элементом, который широко известен как элемент, который может быть перенесен, с последующей интеграцией нуклеотидной последовательности, содержащейся внутри ее границ, в геном реципиентной клетке. В связи с этим, транспортная нуклеиновая кислота фланкирована, типично, двумя «пограничными» последовательностями, хотя в некоторых случаях одна пограничная последовательность на одном конце может использоваться, а второй конец перенесенной нуклеиновой кислоты создается произвольно в процессе переноса. Представляющий интерес полинуклеотид типично находится между последовательностью вроде левой пограничной последовательности и последовательностью вроде правой пограничной последовательности транспортной нуклеиновой кислоты. Полинуклеотид, содержащийся в транспортной нуклеиновой кислоте, может быть функционально связан с рядом различных промоторных и регулирующих терминирования элементов, которые помогают его экспрессии, т.е. транскрипции и/или трансляции полинуклеотида. Транспортные ДНК (Т-ДНК) из *Agrobacterium sp.*, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, и их искусственные варианты/мутанты, вероятно, являются наиболее охарактеризованными примерами транспортных нуклеиновых кислот. Другим примером является Р-ДНК («растительная ДНК»), которая включает последовательности вроде пограничных последовательностей Т-ДНК из растений.

Как здесь используется, «Т-ДНК» относится, например, к Т-ДНК Ti плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* или из Ri плазмиды *Agrobacterium rhizogenes*, или их искусственным вариантам, которые функционируют как Т-ДНК. Т-ДНК может включать всю Т-ДНК, включая и правую и левую пограничные последовательности, но должна лишь включать минимальные последовательности, необходимые в цис для переноса, т.е. правую и относящуюся к Т-ДНК пограничную последовательность. Т-ДНК настоящего изобретения содержат вставленный в них, где-нибудь между правой

и левой пограничными последовательностями (в случае их присутствия), представляющий интерес полинуклеотид. Последовательности, кодирующие факторы, необходимые в транс для переноса Т-ДНК в клетку растения, такие как гены *vir*, могут быть вставлены в Т-ДНК, или могут присутствовать в том же репликоне, что и Т-ДНК, или предпочтительно находятся в транс-положении в совместимом репликоне в хозяине *Agrobacterium*. Такие «бинарные векторные системы» хорошо известны в данной области техники.

Как здесь используется, «Р-ДНК» относится к транспортной нуклеиновой кислоте, выделенной из генома растения, или ее искусственным вариантам/мутантам и включает на каждом конце, или только на одном конце, последовательность вроде пограничной последовательности Т-ДНК. Последовательность вроде пограничной последовательности предпочтительно идентична на по крайней мере 50%, по крайней мере 60%, по крайней мере 70%, по крайней мере 75%, по крайней мере 80%, по крайней мере 90% или по крайней мере 95%, но менее чем 100% пограничной последовательности Т-ДНК из *Agrobacterium sp.*, например, *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*. Таким образом, Р-ДНК могут использоваться вместо Т-ДНК для переноса нуклеотидной последовательности, содержащейся в Р-ДНК, из, например, *Agrobacterium*, в другую клетку. Р-ДНК, перед вставкой экзогенного полинуклеотида, который должен быть перенесен, можно модифицировать для облегчения клонирования, и она предпочтительно не должна кодировать какой-либо белок. Р-ДНК характеризуется тем, что она содержит по крайней мере правую пограничную последовательность и предпочтительно также левую пограничную последовательность.

Как здесь используется, «пограничная» последовательность транспортной нуклеиновой кислоты можно быть выделенной из выбранного организма, такого как растение или бактерия, или быть ее искусственным вариантом/мутантом. Пограничная последовательность активизирует и облегчает перенос полинуклеотида, с которым она связана, и может способствовать его интеграции в геном реципиентной клетки. В варианте

осуществления длина пограничной последовательности составляет 5-100 пар оснований (п.о.), 10-80 п.о., 15-75 п.о., 15-60 п.о., 15-50 п.о., 15-40 п.о., 15-30 п.о., 16-30 п.о., 20-30 п.о., 21-30 п.о., 22-30 п.о., 23-30 п.о., 24-30 п.о., 25-30 п.о. или 26-30 п.о. Пограничные последовательности из Т-ДНК из *Agrobacterium sp.* хорошо известны в данной области техники и включают те, которые описаны в Lacroix et al. (2008), Tzfira and Citovsky (2006) и Glevin (2003).

Хотя традиционно только *Agrobacterium sp.* использовались для переноса генов в клетки растений, в настоящее время существует большое количество систем, которые были идентифицированы/разработаны, которые работают аналогично *Agrobacterium sp.* Некоторые не относящиеся к *Agrobacterium* виды были недавно генетически модифицированы, чтобы быть компетентными для переноса генов (Chung et al., 2006; Broothaerts et al., 2005). Они включают *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meliloti* и *Mezorhizobium loti*. Бактерии сделаны компетентными в отношении переноса генов посредством обеспечения бактерии аппаратом, необходимым для процесса трансформации, т.е. рядом генов вирулентности, кодируемых Ti-плазмидой *Agrobacterium*, и сегментом Т-ДНК, находящимся на отдельной, небольшой бинарной плазмиде. Бактерии, созданные таким образом, способны трансформировать различные ткани растений (листовые диски, каллусы и яйцеклетки), однодольных или двудольных растений, и различные другие виды растений (например, табак, рис).

Как здесь используются, термины «трансфекция», «трансформация» и их вариации, как правило, используются взаимозаменяемо. «Трансфецированные» или «трансформированные» клетки могут быть подвергнуты обработке для введения полинуклеотида(ов), представляющего интерес, или могут быть клетками-потомками, происходящими от них.

Рекомбинантные клетки

Настоящим изобретением также обеспечивается рекомбинантная клетка, например, рекомбинантная клетка растения, которая является клеткой-хозяином, трансформированной одним или более

полинуклеотидов или векторов, определенных здесь, или их комбинацией. Термин «рекомбинантная клетка» используется взаимозаменяемо с термином «трансгенная клетка» здесь. Подходящие клетки настоящего изобретения включают любую клетку, которую можно трансформировать полинуклеотидом или рекомбинантным вектором настоящего изобретения, кодирующим, например, полипептид или фермент, описываемый здесь. Предпочтительно клеткой является клетка, которая в связи с этим может использоваться для продукции липида. Рекомбинантная клетка может представлять собой клетку в культуре, клетку *in vitro*, или в организме, таком как, например, растение, или в органе, таком как, например, семя или лист. Предпочтительно клетка находится в растении, более предпочтительно в семени растения, более предпочтительно в семени масличного растения, такого как сафлор. В варианте осуществления клетка растения включает липид или масло, имеющий жирнокислотный состав, описываемый здесь.

Клетки-хозяева, в которые вводят полинуклеотид(ы), могут быть или нетрансформированными клетками, или клетками, которые уже трансформированы по крайней мере одной нуклеиновой кислотой. Такие нуклеиновые кислоты могут быть связаны с синтезом липидов, или не связаны с ним. Клетки-хозяева настоящего изобретения или могут быть эндогенно (т.е. по своей природе) способными к продукции полипептида(ов), определенных здесь, в этом случае рекомбинантная клетка, происходящая от них, обладает увеличенной способностью продуцировать полипептид(ы), или могут быть способны продуцировать указанный полипептид(ы) только после трансформации по крайней мере одним полинуклеотидом настоящего изобретения. В варианте осуществления рекомбинантная клетка настоящего изобретения обладает увеличенной способностью продуцировать неполярный липид. Клетки могут быть прокариотическими или эукариотическими. Предпочтительными клетками-хозяевами являются дрожжевые клетки, клетки водорослей и растений. В предпочтительном варианте осуществления клеткой растения является клетка семени, в частности, клетка в семядоли или

эндосперме семени. Примеры клеток водорослей, применимых в качестве клеток-хозяев настоящего изобретения, включают, например, *Chlamydomonas* sp. (например, *Chlamydomonas reinhardtii*), *Dunaliella* sp., *Haematococcus* sp., *Chlorella* sp., *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp. и *Volvax* sp.

Клетки-хозяева могут быть клетками организма, подходящего для процесса сбраживания, такого как, например, *Yarrowia lipolytica* или другие дрожжи.

Трансгенные растения

Настоящим изобретением также обеспечивается растение, включающее экзогенный полинуклеотид или полипептид настоящего изобретения, клетку настоящего изобретения, вектор настоящего изобретения или их комбинацию. Термин «растение» относится к целым растениям, в то время как термин «его часть» относится к органам растения (например, листьям, стеблям, корням, цветкам, плодам), отдельным клеткам (например, пыльце), семени, частям семени, таким как зародыш, эндосперм, скutelлум или оболочка семени, ткани растения, такой как сосудистая ткань, клеткам растения и их потомкам. Как здесь используются, части растения включают клетки растения.

Как здесь используется, термин «растение» используется в самом широком значении. Он включает, но без ограничения, любой вид травы, декоративного растения, культуры или хлебного злака (например, масличных растений, кукурузы, сои), кормового растения, плодового или овощного растения, лекарственной травы, древесного растения, цветущего растения или дерева. Не подразумевается ограничение растения какой-либо конкретной структурой. Он также относится к одноклеточному растению (например, микроводорослям). Термин «его часть» в отношении растения относится к клетке растения и ее потомству, множеству клеток растений, которые в значительной мере дифференцированы внутри колонии, (например, вольвоксу), структуре, которая присутствует на любой стадии развития растения, или ткани растения. Такие структуры включают, но без ограничения, листья, стебли, цветки, плоды, орехи, корни, семя, оболочку семени, зародыши. Термин «ткань растения» включает дифференцированные и

недифференцированные ткани растений, в том числе те, которые присутствуют в листьях, стеблях, цветках, плодах, орехах, корнях, семени, например, зародышевую ткань, эндосперм, ткань кожного покрова (например, эпидермис, перидерму), сосудистую ткань (например, ксилему, флоэму) или покровную ткань (включающую паренхиму, колленхиму и/или клетки склеренхимы), а также клетки в культуре (например, отдельные клетки, протопласты, каллус, зародыши и т.д.). Ткань растения может находиться в растении, в органной культуре, культуре тканей или культуре клеток.

«Трансгенное растение», «генетически модифицированное растение» или его варианты относятся к растению, которое содержит трансген, не встречающийся в растении дикого типа того же вида, сорта или культивара. Трансгенные растения, определяемые в связи с настоящим изобретением, включают растения и их потомков, которые были генетически модифицированы, используя рекомбинантные методы, для вызова продукции по крайней мере одного полипептида, определенного здесь, в желаемом растении или его части. «Части трансгенного растения» имеют соответствующее значение.

Термины «семя» и «зерно» являются родственными терминами, используемыми здесь, и имеют частично совпадающие значения. «Зерно» относится к зрелому зерну, например, собранному зерну, или зерну, которое все еще находится на растении, но готово для сбора, но может также относиться к зерну после насыщения влагой или прорастания, в соответствии с контекстом. Зрелое зерно обычно имеет содержание влаги, составляющее менее чем приблизительно 18-20%. «Семя» включает «развивающееся семя», а также «зерно», которое является зрелым зерном, но не зерном после насыщения влагой или прорастания. «Развивающееся семя», как здесь используется, относится к семени до созревания, типично встречающемуся в репродуктивных структурах растения после опыления или цветения, но может также относиться к таким семенам до созревания, которые выделяют из растения. Развитие семени в растении типично делится на раннюю, среднюю и позднюю фазы развития.

Используемый здесь термин «орган запасаения растения» относится к части растения, приспособленной для накопления энергии в форме, например, белков, углеводов, липидов. Примерами органов запасаения растения являются семя, плод, клубневидные корни и клубнеплоды. Предпочтительным органом запасаения растения настоящего изобретения является семя.

Как здесь используется, термин «ткань вегетативного органа/части» или «вегетативная часть растения» или его варианты представляет собой любую ткань, орган или часть растения, которая не включает органы полового размножения растений или семяносные органы или близко связанные ткани или органы, такие как цветки, плоды и семена. Ткани вегетативных органов/частей и вегетативные части включают по крайней мере листья, стебли (в том числе стрелки и побеги, но исключая колосья), клубни и корни растений, но исключают цветки, пыльцу, семя, в том числе оболочку семени, зародыш и эндосперм, плод, в том числе ткань межплодника, семянесущие стручки и семянесущие колосья. В одном варианте осуществления вегетативная часть растения является надземной частью растения. В другом или дальнейшем варианте осуществления вегетативная часть растения является зеленой частью, такой как лист или стебель. Вегетативные части включают те части, которые в основном вовлечены в обеспечение или поддержание способности к фотосинтезу растения или связанной функции, или закрепления растения.

Используемый здесь термин «фенотипически нормальное» относится к генетически модифицированному растению или его части, в частности, органу запасаения, такому как семя настоящего изобретения, не обладающему значительно уменьшенной способностью расти и репродуцироваться по сравнению с немодифицированным растением или его частью. В варианте осуществления генетически модифицированное растение или его часть, которое является фенотипически нормальным, включает по крайней мере один экзогенный полинуклеотид, определенный здесь, и обладает способностью расти и репродуцироваться, по существу одинаковой с таковой соответствующего растения или его части,

не включающего указанный полинуклеотид(ы). Предпочтительно, когда биомасса, скорость роста, скорость прорастания, размер органов запаса, размер семени и/или количество образуемых жизнеспособных семян составляет не менее 90% от таковой растения, в котором отсутствует указанный экзогенный полинуклеотид, при выращивании в идентичных условиях. Этот термин не охватывает особенности растения, которые могут быть отличными от таковых растения дикого типа, но которые не влияют на применимость растения для коммерческих целей.

Растения, обеспечиваемые настоящим изобретением или предполагаемые для использования при осуществлении на практике настоящего изобретения, включают и однодольные, и двудольные растения. В предпочтительных вариантах осуществления растениями настоящего изобретения являются культурные растения (например, злаки и зернобобовые, кукуруза, пшеница, картофель, маниок, рис, сорго, просо, маниока, ячмень или горох) или другие бобовые растения. Растения могут выращиваться для получения съедобных корней, клубней, листьев, стеблей, цветков или плодов. Растения могут быть овощными или декоративными растениями. Растениями настоящего изобретения могут быть: сафлор (*Carthamus tinctorius*), кукуруза (*Zea mays*), канولا (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.), другие Brassicas, такие как, например, брюква (*Brassica napobrassica*), горчица (*Brassica juncea*), эфиопская горчица (*Brassica carinata*), крамбе (*Crambe abyssinica*), рыжик (*Camelina sativa*), сахарная свекла (*Beta vulgaris*), клевер (*Trifolium* sp.), лен (*Linum usitatissimum*), люцерна (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), подсолнечник (*Helianthus annuus*), пшеница (*Triticum aestivum*), соя (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Lopmoea batatus*), маниока (*Manihot esculenta*), кофейное дерево (*Cofea* spp.), кокосовая пальма (*Cocos nucifera*), ананас (*Anana comosus*), цитрусовое дерево (*Citrus* spp.), дерево какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia senensis*), банановое дерево (*Musa* spp.),

авокадо (*Persea americana*), фиговое дерево (*Ficus casica*), гуава (*Psidium guajava*), манговое дерево (*Mangifer indica*), маслина европейская (*Olea europaea*), дынное дерево (*Carica papaya*), анакард (*Anacardium occidentale*), макадамия (*Macadamia intergrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), ятрофа (*Jatropha curcas*), люпины, эвкалипты, пальма, орех, шалфей, погамия, овес или ячмень.

Другие предпочтительные растения включают C4-травы, такие как *Andropogon gerardi*, *Bouteloua curtipendula*, *B. gracilis*, *Buchloe dactyloides*, *Panicum virgatum*, *Schizachyrium scoparium*, виды *Miscanthus*, например, *Miscanthus x giganteus* и *Miscanthus sinensis*, *Sorghastrum nutans*, *Sporobolus cryptandrus*, просо прутьевидное (*Panicum virgatum*), сахарный тростник (*Saccharum officinarum*), *Brachyaria*; C3-травы, такие как *Elymus canadensis*, бобовые растения *Lespedeza capitata* и *Petalostemum villosum*, полукустарник *Aster azureus*; и древесные растения, такие как *Quercus ellipsoidalis* и *Q. macrocarpa*.

В предпочтительном варианте осуществления растением является покрытосеменное растение.

В предпочтительном варианте осуществления растением является масличное растение, предпочтительно масличная культура. Как здесь используется, «масличное растение» представляет собой вид растения, используемый для коммерческого получения липида из семян растения. «Коммерческое получение» здесь означает получение липида, предпочтительно масла, для продажи в обмен на прибыль. Масличным растением может быть масличный рапс (такой как канола), кукуруза, подсолнечник, сафлор, соя, сорго, лен (льняное семя) или сахарная свекла. Кроме того, масличным растением могут быть другие *Brassicas*, хлопчатник, арахис, мак, брюква, горчица, клещевина обыкновенная, кунжут, сафлор или образующие орехи растения. Растение, такое как маслина европейская, масличная пальма или кокосовая пальма, может продуцировать высокие уровни липида в своем плоде. Плодоовощными растениями, на которые может распространяться настоящее изобретение, являются салат-латук, цикорийный салак или овощные *Brassicas*, включающие капусту,

брокколи или цветную капусту. Настоящее изобретение может распространяться на табак, тыкву, морковь, клубнику, помидор или перец. Более предпочтительными растениями являются масличные растения, развивающиеся семена которых являются нефотосинтезирующими, также называемые растениями с «белыми семенами», такие как сафлор, подсолнечник, хлопчатник и клещевина.

В предпочтительном варианте осуществления трансгенное растение является гомозиготным по каждому и всякому гену, который был введен, (трансгену), так что его потомки не расщепляется по желаемому фенотипу. Трансгенное растение может также быть гетерозиготным по введенному трансгену(ам), предпочтительно равномерно гетерозиготным по трансгену, например, в F1 потомстве, которое было выращено из гибридного семени. Такие растения могут дать преимущества, такие как гибридная сила, хорошо известные в данной области техники.

Трансформация растений

Трансгенные растения можно создать, используя известные в данной области техники методы, такие как те, которые в целом описаны в Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003), и Christou and Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004).

Используемые здесь термины «устойчивое трансформирование», «устойчиво трансформированный» и их варианты относятся к интеграции полинуклеотида в геном клетки, так что он передается клеткам-потомкам во время деления клетки без необходимости в позитивной селекции в отношении его присутствия. Устойчивые трансформанты, или их потомков, можно отобрать и/или идентифицировать с помощью любого способа, известного в данной области техники, такого как блоттинг по Саузерну на хромосомной ДНК или in situ гибридизация геномной ДНК.

Agrobacterium-опосредованный перенос является широко применимой системой для введения генов в клетки растений, поскольку ДНК можно ввести в клетки в тканях целого растения, органах растения, или экспланты в культуре тканей, или для

транзиторной экспрессии, или для устойчивой интеграции ДНК в геном клетки растения. Для введения ДНК в клетки растения хорошо известно использование векторов для *Agrobacterium*-опосредованной интеграции в геном клетки растения (см., например, патенты США с № 5177010, 5104310, 5004863 и 5159135). Район ДНК, который должен быть перенесен, определяется пограничными последовательностями, и промежуточная ДНК (Т-ДНК) обычно встраивается в геном растения. Кроме того, интеграция Т-ДНК является относительно точным процессом, приводящим к небольшому числу перестановок. В случае тех сортов растений, для которых *Agrobacterium*-опосредованная трансформация является эффективной, она является предпочтительным методом по причине легкого и определенного характера переноса генов. Предпочтительные векторы для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации способны реплицироваться в *E. coli*, а также *Agrobacterium*, создавая возможность для подходящих манипуляций, как описано (Klee et al., In: Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)).

Способы ускорения, которые могут использоваться, включают, например, бомбардировку микрочастицами и т.п. Одним примером способа доставки молекул трансформирующих нуклеиновых кислот в клетки растения является бомбардировка микрочастицами. Этот способ был рассмотрен в Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Небиологические частицы (микрочастицы) могут быть покрыты нуклеиновыми кислотами и доставлены в клетки с помощью движущей силы. Такие методы хорошо известны в данной области техники. В другом варианте осуществления можно устойчиво трансформировать пластиды. Способы, описанные для трансформации пластид высших растений, включают доставку с помощью генной пушки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и направленную доставку ДНК в геном пластид благодаря гомологичной рекомбинации (патент США с № 5451513, патент США с 5545818, патент США с 5877402, патент США с 5932479 и WO 99/05265).

Трансформации протопластов клеток растений можно достичь,

используя методы на основе преципитации фосфатом кальция, обработки полиэтиленгликолем, электропорации и комбинации этих обработок. Использование этих систем для различных сортов растений зависит от возможности регенерировать эту конкретную линию растений из протопластов. Иллюстративные способы регенерации зерновых из протопластов описаны (Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986).

Другие способы трансформации клеток могут также использоваться и включают, но без ограничения, введение ДНК в растения посредством прямого переноса ДНК в пыльцу, посредством прямой инъекции ДНК в репродуктивные органы растения или посредством прямой инъекции ДНК в клетки недоразвившихся зародышей с последующей регидратацией сухих зародышей.

Регенерация, развитие и выращивание растений из отдельных трансформантов протопластов клеток растений или из различных трансформированных эксплантов хорошо известна в данной области техники (Weissbach et al., In: *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). Этот процесс регенерации и выращивания типично включает стадии отбора трансформированных клеток, выращивания этих индивидуализированных клеток на протяжении обычных стадий развития зародышей вплоть до стадии укорененных ростков. Трансгенные зародыши и семена регенерируют сходно. Полученные в результате трансгенные укорененные ростки впоследствии высаживают в подходящую среду для выращивания растений, такую как почва.

Развитие или регенерация растений, содержащий чужеродный, экзогенный ген, хорошо известно в данной области техники. Предпочтительно регенерированные растения являются самоопыляющимися для обеспечения гомозиготных трансгенных растений. В противном случае, пыльцу, полученную из регенерированных растений, используют для опыления выращенных из семени растений агрономически важных линий. В противном случае, пыльцу от растений этих важных линий используют для опыления регенерированных растений. Трансгенное растение настоящего изобретения, содержащее желаемый полинуклеотид,

выращивают, используя способы, хорошо известные квалифицированному в данной области техники специалисту.

Способы трансформации двудольных растений, в основном с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, и получения трансгенных растений были опубликованы для хлопчатника (патент США с № 5004863, патент США с № 5159135, патент США с № 5518908), сои (патент США с № 5569834, патент США с № 5416011), Brassica (патент США с № 5463174), арахиса (Cheng et al., 1996) и гороха (Grant et al., 1995).

Способы трансформации хлебных злаков, таких как пшеница и ячмень, для внесения генетической вариации в растения в результате введения экзогенной нуклеиновой кислоты и регенерации растений из протопластов или недоразвившихся зародышей растений хорошо известны в данной области техники, см., например, СА 2092588, AU 61781/94, AU 667939, патент США с № 6100447, PCT/US97/10621, патент США с № 5589617, патент США с № 6541257. Регенерируемые клетки пшеницы предпочтительно происходят из скутеллума недоразвившихся зародышей, зрелых зародышей, происходящего из них каллуса или ткани меристемы.

Для подтверждения присутствия трансгенов в трансгенных клетках и растениях можно выполнить амплификацию с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) или анализ с использованием блоттинга по Саузерну, используя методы, известные квалифицированным в данной области техники специалистам. После получения трансгенных растений, их можно выращивать для получения тканей растений или их частей, обладающих желаемым фенотипом. Можно собрать ткань растения или части растения, и/или можно собрать семя. Семя может служить в качестве источника для выращивания дополнительных растений с тканями или частями, обладающими желаемыми характеристиками.

Трансгенное растение, создаваемое, используя методы трансформации с использованием *Agrobacterium* или другие методы трансформации, типично содержит один трансгенный локус в одном хромосоме. Такие трансгенные растения называют гемизиготными по добавленному гену(ам). Более предпочтительным является трансгенное растение, которое является гомозиготным по

добавленному гену(ам), т.е. трансгенное растение, которое содержит два добавленных гена, один ген в одном и том же локусе в каждой хромосоме пары хромосом. Гомозиготное трансгенное растение может быть получено с помощью самоопыления гемизиготного трансгенного растения, проращивания некоторых из полученных семян и анализа полученных в результате растений на предмет представляющего интерес гена.

Также должно быть понятно, что два различных трансгенных растения, которые содержат два независимо расщепляющихся экзогенных гена или локуса, могут быть также скрещены с получение потомков, которые содержат оба набора генов или локусов. Самоопыление соответствующего F1 потомка может привести к получению растений, которые являются гомозиготными по обоим экзогенным генам или локусам. Также предусматривается возвратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением, как и вегетативное размножение. Описания других методов скрещивания, которые обычно используются для различных особенностей и культур, можно найти в Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Для трансформации сафлора особенно применимые способы описаны Belide и др. (2011).

TILLING

В одном варианте осуществления TILLING (индуцированные в результате направленного воздействия локальные повреждения в геномах) могут использоваться для создания растений, в которых произошел нокаут эндогенных генов, например, генов, кодирующих $\Delta 12$ десатуразу, пальмитоил-АСР-тиоэстеразу, активность десатуразы $\omega 6$ жирных кислот или $\Delta 6$ десатуразы, или комбинацию двух или более из них.

На первом этапе индуцируют вводимые мутации, такие как новые изменения одной пары оснований, в популяции растений посредством обработки семян (или пыльцы) химическим мутагеном и затем развития растений до поколения, в котором мутации будет устойчиво наследоваться. ДНК экстрагируют, и сохраняют семена

от всех членов популяции для создания запасов, к которым можно обратиться повторно с течением времени.

Для анализа TILLING конструируют праймеры для ПЦР для специфической амплификации одного представляющего интерес гена-мишени. Специфичность особенно важна, если мишень является членом семейства генов или частью полиплоидного генома. Затем меченные красителем праймеры могут использоваться для амплификации продуктов ПЦР, исходя из объединенной ДНК множества индивидуумов. Эти продукты ПЦР денатурируют и вновь подвергают отжигу для допуска образования ошибочно спаренных пар оснований. Ошибочные спаривания, или гетеродуплексы, отображают и встречающиеся в природе однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) (т.е. несколько растений из популяции, вероятно, будут иметь один и тот же полиморфизм), и индуцированные SNP (т.е. лишь редкие отдельные растения, вероятно, будет демонстрировать мутацию). После образования гетеродуплексов использование эндонуклеазы, такой как CellI, которая распознает и расщепляет ошибочно спаренную ДНК, является ключом для обнаружения новых SNP в популяции с TILLING.

Используя этот подход, можно скринировать много тысяч растений для идентификации какого-либо индивидуума с заменой одного основания, а также небольшими вставками или делециями (1-30 п.о.) в любом гене или конкретном участке генома. Размер исследуемых геномных фрагментов может колебаться где-то от 0,3 до 1,6 т.п.о. В случае 8-кратного объединения, фрагментов размером 1,4 т.п.о. (не учитывая концы фрагментов, в которых обнаружение SNP является проблематичным из-за шума) и 96 дорожек на каждый анализ, эта комбинация позволяет скринировать вплоть до миллиона пар оснований геномной ДНК в одной анализе, что делает анализ TILLING методом с высокой пропускной способностью. Анализ TILLING, кроме того, описан в Slade and Knauf (2005), и Henikoff et al. (2004).

Помимо того, что технология TILLING с высокой пропускной способностью позволяет эффективно детектировать мутации, она является идеальной для детектирования природных полиморфизмов.

Следовательно, исследование неизвестной гомологичной ДНК с помощью образования гетеродуплекса с известной последовательностью позволяет установить количество и положение полиморфных сайтов. Идентифицируют как замены нуклеотидов, так и небольшие вставки и делеции, включая по крайней мере некоторые полиморфизмы количества повторов. Это было названо Ecotilling (Comai et al., 2004).

Каждый SNP регистрируется в соответствии с его приблизительным положением в пределах нескольких нуклеотидов. Таким образом, каждый гаплотип может быть заархивирован на основе его изменчивости. Данные о последовательностях можно получить с относительно небольшим инкрементным объемом работы, используя аликвоты той же амплифицированной ДНК, которая используется для анализа расщепления ошибочных спариваний. Левый или правый праймер для секвенирования для одной реакции выбирают в соответствии с его близостью к полиморфизму. Программное обеспечение Sequencher выполняет множество совмещений и обнаруживает изменение основания, которое в каждом случае подтверждено полосой в геле.

Ecotilling можно выполнить дешевле, чем полное секвенирование, способ, используемый в настоящее время для обнаружение большей части SNP. Можно скринировать пластины, содержащие экотипическую ДНК в ранжированных рядах, а не пулы ДНК из подвергнутых мутагенезу растений. Поскольку детектирование осуществляется в гелях с разрешающей способностью почти пара оснований, и фоновые рисунки являются одинаковыми по дорожкам, можно сопоставить полосы с одинаковым размером, таким образом обнаруживая и генотипируя SNP в один прием. Таким образом, завершающее секвенирование SNP является простым и эффективным, сделанным даже в большей степени таким в силу того, что аликвоты тех же продуктов ПЦР, используемых для скрининга, могут подвергаться секвенированию ДНК.

Процедуры мутагенеза

Методы создания мутантных линий растений известны в данной области техники. Примеры мутагенов, которые могут использоваться для создания мутантных растений включают

облучение и химический мутагенез. Мутанты можно также создать с помощью таких методов, как вставка Т-ДНК и транспозон-индуцированный мутагенез. Мутации в любой желаемый ген в растении можно ввести сайт-специфическим образом с использованием искусственных нуклеаз с доменами «цинковые пальцы» (ZFN), эффектора TAL (TALEN) или технологий CRISPR (используя нуклеазу типа Cas9), как известно в данной области техники. Процедуры мутагенеза можно выполнить на любой родительской клетке растения, например, семени или родительской клетке в культуре тканей.

Химические мутагены поддаются классификации в соответствии с химическими свойствами, например, алкилирующие агенты, сшивающие агенты и т.д. Применимые химические мутагены включают, но без ограничения, N-этил-N-нитрозоомочевину (ENU); N-метил-N-нитрозоомочевину (MNU); прокарбазина гидрохлорид; хлорамбуцил; циклофосфамид; метилметансульфонат (MMS); этилметансульфонат (EMS); диэтилсульфат; мономер акриамид; триэтиленмеламин (TEM); мелфалан; азотистый иприт; винкристин; диметилнитрозамин; N-метил-N'-нитро-нитрозогуанидин (MNNG); 7,12-диметилбензантрацен (DMBA); этиленоксид; гексаметилфосфорамид и бисульфат.

Примером подходящего облучения для индукции мутаций является облучение гамма-лучами, такое как облучение, обеспечиваемое источником Cesium 137. Облучение гамма-лучами клеток растений предпочтительно обеспечивается в дозе, составляющей приблизительно 60-200 крад, и наиболее предпочтительно в дозе, составляющей приблизительно 60-90 крад.

Растения типично подвергают воздействию мутагена в течение отрезка времени, достаточного для осуществления желаемой генетической модификации, но недостаточного для полного уничтожения жизнеспособности клеток и их способности к регенерации в растение.

Процедуры мутагенеза, описанные выше, типично приводят к созданию мутантов в представляющем интерес гене с частотой, составляющей по крайней мере 1 на 1000 растений, что означает, что скрининг подвергнутых мутагенезу популяций растений

является осуществимым способом для идентификации мутаций в любом представляющем интерес гене. Идентификации мутантов можно также достичь с помощью технологии нуклеотидного секвенирования с массовым параллелизмом.

Отбор с помощью маркера

Отбор с помощью маркера является широко известным способом отбора гетерозиготных растений, необходимым при возвратном скрещивании с возвратным родителем в классической программе скрещивания. Популяция растений в каждом поколении, получаемом при возвратном скрещивании, будет гетерозиготной по представляющему интерес гену, обычно присутствующему в соотношении 1:1 в популяции, полученной в результате возвратного скрещивания, и молекулярный маркер может использоваться для различения двух аллелей гена. Экстрагируя ДНК, например, из молодых ростков и проверяя с использованием специфического маркера для являющегося результатом интрогрессии желаемого признака, осуществляют ранний отбор растений для дальнейшего возвратного скрещивания при сосредоточении энергии и ресурсов на меньшем количестве растений. Для дальнейшего ускорения программы возвратного скрещивания зародыш из недоразвившихся семян (25 дней после цветения) можно иссечь и выращивать на питательных средах в стерильных условиях, а не допускать полное созревание семени. Этот процесс, названный «спасение зародыша», используемый в комбинации с экстракцией ДНК на стадии трех листьев и анализом в отношении желаемого генотипа, позволяет быстро отобрать растения, имеющие желаемый признак, которые можно выращивать до созревания в теплице или на поле для последующего возвратного скрещивания с возвратным родителем.

Любой молекулярный биологический метод, известный в данной области техники, с помощью которого можно детектировать ген FAD2, FATB или FAD6, может использоваться в способах настоящего изобретения. Такие методы включают, но без ограничения, использование амплификации нуклеиновых кислот, секвенирование нуклеиновых кислот, гибридизацию нуклеиновых кислот с соответственно мечеными зондами, анализ одноцепочечного

конформационного полиморфизма (SSCA), электрофорез в градиентном геле в денатурирующих условиях (DGGE), анализ гетеродуплексов (HET), анализ химического расщепления (CCM), каталитическое расщепление нуклеиновых кислот или их комбинацию (см., например, Lemieux, 2000; Langridge et al., 2001). Настоящее изобретение также включает использование методов с использованием молекулярных маркеров для детектирования полиморфизмов, связанных с аллелями (например) гена FAD2, FATB или FAD6, которые придают желаемый фенотип. Такие методы включают выявление или анализ полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (RFLP), RAPD, полиморфизмов длин амплифицированных фрагментов (AFLP) и полиморфизмов микросателлитных локусов (повтора простой последовательности, SSR). Сцепленные маркеры можно получить без труда с помощью методов, хорошо известных в данной области техники, таких как анализ объединенных сегрегантов, которые рассмотрены Langridge и др. (2001).

«Полимеразная цепная реакция» («ПЦР») представляет собой реакцию, в ходе которой создаются копии-реплики из полинуклеотида-мишени, используя «пару праймеров» или «набор праймеров», состоящей(его) из «верхнего» (5') и «нижнего» (3') праймера, и катализатор полимеризации, такой как ДНК-полимераза и типично термостабильный фермент полимеразы. Способы для ПЦР известны в данной области техники и сообщаются, например, в "PCR" (Ed. M.J. McPherson and S.G Moller (2000) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford). ПЦР может выполняться на кДНК, полученной в результате обратной транскрипции мРНК, выделенной из клеток растения. Однако будет, как правило, удобнее, если ПЦР будет выполняться на геномной ДНК, выделенной из растения.

Праймер представляет собой олигонуклеотидную последовательность, которая способна к гибридизации специфическим в отношении последовательности образом с последовательностью-мишенью и к удлинению во время ПЦР. Ампликоны или продукты ПЦР, или фрагменты ПЦР, или продукты амплификации представляют собой продукты удлинения, которые включают праймер и вновь синтезированные копии последовательности-мишени. Мультиплексные системы для ПЦР

содержат множество наборов праймеров, которые приводят к одновременной продукции более чем одного ампликона. Праймеры могут быть полностью соответствующими последовательности-мишени, или они могут содержать внутренние несоответствующие основания, которые могут приводить к введению сайтов распознавания/расщепления рестрикционными ферментами или каталитическими нуклеиновыми кислотами в конкретных последовательностях-мишенях. Праймеры могут также содержать дополнительные последовательности и/или содержать модифицированные или меченые нуклеотиды для облегчения захвата или детектирования ампликонов. Повторяющиеся циклы термической денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными им последовательностями и удлинение подвергнутых отжигу праймеров с помощью полимеразы приводят к экспоненциальной амплификации последовательности-мишени. Термины «мишень» или «последовательность-мишень» или «матрица» относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, которые амплифицируют.

Способы прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам, и их можно найти, например, в Ausubel et al. (выше) и Sambrook et al. (выше). Секвенирование может выполняться любым подходящим способом, например, с использованием дидезокси-секвенирования, химического секвенирования или их вариантов. Прямое секвенирование дает преимущество определения вариации в любой паре оснований конкретной последовательности.

Системы детектирования на основе гибридизации включают, но без ограничения, анализ TaqMan и анализ с использованием молекулярных маяков (патент США с № 5925517). В анализе TaqMan (патент США с № 5962233) используются специфические в отношении аллелей (ASO) зонды с флуорофором-донором на одном конце и флуорофором-акцептором на другом конце, так что пара флуорофоров взаимодействует посредством резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET).

В одном варианте осуществления способ, описанный в примере 7, используется в программе селекции и скрещивания для

идентификации и отбора растений сафлора с мутацией ol. Например, способ включает выполнение реакции амплификации на геномной ДНК, полученной из растения, используя один или более из следующих наборов праймеров;

i) 5'-ATAAGGCTGTGTTACGGGTTT-3' (SEQ ID NO: 140) и 5'-GCTCAGTTGGGGATACAAGGAT-3' (SEQ ID NO: 141), and

ii) 5'-AGTTATGGTTCGATGATCGACG-3' (SEQ ID NO: 142) и 5'-TTGCTATACATATTGAAGGCACT -3 (SEQ ID NO: 143).

Полипептиды

Термины «полипептид» и «белок», как правило, используются взаимозаменяемо.

Полипептид или класс полипептидов может характеризоваться степенью идентичности (% идентичности) его аминокислотной последовательности со ссылочной аминокислотной последовательностью, или наличием большего % идентичности с одной ссылочной аминокислотной последовательностью, чем с другой. % идентичности полипептида со ссылочной аминокислотной последовательностью типично определяют с помощью анализа GAP (Needleman and Wunsch, 1970; программа GCG) с использованием параметров: штрафа за создание пропуска в последовательности=5 и штрафа за расширение пропуска в последовательности=0,3. Длина запрашиваемой последовательности составляет по крайней мере 100 аминокислот, и при анализе GAP совмещаются две последовательности на протяжении участка из по крайней мере 100 аминокислот. Даже более предпочтительно, когда длина запрашиваемой последовательности составляет по крайней мере 250 аминокислот, и при анализе GAP совмещаются две последовательности на протяжении участка из по крайней мере 250 аминокислот. Даже более предпочтительно, когда при анализе GAP совмещаются две последовательности на протяжении всей их полной длины. Полипептид или класс полипептидов может обладать той же ферментативной активностью, что и ссылочный полипептид, или активностью, отличной от таковой ссылочного полипептида, или не обладать активностью ссылочного полипептида. Предпочтительно, когда полипептид обладает ферментативной активностью, составляющей по крайней мере 10% от активности ссылочного

полипептида.

Как здесь используется, «биологически активный фрагмент» представляет собой часть полипептида настоящего изобретения, в которой сохраняется определенная активность полноразмерного ссылочного полипептида, например, $\Delta 12$ десатуразная, пальмитоил-АСР-тиозстеразная или $\Delta 6$ десатуразная активность. Биологически активные фрагменты, как здесь используются, исключают полноразмерный полипептид. Биологически активные фрагменты могут быть частью любого размера при условии, что в них сохраняется определенная активность. Предпочтительно, когда в биологически активном фрагменте сохраняется по крайней мере 10% от активности полноразмерного полипептида.

Что касается определенного полипептида или фермента, будет понятно, что процентные значения идентичности, превышающие значения, предоставленные здесь, будут охватывать предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, где применимо, ввиду минимальных процентных значений идентичности, предпочтительно, когда полипептид/фермент включает аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 50%, более предпочтительно на по крайней мере 60%, более предпочтительно на по крайней мере 65%, более предпочтительно на по крайней мере 70%, более предпочтительно на по крайней мере 75%, более предпочтительно на по крайней мере 80%, более предпочтительно на по крайней мере 85%, более предпочтительно на по крайней мере 90%, более предпочтительно на по крайней мере 91%, более предпочтительно на по крайней мере 92%, более предпочтительно на по крайней мере 93%, более предпочтительно на по крайней мере 94%, более предпочтительно на по крайней мере 95%, более предпочтительно на по крайней мере 96%, более предпочтительно на по крайней мере 97%, более предпочтительно на по крайней мере 98%, более предпочтительно на по крайней мере 99%, более предпочтительно на по крайней мере 99,1%, более предпочтительно на по крайней мере 99,2%, более предпочтительно на по крайней мере 99,3%, более предпочтительно на по крайней мере 99,4%, более предпочтительно

на по крайней мере 99,5%, более предпочтительно на по крайней мере 99,6%, более предпочтительно на по крайней мере 99,7%, более предпочтительно на по крайней мере 99,8% и даже более предпочтительно на по крайней мере 99,9% соответствующей указанной SEQ ID NO.

Мутантные аминокислотные последовательности полипептидов, определенных здесь, можно приготовить посредством введения соответствующих замен нуклеотидов в нуклеиновую кислоту, определенную здесь, или с помощью *in vitro* синтеза определенного полипептида. Такие мутанты включают, например, делеции, вставки или замены остатков в аминокислотной последовательности. Можно осуществить комбинацию из делеций, вставок и замен, чтобы прийти к конечной конструкции, с условием, что конечный полипептидный продукт обладает желаемыми характеристиками.

Мутантные (измененные) полипептиды можно приготовить, используя любой метод, известный в данной области техники, например, используя стратегии направленного развития или разработки на основе логического обоснования (см. ниже). Продукты, происходящие из мутированной/измененной ДНК, можно без труда скринировать, используя методы, описанные здесь, для определения того, обладают ли они, или не обладают, активностью $\Delta 12$ десатуразы, пальмитоил-АСР-тиоэстеразы или десатуразы $\omega 6$ жирных кислот.

При разработке мутантных аминокислотных последовательностей, положение места для мутации и природа мутации будут зависеть от характеристик(и), подвергаемой модификации. Места для мутаций можно модифицировать по отдельности или партиями, например, посредством (1) замены сначала консервативными вариантами аминокислот, а затем более радикальными вариантами в зависимости от достигаемых результатов, (2) делеции остатка-мишени, или (3) вставки других остатков рядом с локализованным сайтом. Как будет понятно квалифицированному специалисту, использование неконсервативных замен может использоваться при продуцировании мутанта с

уменьшенной ферментативной активностью.

Делеции в аминокислотной последовательности, как правило, находятся в пределах от приблизительно 1 до 15 остатков, более предпочтительно от приблизительно 1 до 10 остатков и типично от приблизительно 1 до 5 следующих друг за другом остатков, но могут быть намного длиннее, в особенности, когда мутант предназначен для уменьшения ферментативной активности.

Мутанты с заменой(ами) имеют по крайней мере один аминокислотный остаток в полипептиде, удаленный из последовательности, и отличный остаток, вставленный на его место. Места, представляющие наибольший интерес для мутагенеза с заменой(ами) для инактивации фермента, включают места, идентифицированные как активный центр(ы). Другими местами, представляющими интерес, являются места, в которых конкретные остатки, полученные из различных линий (штаммов) или видов, являются идентичными. Эти места могут быть важны для биологической активности. Консервативные замены представлены в таблице 1, в то время как неконсервативными заменами являются замены, которые не являются консервативными заменами.

В одном варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является $\Delta 12$ десатураза, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 27-34, 36 или 37, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% любой одной или более из SEQ ID NO: 27-34, 36 или 37.

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является олеат- $\Delta 12$ -десатураза, присутствующая в семени (масличном семени) масличного растения, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 27, 28 или 36, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% любой одной или более из SEQ ID NO: 27, 28 или 36.

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего

изобретения является $\Delta 12$ -ацетиленаз, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% SEQ ID NO: 37.

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является пальмитолеат- $\Delta 12$ -десатураза, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% SEQ ID NO: 35.

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является пальмитоил-АСР-тиоэстераза (FATB), которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 44 или 45, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% любой одной или более из SEQ ID NO: 44 или 45.

Таблица 1.

Консервативные замены.

Исходный остаток	Примерные замены
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является пальмитоил-АСР-тиоэстераза (FATB), присутствующая в семени масличного растения, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, ее биологически активный фрагмент, или аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% SEQ ID NO: 45.

В другом варианте осуществления полипептидом настоящего изобретения является $\Delta 6$ -десатураза, которая включает аминокислоты, имеющие последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, ее биологически активный фрагмент, или

аминокислотную последовательность, которая идентична на по крайней мере 40% SEQ ID NO: 48.

Предпочтительные свойства ферментов настоящего изобретения представлены в разделе «Примеры», в частности, в примере 2, что касается FAD2 сафлора.

Полипептиды, описываемые здесь, можно экспрессировать в виде слияния с по крайней мере одним другим полипептидом. В предпочтительном варианте осуществления по крайней мере один другой полипептид выбирают из группы, состоящей из полипептида, который увеличивает стабильность слитого белка, и полипептида, который содействует очистке слитого белка.

Продукция липидов и/или масел, богатых олеиновой кислотой

Методы, которые обычно осуществляются на практике в данной области техники, могут использоваться для экстракции, обработки, очистки и анализа липидов, продуцированных растениями, в особенности семенами, настоящего изобретения. Такие методы описаны и объяснены полностью в литературе в таких источниках, как Fereidoon Shahidi, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. (2001) D1.1.1-DL1.1.11, и Perez-Vich et al. (1998).

Получение масла из семени

Типично семена растений подвергают тепловой обработке, отжиму и/или экстракции для получения неочищенного масла из семени, которое затем подвергают рафинированию гидратацией, рафинированию, обесцвечивания и дезодорации. В целом, методы для раздавливания семени известны в данной области техники. Например, масличные семена можно довести до нужного состояния посредством обрызгивания их водой для увеличения содержания влаги, например, до 8,5%, и отвальцевать, используя гладкий валец с величиной зазора, составляющей 0,23–0,27 мм. В зависимости от типа семени воду можно не добавлять до раздавливания. Применение нагревание дезактивирует ферменты, способствует дальнейшему разрушению клеток, приводит к соединению липидных капелек и агломерации белковых частиц, все это способствует процессу экстракции.

В варианте осуществления большая часть масла из семени

высвобождается при прохождении через винтовой пресс. Жмыхи, вытесненные из винтового пресса, затем подвергают экстракции растворителем, например, гексаном, используя колонку с подогревом. Альтернативно, неочищенное масло из семени, полученное с помощью операции отжима, можно пропустить через отстойник со снабженным щелями, проволочным верхом для стока для удаления твердых частиц, которые выжимаются вместе с маслом из семени во время операции отжима. Твердый остаток от отжима и экстракции, после удаления гексана, представляет собой жмых, который типично используется в качестве корма для животных. Очищенное масло из семени можно пропустить через листовой фильтр в виде рамы для удаления любых остающихся мелких твердых частиц. Если желательно, масло из семени, выделенное в результате процесса экстракции, можно объединить с очищенным маслом из семени для получения смешанного неочищенного масла из семени.

После освобождения неочищенного масла из семени от растворителя, полученные в результате отжима и экстракции части объединяют и подвергают обычным процедурам обработки липидов, таким как, например, рафинирование гидратацией, щелочная рафинация, обесцвечивание и дезодорация. Некоторые или все стадии могут быть пропущены, в зависимости от характера направленности продукта, например, в случае кормового масла может потребоваться ограниченная обработка, тогда как в случае олеохимических применений требуется больше стадий очистки.

Рафинирование гидратацией

Рафинирование гидратацией является ранней стадией при очистке масел, и его основной целью является удаление большей части фосфолипидов из масла, которые могут присутствовать в виде приблизительно 1–2% от всего экстрагированного липида. Добавление ~2% воды, типично содержащей фосфорную кислоту, при 70–80°C к неочищенному маслу приводит к отделению большей части фосфолипидов, сопровождаемых следами металла и красителями. Нерастворимый материал, который удаляют, представляет собой в основном смесь фосфолипидов и триацилглицеринов и также

известен как лецитин. Рафинирование гидратацией можно выполнить посредством добавления концентрированной фосфорной кислоты к неочищенному маслу из семени для превращения не способных к гидратации фосфатидов в способную к гидратации форму или для хелатирования следов металла, которые присутствуют. Растительный клей отделяют от масла из семени с помощью центрифугирования.

Щелочная рафинация

Щелочная рафинация является одним из процессов очистки для обработки неочищенного масла, иногда также называемым нейтрализацией. Она обычно следует за рафинированием гидратацией и предшествует обесцвечиванию. После рафинирования гидратацией масло из семени можно подвергнуть обработке посредством добавления достаточного количества раствора щелочи для нейтрализации всех из жирных кислот и фосфорных кислот, и удаления мыл, образуемых таким образом. Подходящие материалы в виде щелочей включают гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид лития, гидроксид кальция, карбонат кальция и гидроксид аммония. Этот процесс типично выполняют при комнатной температуре, и с его помощью удаляется фракция свободных жирных кислот. Мыло удаляют с помощью центрифугирования или посредством экстракции в растворитель для мыла, и нейтрализованное масло промывают водой. Если требуется, любое избыточное количество щелочи в масле можно нейтрализовать с использованием подходящей кислоты, такой как соляная кислота или серная кислота.

Обесцвечивание

Обесцвечивание представляет собой процесс очистки, в котором масла нагревают при 90–120°C в течение 10–30 минут в присутствии отбеливающей глины (0,2–2,0%) и в отсутствие кислорода, оперируя азотом или паром или в вакууме. Эта стадия при обработке масла предназначена для удаления нежелательных красителей (каротиноидов, хлорофилла, госсипола и т.д.), и с помощью этого процесса также удаляются продукты окисления, следы металла, сернистые соединения и следы мыла.

Дезодорация

Дезодорация представляет собой обработку масел и жиров при высокой температуре (200–260°C) и низком давлении (0,1–1 мм. рт.ст.). Она типично достигается при введении пара в масло из семени со скоростью, составляющей приблизительно 0,1 мл/минуту/100 мл масла из семени. После барботажа в течение приблизительно 30 минут допускают охлаждение масла из семени под вакуумом. Масло из семени типично переносят в стеклянный контейнер и очищают струей аргона перед хранением при охлаждении. Эта обработка улучшает цвет масла из семени и удаляет большую часть летучих веществ или пахучих соединений, в том числе любых остающихся свободных жирных кислот, моноацилглицеринов и продуктов окисления.

Фракционирование охлаждением

Фракционирование охлаждением является процессом, иногда используемым при коммерческом производстве масел, для разделения масел и жиров на твердую (стеариновую) и жидкую (олеиновую) фракции посредством кристаллизации при низких температурах. Оно сначала использовалось для хлопкового масла для производства продукта без твердых веществ. Оно типично используется для уменьшения содержания насыщенных жирных кислот в маслах.

Переэтерификация

Переэтерификация является процессом обменов жирных кислот в или между TAG, в начале посредством высвобождения жирных кислот из TAG или в виде свободных жирных кислот, или в виде эфиров жирных кислот, обычно этиловых эфиров жирных кислот. В сочетании с процессом фракционирования переэтерификация может использоваться для модификации жирнокислотного состава липидов (Marangoni et al., 1995). Для переэтерификации могут использоваться или химические, или ферментативные способы, при этом в последнем случае используются липазы, которые могут быть специфическими в отношении положения (sn-1/3- или sn-2-специфическими) жирной кислоты в TAG, или предпочитать некоторые жирные кислоты другим (Speranza et al, 2012).

Фракционирования жирных кислот для увеличения концентрации LC-PUFA в масле можно достичь с помощью любого из способов, известных в данной области техники, таких как, например, кристаллизация при замораживании, комплексообразование, используя мочевины, молекулярная дистилляция, сверхкритическая флюидная экстракция и комплексообразование с ионом серебра. Комплексообразование, используя мочевины, является предпочтительным способом из-за его простоты и эффективности в уменьшении уровня насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в масле (Gamez et al., 2003). В начале, TAG масла расщепляются на являющиеся их составными частями жирные кислоты, часто в форме эфиров жирных кислот, с помощью гидролиза или липаз, и эти свободные жирные кислоты или эфиры жирных кислот затем смешиваются со спиртовым раствором мочевины для комплексообразования. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты беспрепятственно образуют комплексы с мочевиной и выкристаллизовываются при охлаждении, и могут быть впоследствии удалены с помощью фильтрации. Не образовавшая комплекс с мочевиной фракция, таким образом, является обогащенной LC-PUFA.

Гидрогенизация

Гидрогенизация жирных кислот включает обработку водородом, типично в присутствии катализатора. Некаталитическая гидрогенизация происходит только при очень высоких температурах.

Гидрогенизация обычно используется при обработке растительных масел. Гидрогенизация превращает ненасыщенные жирные кислоты в насыщенные жирные кислоты, и в некоторых случаях, трансжиры. Гидрогенизация приводит к превращению жидких растительных масел в твердые или полутвердые жиры, такие как те, которые присутствуют в маргарине. Изменение степени насыщения жира приводит к изменению некоторых важных физических свойств, таких как диапазон температуры плавления, вот почему жидкие масла становятся полутвердыми. Твердые или полутвердые жиры являются предпочтительными для выпекания, поскольку то, каким образом жир смешивается с мукой, создает более желаемую текстуру в хлебобулочном изделии. Поскольку частично

гидрогенизированные растительные масла дешевле жиров из животных источников, имеются в наличии в широком диапазоне консистенций, и обладают другими желательными характеристиками (например, увеличенной устойчивостью к окислению/более длительным сроком хранения), они являются преобладающими жирами, используемыми в качестве разрыхлителя в большинстве коммерческих хлебобулочных изделиях.

В варианте осуществления липид/масло настоящего изобретения не было подвергнуто гидрогенизации. Признаком того, что липид или масло не было подвергнуто гидрогенизации, является отсутствие каких-либо транс-жирных кислот в его TAG.

Применения липидов

Липиды, такие как масло из семени, предпочтительно масло из семени сафлора, полученное описанными здесь способами, имеют ряд применений. В некоторых вариантах осуществления липиды используются в качестве пищевых масел. В других вариантах осуществления липиды являются очищенными и используются в качестве смазочных материалов или для других применений, таких как синтез пластмасс. Он может использоваться при производстве косметических средств, мыл, смягчителей тканей, электроизоляционных материалов или детергентов. Он может использоваться для производства химических веществ для сельского хозяйства, таких как поверхностно-активные вещества или эмульгаторы. В некоторых вариантах осуществления липиды подвергают очистке для производства биодизеля. Масло настоящего изобретения может преимущественно использоваться в красках или лаках, поскольку отсутствие линоленовой кислоты означает, что оно не обесцвечивается легко.

Промышленным продуктом, получаемым, используя способ настоящего изобретения, может быть углеводородный продукт, такой как эфиры жирных кислот, предпочтительно метиловые эфиры жирных кислот и/или этиловые эфиры жирных кислот, алкан, такой как метан, этан или более длинноцепочечный алкан, смесь более длинноцепочечных алканов, алкен, биотопливо, окись углерода и/или газообразный водород, биоспирт, такой как этанол, пропанол или бутанол, биоуголь, или комбинация окиси углерода,

водорода и биоугля. Промышленный продукт может представлять собой смесь любых из этих компонентов, такую как смесь алканов, или алканов и алкенов, предпочтительно смесь, которая представляет собой в основном (>50%) C4-C8 алканы, или в основном C6-C10 алканы, или в основном C6-C8 алканы. Промышленным продуктом не является углекислый газ и вода, хотя эти молекулы могут образовываться при объединении с промышленным продуктом. Промышленный продукт может представлять собой газ при атмосферном давлении/комнатной температуре, или предпочтительно жидкость или твердое вещество, такое как биоуголь, и в технологическом процессе может образовываться комбинация из газового компонента, жидкого компонента и твердого компонента, такая как окись углерода, газообразный водород, алканы и биоуголь, которые можно впоследствии разделить. В варианте осуществления углеводородный продукт представляет собой в основном метиловые эфиры жирных кислот. В альтернативном варианте осуществления углеводородным продуктом является продукт, отличный от метиловых эфиров жирных кислот.

Нагревание может использоваться в ходе процесса, такого как пиролиз, сгорание, газообразование, или вместе с ферментативным расщеплением (в том числе анаэробным расщеплением, компостированием, сбраживанием). Газообразование при более низких температурах имеет место, например, при температурах от приблизительно 700°C до приблизительно 1000°C. Газообразование при более высоких температурах имеет место, например, при температурах от приблизительно 1200°C до приблизительно 1600°C. Пиролиз при более низких температурах (более медленный пиролиз) имеет место при приблизительно 400°C, тогда как пиролиз при более высоких температурах имеет место при приблизительно 500°C. Расщепление с использованием мезофильных бактерий имеет место при температурах между приблизительно 20°C и приблизительно 40°C. Расщепление с использованием термофильных бактерий имеет место при температурах от приблизительно 50°C до приблизительно 65°C.

Химические способы включают, но без ограничения,

каталитическое растрескивание, анаэробное расщепление, сбраживание, компостирование и переэтерификацию. В варианте осуществления в химическом способе используется катализатор или смесь катализаторов, который может использоваться вместе с нагреванием. В способе может использоваться гомогенный катализатор, гетерогенный катализатор и/или ферментативный катализатор. В варианте осуществления катализатором является катализатор на основе переходных металлов, катализатор типа цеолита, катализатор на основе активированного оксида алюминия или карбонат натрия в качестве катализатора. Катализаторы включают кислотные катализаторы, такие как серная кислота, или щелочные катализаторы, такие как гидроксид калия или натрия или другие гидроксиды. Химический способ может включать переэтерификацию жирных кислот в липиде, при которой может использоваться гомогенный катализатор, гетерогенный катализатор и/или ферментативный катализатор. Превращение может включать пиролиз, при котором используется нагревание и может использоваться химический способ, и может использоваться катализатор на основе переходных металлов, катализатор типа цеолита, катализатор на основе активированного оксида алюминия и/или карбонат натрия в качестве катализатора.

Ферментативные способы включают, но без ограничения, расщепление микроорганизмами, например, при анаэробном расщеплении, сбраживании или компостировании, или с использованием рекомбинатных ферментативных белков.

Биотопливо

Используемый здесь термин «биотопливо» включает биодизель и биоспирт. Биодизель можно создать из масел, происходящих из растений, водорослей и грибов. Биоспирт образуется при сбраживании сахара. Этот сахар можно экстрагировать непосредственно из растений (например, сахарного тростника), получить из крахмала растений (например, кукурузы или пшеницы) или образовать из целлюлозы (например, древесины, листьев или стеблей).

В настоящее время затраты на производство биотоплива выше таковых на производство нефтяного топлива. Помимо затрат на

переработку, служащие источником биотоплива культуры требуют посадки, внесения удобрений, внесения пестицидов и гербицидов, сбора урожая и транспортировки. Растения, водоросли и грибы настоящего изобретения могут уменьшить затраты на производство биотоплива.

Общие методы для производства биотоплива можно найти, например, в Maher and Bressler (2006), Maher and Bressler (2007), Greenwell et al. (2011), Karmakar et al. (2010), Alonso et al. (2010), Lee and Mohamed (2010), Liu et al. (2010), Gong and Jiang (2011), Endalew et al. (2011) и Semwal et al. (2011).

Биодизель

Производство биодизеля, или алкиловых эфиров, хорошо известно. Существуют три основных пути образования сложных эфиров из липидов: 1) катализируемая основанием переэтерификация липида с использованием спирта; 2) непосредственная, катализируемая кислотой переэтерификация липида с использованием метанола и 3) превращение липида в жирные кислоты, а затем в алкиловые эфиры с помощью кислотного катализа.

Может использоваться любой способ приготовления алкиловых эфиров жирных кислот и глицериловых эфиров (в которых этерифицированы одна, две или три гидроксигруппы в глицерине). Например, жирные кислоты можно приготовить, например, посредством гидролиза или омыления триглицеридов с использованием кислотных или щелочных катализаторов, соответственно, или используя фермент, такой как липаза или эстераза. Алкиловые эфиры жирных кислот можно приготовить посредством осуществления реакции жирной кислоты со спиртом в присутствии кислотного катализатора. Алкиловые эфиры жирных кислот можно также приготовить посредством осуществления реакции триглицерида со спиртом в присутствии кислотного или щелочного катализатора. Глицериловые эфиры можно приготовить, например, посредством осуществления реакции глицерина с алкилгалидом в присутствии основания, или с олефином или спиртом в присутствии кислотного катализатора.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления

липиды подвергают переэтерификации для образования метиловых эфиров и глицерина. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления осуществляют реакцию липидов со спиртом (таким как метанол или этанол) в присутствии катализатора (например, гидроксида калия или натрия) для образования алкиловых эфиров. Алкиловые эфиры могут использоваться для биодизеля и смешиваться с нефтяным топливом.

Алкиловые эфиры могут быть непосредственно смешаны с дизельным топливом или промыты водой или другими растворами на водной основе для удаления различных примесей, в том числе катализаторов, до смешивания. Можно нейтрализовать кислотные катализаторы с помощью основания. Однако этот процесс приводит к образованию соли. Во избежание коррозии мотора предпочтительно свести к минимуму концентрацию соли в топливной композиции с добавкой. Соли можно по существу удалить из композиции, например, с помощью промывки композиции водой.

В другом варианте осуществления композицию сушат после ее промывки, например, посредством пропускания композиции через осушитель, такой как сульфат кальция.

Тем не менее, в другом варианте осуществления нейтральную добавку к топливу получают без образования солей или использования стадии промывки, используя полимерную кислоту, такую как Dowex 50TM, которая представляет собой полимер, который содержит сульфокислотные группы. Катализатор легко удалить с помощью фильтрации после завершения реакций образования сложного эфира и образования простого эфира.

Триацилглицерины растений в качестве источника биотоплива

Использование триацилглицеринов растений для производства биотоплива рассматривается в Durrett et al. (2008). Вкратце, растительные масла в основном состоят из различных триацилглицеринов (TAG), молекул, которые состоят из трех жирнокислотных цепей (длиной обычно 18 или 16 углеродов), этерифицированных до глицерина. Ацильные (жирнокислотные) цепи химически схожи с алифатическими углеводородами, которые составляют основную часть молекул, встречающихся в бензине и дизеле. Углеводороды в бензине содержат 5-12 атомов углерода на

молекулу, и это летучее топливо смешивается с воздухом и возгорается от искры в обычном моторе. В отличие от них, компоненты дизельного топлива типично содержат 10-15 атомов углерода на молекулу и возгораются в результате очень сильного сжатия, достигаемого в дизельном моторе. Однако большинство TAG растений имеют диапазон вязкости, который намного выше такового обычно дизеля: $17,3-32,9 \text{ мм}^2 \text{ сек}^{-1}$ по сравнению с $1,9-4,1 \text{ мм}^2 \text{ сек}^{-1}$, соответственно (ASTM D975; Knothe and Steidley, 2005). Эта большая вязкость приводит к плохому распылению топлива в современных дизельных двигателях, что приводит к проблемам, являющихся результатом неполного сгорания, таким как нагарообразование и закоксовывание (Ryan et al., 1984). Для преодоления этой проблемы TAG превращают в менее вязкие эфиры жирных кислот посредством этерификации с использованием первичного спирта, чаще всего метанола. Получаемое в результате топливо обычно называют биодизелем и имеет динамический диапазон вязкости от $1,9$ до $6,0 \text{ мм}^2 \text{ сек}^{-1}$ (ASTM D6751). Метилловые эфиры жирных кислот (FAME), встречающиеся в биодизеле, характеризуются высокой плотностью энергии, отражением чего является большая энергия, выделяемая в виде тепла при их сгорании, которая является схожей, если не выше, (с) таковой обычного дизеля (Knothe, 2005). Так же цетановое число (показатель воспламеняемости дизеля) FAME, встречающихся в биодизеле, превышает таковое обычного дизеля (Knothe, 2005).

Растительные масла, главным образом, состоят из пяти распространенных жирных кислот, а именно пальмитата (16:0), стеарата (18:0), олеата (18:1), линолеата (18:2) и линолената (18:3), хотя, в зависимости от конкретного вида, более длинные или более короткие жирные кислоты могут также быть основными компонентами. Эти жирные кислоты отличаются друг от друга по показателю длины ацильной цепи и числу двойных связей, что приводит к различным физическим свойствам. Следовательно, свойства биодизеля, происходящего из смеси жирных кислот, зависят от этого состава. Поэтому изменение жирнокислотного профиля может привести к улучшению свойств топлива – биодизеля, таких как характеристики текучести при низких температурах,

устойчивость к окислению и NOx выделения. Изменение жирнокислотного состава TAG может привести к уменьшению вязкости растительных масел, исключению необходимости в химической модификации, таким образом увеличивая эффективность по стоимости биотоплива.

Продукты питания

Липид/масло настоящего изобретения имеет преимущество в применениях в продуктах питания из-за очень высокого содержания олеиновой кислоты в нем и низких уровней линолевой кислоты (<3,2%) и насыщенных жирных кислот, таких как пальмитиновая кислота, и по существу нулевого уровня линоленовой кислоты. Это придает маслу высокую устойчивость к окислению, обеспечивая меньшую прогорклость и делая его идеальным для применений в продуктах питания, когда требуется нагревание, таких как жарка, например, для картофельной стружки. Масло имеет высокий OSI (коэффициент устойчивости к окислению), который определяется как интервал времени, в течение которого масло можно держать при 110°C, такой как более 20 или 25 часов, предпочтительно более 30 часов или более 50 часов. Низкие уровни насыщенных жирных кислот по сравнению с другими растительными маслами приносят пользу для здоровья, поскольку насыщенные жирные кислоты были связаны с вредными эффектами на здоровье. Масла также имеют по существу нулевое содержание транс-жирных кислот, что является желательным на некоторых рынках, поскольку транс-жирные кислоты были связаны с негативными эффектами на здоровье сердца или повышением LDL-холестерина. Более того, вследствие очень низкого уровня полиненасыщенных жирных кислот, для масла не требуется гидрогенизация для снижения уровней PUFA – в результате такой гидрогенизации образуются транс-жирные кислоты. Масла также являются преимущественными для снижения заболеваемости или тяжести ожирения и диабета. Они также являются желательными для применений в продуктах питания, поскольку они содержат только встречающиеся в природе жирные кислоты (Scarth and Tang, 2006).

Применительно к целям настоящего изобретения, «продукты

питания» включают любой пищевой продукт или продукт для потребления людьми или животными (в том числе для энтерального и/или парентерального питания), который после поступления в организм: (1) служит для питания или наращивания тканей или поставки энергии, и/или (2) сохраняет, восстанавливает или поддерживает соответствующий алиментарный статус или метаболическую функцию. Продукты питания настоящего изобретения включает составы для младенцев и/или новорожденных.

Продукты питания настоящего изобретения включают, например, клетку настоящего изобретения, растение настоящего изобретения, часть растения настоящего изобретения, семя настоящего изобретения, экстракт настоящего изобретения, продукт способа настоящего изобретения или смесь с подходящим носителем(ями). Термин «носитель» используется в его самом широком значении с охватом любого компонента, который может иметь или может не иметь пищевую ценность. Как будет понятно квалифицированному в данной области техники специалисту, носитель должен быть подходящим для применения (или использоваться в достаточно низкой концентрации) в продукте питания, так чтобы он не оказывал вредный эффект на организм, который потребляет продукт питания.

Продукт питания настоящего изобретения включает липид, продуцированный непосредственно или опосредованно, используя методы, клетки или организмы, описываемые здесь. Смесь может находиться или в твердой, или в жидкой форме. Кроме того, смесь может включать годные в пищу питательные макроэлементы, витамины и/или минеральные вещества в количествах, желаемых для конкретного применения. Количества этих или других ингредиентов будут варьировать в зависимости от того, предназначена ли смесь для употребления нормальными индивидуумами или для употребления индивидуумами со специализированными потребностями, такими как индивидуумы, страдающие метаболическими нарушениями и т.п.

Пищевые продукты можно приготовить посредством смешивания масла с одним или более других ингредиентов, так что пищевой продукт включает масло, или смешан с одним или более других ингредиентов для приготовления добавки к пищевому продукту,

такой как приправа к салату или майонез. Пищевой продукт или добавка к пищевому продукту может включать 1-10% или более масла в весовом отношении. Масло может быть смешано с другими растительными маслами для обеспечения оптимального состава или с твердыми жирами, или с пальмовым маслом для обеспечения полутвердого разрыхлителя. Пищевые продукты или добавки к пищевым продуктам, приготовленные из масла, включают приправу к салату, майонез, маргарин, хлеб, торты, печенье, рогалики, хлебобулочные изделия, блинчики или блинные смеси, сладкие соусы, замороженные десерты, немолочные продукты.

Примеры подходящих носителей с пищевой ценности включают, но без ограничения, питательные макроэлементы, такие как съедобные жиры, углеводы и белки. Примеры таких съедобных жиров включают, но без ограничения, кокосовое масло, масло бурачника, масло из грибов, масло черной смородины, соевое масло и моно- и диглицериды. Примеры таких углеводов включают, но без ограничения, глюкозу, годную в пищу лактозу и гидролизованный крахмал. Кроме того, примеры белков, которые могут использоваться в пищевой смеси настоящего изобретения, включают, но без ограничения, соевые белки, подвергнутую электродиализу сыворотку, подвергнутое электродиализу снятое молоко, молочную сыворотку или гидролизы этих белков.

Что касается витаминов и минеральных веществ, в пищевые смеси настоящего изобретения могут быть добавлены следующие вещества: кальций, фосфор, калий, натрий, хлорид, магний, марганец, железо, медь, цинк, селен, йод и витамины А, Е, D, С и комплекс витаминов группы В. Могут быть также добавлены другие такие витамины.

Компоненты, используемые в пищевых смесях настоящего изобретения, могут быть из полуочищенного или очищенного источника. Под полуочищенным или очищенным подразумевается материал, который был приготовлен с помощью очистки из природного материала.

Пищевая смесь настоящего изобретения может быть добавлена в пищевой продукт, даже когда пополнение рациона не требуется. Например, смесь может быть добавлена в пищевой продукт любого

типа, в том числе, но без ограничения, маргарин, модифицированное масло, сыры, молоко, йогурт, шоколад, конфеты, закуску, масла для салатов, масла для кулинарии, кулинарные жиры, мясо, рыбу и напитки.

Кроме того, липид, продуцированный в соответствии с настоящим изобретением, или клетки-хозяева, трансформированные, чтобы они содержали и экспрессировали рассматриваемые гены, могут также использоваться в качестве добавок к корму для животных для изменения жирнокислотного состава ткани или молока животного или жирнокислотного состава яиц, до состава, более желательного для потребления людьми или животными, или для здоровья и благополучия животных. Примеры таких животных включают овцу, крупный рогатый скот, лошадей, домашнюю птицу, домашних животных, таких как собаки и кошки и т.п.

Кроме того, продукты питания настоящего изобретения могут использоваться при рыборазводе для увеличения уровней жирных кислот у рыб для потребления людьми или животными.

Предпочтительными продуктами питания настоящего изобретения являются растения, семена и другие части растения, такие как листья, плоды и стебли, которые могут использоваться непосредственно в качестве пищевого продукта или корма для людей или других животных. Например, животные могут пастись непосредственно в поле с такими растениями, или ими могут подаваться более определенные количества при контролируемой подаче корма.

Композиции

Настоящее изобретение также охватывает композиции, в частности, фармацевтические композиции, включающие один или более липидов или масел, продуцированных, используя способы настоящего изобретения.

Фармацевтическая композиция может включать один или более липидов, в комбинации со стандартным, хорошо известным, нетоксичным фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным средством или наполнителем, таким как забуференный фосфатом солевой раствор, вода, этанол, полиолы, растительные масла, смачивающий реагент или эмульсия, такая как

эмульсия вода/масло. Композиция может находиться или в жидкой, или твердой форме. Например, композиция может находиться в форме таблетки, капсулы, принимаемой внутрь жидкости, порошка, мази для местного применения или крема. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества. Может быть также желательным включение агентов для придания изотоничности, например, сахаров, хлорида натрия и т.п. Помимо таких инертных растворителей, композиция может также включать вспомогательные средства, такие как смачивающие реагенты, эмульгаторы и суспендирующие средства, подсластители, корригенты и ароматизаторы.

Суспензии, помимо активных соединений, могут включать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовые эфиры сорбита и сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метатгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, или смеси этих веществ.

Твердые лекарственные формы, такие как таблетки и капсулы, можно приготовить, используя методы, хорошо известные в данной области техники. Например, липид, продуцированный в соответствии с настоящим изобретением, можно таблетировать с обычными основами для таблеток, такими как лактоза, сахароза и кукурузный крахмал, в комбинации со связующими веществами, такими как аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин, дезинтегрирующими агентами, такими как картофельный крахмал или алгиновая кислота, и смазывающим материалом, таким как стеариновая кислота или стеарат магния. Капсулы можно приготовить посредством включения этих наполнителей в желатиновую капсулу вместе с антиоксидантами и соответствующим липидом(ами).

Для внутривенного введения, липиды, продуцированные в соответствии с настоящим изобретением, или их производные можно включить в коммерческие препараты.

Типичная доза конкретной жирной кислоты составляет от 0,1 мг до 20 г, принимаемых от одного до пяти раз в день (вплоть до

100 г ежедневно), и предпочтительно находится в диапазоне от приблизительно 10 мг до приблизительно 1, 2, 5 или 10 г ежедневно (принимаемых в одной или множестве доз). Как известно в данной области техники, минимальное количество, составляющее приблизительно 300 мг/день жирной кислоты, является желательными. Однако будет понятно, что любое количество жирной кислоты принесет пользу субъекту.

Возможные способы введения фармацевтических композиций настоящего изобретения включает, например, энтеральный и парентеральный. Например, жидкий препарат может вводиться перорально. Кроме того, гомогенная смесь может быть полностью диспергирована в воде, смешана в стерильных условиях с физиологически приемлемыми разбавителями, консервантами, буферами или газами-вытеснителями для образования аэрозоля или лекарственной формы для ингаляции.

Вводимую субъекту дозу композиции может определить специалист со средним уровнем компетентности в данной области техники, и она зависит от различных факторов, таких как вес, возраст, общее состояние здоровья, анамнез, иммунный статус и т.д. субъекта.

Кроме того, композиции настоящего изобретения могут использоваться с косметической целью. Композиции могут быть добавлены в предсуществующие косметические препараты, так что образуется смесь, или жирная кислота, полученная в соответствии с настоящим изобретением, может использоваться в качестве единственного «активного» ингредиента в косметическом препарате

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Общие материалы и методы

Растительные материалы и условия выращивания

Растения сафлора (*Carthamus tinctorius*) генотипы SU, S-317, S-517, LeSaf496, CW99-OL и Ciano-OL выращивали из семени в теплице в перлитной и супесчаной почвенной смеси с использованием цикла дня и ночи 16 часов (25°C)/8 часов (22°C). Сорт SU дикого типа, который является сортом с высоким содержанием линолевой кислоты, был получен из Heffernan Seeds в

NSW. Семена PI 603208 (LeSaf496, ATC 120562) и CW 99-OL (ATC 120561) были получены из Australian Temperate Field Crops Collection.

Ткани растений для экстракции ДНК и РНК, включающие листья, корни, семядоли и гипокотили, собирали из проростков сафлора через 10 дней после прорастания. Цветочные головки получали в первый день открытия цветка, а развивающиеся зародыши собирали на трех стадиях развития через 7 (ранней), 15 (средней) и 20 (поздней) дней после пыления (DPA). Образцы сразу же замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до выполнения экстракции ДНК и РНК.

Цветки сафлора являются трубчатыми и в значительной степени самоопыляющимися с составляющим, как правило, менее 10% аутокроссингом (Knowles 1969). Насекомые, но не ветер, могут увеличить степени аутокроссинга в поле. Не подвергнутое опылению рыльце может оставаться рецептивным в течение нескольких дней. Каждая головка (головка сафлора) содержит приблизительно 15-30 семян. Масса развивающегося семени в растении быстро увеличивается во время первых 15 дней после цветения. Содержание масла увеличивается в 5-10 раз во время периода 10-15 дней после DAP и достигает максимального уровня в приблизительно 28 день после DPA (Hill and Knowles 1968). Сафлоровое семя и растения являются физиологически зрелыми через приблизительно 5 недель после цветения, и семя готово к сбору, когда большинство листьев становится коричневыми, и оттенок зеленого цвета остается лишь на прицветниках самых поздних цветочных головок. Семена без труда собирали, растирая головки рукой.

Липидный анализ

Выделение образцов липидов из отдельных семян для быстрого анализа жирнокислотного состава

После сбора по достижении зрелости растения семена сафлора сушили, храня семена в течение 3 дней при 37°C и впоследствии при комнатной температуре, если не анализировали сразу же. Отдельные семена или объединенные семена раздавливали между

фильтровальными бумагами небольшого размера, и образцы выделенного масла из семени, которые впитались в бумаги, анализировали в отношении жирнокислотного состава с помощью способов GC, описанных ниже.

Выделение всех липидов из половин семядолей после прорастания

С целью скрининга, например, семян потомков трансгенных растений семена сафлора проращивали на влажной фильтровальной бумаге в чашке Петри в течение 1 дня. Из каждого пророщенного семени осторожно извлекали семядолю для липидного анализа. Оставшуюся часть каждого проростка переносили в почву, и получающиеся в результате растения выращивали до достижения зрелости с последующим сбором семян для поддержания трансгенной линии.

Экстракция масла из семян, используя устройство Soxhlet.

Для количественной экстракции масла из семени собранные семена сафлора сушили в духовке при 105°C в течение ночи и затем измельчали в Puck Mill в течение 1 мин. Измельченный материал семян (~250 грамм) собирали в предварительно взвешенный стакан и взвешивали до экстракции масла. После добавления слоя хлопковой ваты наверх муки, масло экстрагировали в устройстве для экстракции Soxhlet с использованием растворителя (Уайт-спирита 40-60 C), в начале при 70-80°C. Затем смесь нагревали в течение ночи в сосуде с обратным холодильником с растворителем, переливающимся через сифон с колбу для экстракции каждые 15-20 мин. Растворенное, экстрагированное масло извлекали выпариванием растворителя, используя роторный испаритель, под вакуумом. Вес экстрагированного масла измеряли, и определяли масличность. Для определения жирнокислотного состава экстрагированного масла небольшие аликвоты разводили в хлороформе и анализировали с помощью газовой хроматографии.

Выделение всех липидов из материала листьев

Образцы тканей листьев лиофилизировали, взвешивали, и все липиды экстрагировали из образцов с сухим весом, составляющим

приблизительно 10 мг, как описано Bligh и Dyer (1959).

Фракционирование липидов

Когда это было необходимо, фракции TAG отделяли от других липидных компонентов, используя систему для тонкослойной хроматографии (TLC) на двухфазных, предварительно покрытых пластинах силикатного геля (Silica gel 60, Merck). Хроматографию образца экстрагированного липида, эквивалентный 10 мг сухого веса ткани листьев, осуществляли в первой фазе с использованием гексана/диэтилового эфира (98/2 в объемном отношении) для удаления неполярных восков и затем во второй фазе, используя гексан/диэтиловый эфир/уксусную кислоту (70/30/1 в объемном отношении). Когда это было необходимо, полярные липиды отделяли от неполярных липидов в образцах липидов, экстрагированных из эквивалента 5 мг сухого веса листьев, используя двумерную TLC (Silica gel 60, Merck), используя хлороформ/метанол/воду (65/25/4 в объемном отношении) для первого направления и хлороформ/метанол/ NH_4OH /этилпропиламин (130/70/10/1 в объемном отношении) для второго направления. Липидные споты, и соответствующие стандарты, анализируемые на тех же пластинах для TLC, визуализировали посредством кратковременного подвергания воздействию паров йода, собирали в пробирки и подвергали переэтерификации для получения FAME для анализа с помощью GC, как указано ниже.

Приготовление метиловых эфиров жирных кислот (FAME) и анализ с использованием газовой хроматографии (GC)

Для анализа жирнокислотного состава с помощью GC образцы экстрагированных липидов, приготовленные как описано выше, переносили в стеклянную пробирку и подвергали переметилированию в 2 мл 1M HCl в метаноле (Supelco) при 80°C в течение 3 часов. После охлаждения при комнатной температуре, в каждую пробирку добавляли 1,3 мл 0,9% NaCl и 800 мкл гексана, и FAME экстрагировали в гексановую фазу. Для определения жирнокислотного состава FAME разделяли с помощью газовой хроматографии (GC), используя газовый хроматограф Agilent

Technologies 7890A (Palo Alto, California, США), снабженный 30-м колонкой BPX70, по существу как описано Zhou и др. (2011), за исключением того, что программа вывода на температурный режим была заменена на первоначальную температуру при 150°C, сохранение в течение 1 мин, линейное изменение 3°C/мин до 210°C, затем 50°C/мин до 240°C на протяжении конечного сохранения в течение 2 мин. Пики количественно анализировали, используя программное обеспечение Agilent Technologies ChemStation (Rev B.03.01 (317), Palo Alto, California, США). Отклики пиков были схожими в случае жирных кислот аутентичного стандарта-411 Nu-Check GLC (Nu-Check Prep Inc, MN, США), который содержал равные доли 31 метиловых эфиров различных жирных кислот, включая 18:1, 18:0, 20:0 и 22:0, используемого для калибровки. Долю каждой жирной кислоты в образцах рассчитывали на основе отдельных и общих площадей пиков для жирных кислот.

Анализ FAME с помощью газовой хроматографии - масс-спектрометрии

Подтверждение положений двойных связей в FAME с помощью модификации с использованием 2,4-диметилноксалолина (DMOX) и анализа с помощью GC-MS выполняли, как описывалось ранее (Zhou et al., 2011), за исключением использования Shimadzu GC-MS QP2010 Plus, оснащенного 30-м колонкой BPX70. Температура в колонке была запрограммирована на первоначальную температуру при 150°C в течение 1 мин, линейное изменение со скоростью 5°C/мин до 200°C, а затем 10°C/мин до 240°C с сохранением в течение 5 мин. Масс-спектры получали и обрабатывали с помощью программного обеспечения GCMSsolution (Shimadzu, Version 2.61). Свободные жирные кислоты и стандарты FAME покупали у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Анализ видов липидов с помощью LC-MS

Зрелые отдельные семена подвергали липидному анализу, используя LC-MS, в School of Botany, University of Melbourne. Все липиды экстрагировали, как описано Bligh и Dyer (1959), и растворяли в CHCl₃. Аликвоты, каждая составляющая один мг липида, сушили с использованием N₂, растворяли в 1 мл 10 мМ

бутилированного гидрокситолуола в смеси бутанол:метанол (1:1 в объемном отношении) и анализировали, используя LC-MS с использованием трех квадруполь и ионизации методом электрораспыления Agilent 1200 серий LC и 6410B. Липиды хроматографически разделяли, используя колонку Ascentis Express RP-Amide (5 см × 2,1 мм, Supelco) и градиент с двумя переменными со скоростью потока, составляющей 0,2 мл/мин. Подвижными фазами были: А, 10 мМ формат аммония в смеси H₂O:метанол:тетрагидрофуран (50:20:30, в объемном отношении); В. 10 мМ формат аммония в смеси H₂O:метанол:тетрагидрофуран (5:20:75, в объемном отношении). Выбранные нейтральные липиды (TAG и DAG) и фосфохолин (PC) с жирными кислотами 16:0, 16:1 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 анализировали посредством мониторинга множественных реакций (MRM), используя энергию столкновения=25 В и фрагментор 135 В. Отдельные TAG и DAG при MRM идентифицировали на основе содержащего аммоний иона-предшественника и иона - продукта потери нейтральной частицы жирной кислоты. TAG и DAG количественно анализировали, используя внешний стандарт - 10 мкМ тристеарин.

Анализ содержания стеролов в образцах масла

Образцы, каждый составляющий приблизительно 10 мг масла, вместе с добавленной аликвотой C24:0 монола в качестве внутреннего стандарта подвергали сапонификации, используя 4 мл 5% КОН в 80% MeOH и нагревая в течение 2 ч при 80°C в стеклянной пробирке с завинчивающейся крышкой с тефлоновым покрытием. После охлаждения реакционной смеси добавляли 2 мл воды Milli-Q, и стеролы экстрагировали в 2 мл смеси гексан:дихлорметан (4:1 в объемном отношении), встряхивая и перемешивая на вортексе. Смесь центрифугировали, и экстракт стеролов извлекали и промывали 2 мл воды Milli-Q. Экстракт стеролов затем извлекали после встряхивания и центрифугирования. Экстракт выпаривали, используя струю газообразного азота, и стеролы силилировали, используя 200 мл BSTFA и нагревая в течение 2 ч при 80°C.

Для анализа с помощью GC/GC-MS стеролов производные

стерол-OTMSi сушили под струей газообразного азота в термоблоке при 40°C и затем вновь растворяли в хлороформе или гексане непосредственно перед анализом с помощью GC/GC-MS. Производные стерол-OTMS анализировали с помощью газовой хроматографии (GC), используя Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, California, США), оснащенную кварцевой капиллярной колонкой Supelco EquityTM-1 (15 м × 0,1 мм внутренний диаметр, 0,1 мкм толщина фазы), FID, инжектором для ввода проб с делением/без деления потока и автоматическим дозатором и инжектором Agilent Technologies 7683B серии. Газом-носителем был гелий. Образцы вводили без деления потока при температурном режиме термостата=120°C. После введения температурный режим термостата повышали до 270°C со скоростью 10°C/мин и наконец, до 300°C со скоростью 5°C/ми. Пики количественно анализировали, используя программное обеспечение Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, California, США). Результаты GC допускают наличие погрешности, составляющей ±5% от площадей отдельных компонентов.

GC-масс-спектрометрические (GC-MS) анализы выполняли на Thermoquest GCQ GC-MS и Finnigan Thermo Electron Corporation GC-MS; обе системы были оснащены инжектором для ввода пробы непосредственно в колонку и программным обеспечением Thermoquest Xcalibur (Austin, Texas, США). Каждая GC была оснащена капиллярной колонкой с полярностью, схожей с таковой, описанной выше. Отдельные компоненты идентифицировали, используя масс-спектральные данные, и посредством сравнения данных, касающихся времени удержания, с таковыми, полученными для аутентичных и лабораторных стандартов. Относящийся к полной процедуре холостой анализ выполняли одновременно с серией образцов.

Количественный анализ TAG с помощью Iatroscan (ятроскана)

Один мкл каждого экстракта из растений наносят на одну пластину Chromarod-SII для TLC-FID IatroscanTM (Mitsubishi Chemical Medience Corporation – Япония). Затем держатель для Chromarod переносят в уравновешенную проявительную камеру,

содержащую 70 мл системы растворителей гексан/ CHCl_3 /2-пропанол/муравьиная кислота (85/10,716/0,567/0,0567 в объемном отношении). После инкубации в течение 30 мин держатель для Chromarod затем сушат в течение 3 мин при 100°C и сразу же сканируют в анализаторе Iatroscan MK-6s TLC-FID (Mitsubishi Chemical Medience Corporation – Япония). Площади пиков внутреннего стандарта DAGE и TAG объединяют, используя программное обеспечение для объединения SIC-480II (Version:7.0-E SIC System instruments Co., LTD – Япония).

Количественный анализ TAG выполняют в два этапа. Сначала, сканируют внутренний стандарт DAGE во всех образцах для внесения поправок в выходы экстракции, после чего сконцентрированные образцы TAG выбирают и разводят. Затем количество TAG определяют в разведенных образцах с помощью второго сканирования в соответствии с калибровкой с использованием глицерилтрилинолеата в качестве внешнего стандарта (Sigma-Aldrich).

Экспрессия генов FAD2 – кандидатов в *Saccharomyces cerevisiae*

Фрагменты ДНК, содержащие полные открытые рамки считывания кДНК для FAD2-кандидатов, вырезали из вектора pGEMT-easy в виде EcoRI-фрагментов и встраивали в соответствующий сайт вектора pENTR11 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Затем вставки клонировали в целевой экспрессионный вектор pYES2-DEST52, с помещением открытых рамок считывания под контроль промотора GAL1 для индуцируемой экспрессии генов в дрожжевых клетках, используя рекомбинационную технологию клонирования Gateway® (Stratagene, La Jolla, CA, США). Последовательности генов в результирующих плазмидах подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Результирующие плазмиды и вектор pYES2-DEST52, в котором отсутствует какая-либо вставка кДНК, в качестве контроля вводили в клетки штамм YPH499 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* посредством трансформации с использованием ацетата лития. Экспрессия этих генов FAD2-кандидатов в дрожжевых клетках с подачей экзогенного субстрата – жирных кислот или без нее была

по существу такой, которая была описана ранее Zhou и др. (2006). Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

Экспрессия генов в клетках растений в системе для транзиторной экспрессии

Гены экспрессировали в клетках листьев *Nicotiana benthamiana*, используя систему для транзиторной экспрессии, по существу как описано Voinnet и др.. (2003) и Wood и др. (2009). Вектор для конститутивной экспрессии вирусного белка-супрессора сайленсинга, P19, под контролем промотора CaMV 35S, был получен из лаборатории Peter Waterhouse, CSIRO Plant Industry, Canberra, Австралия. Химерный бинарный вектор 35S:P19 вводили в штамм AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*. Все другие бинарные векторы, содержащие кодирующую область, которая должна быть экспрессирована в клетках растений с промотора, часто промотора 35S, также вводили в штамм AGL1 *A. tumefaciens*. Рекомбинантные клетки выращивали до стационарной фазы при 28°C в 5 мл бульона LB, дополненного 50 мг/л рифампицина и либо 50 мг/л канамицина, либо 80 мг/л спектиномицина в соответствии с геном-селектируемым маркером в бинарном векторе. Бактерии из каждой культуры осаждали с помощью центрифугирования при 3000×g в течение 5 мин при комнатной температуре до ресуспендирования в 1,0 мл буфера для инфильтрации, содержащего 5 мМ MES, pH 5,7, 5 мМ MgSO₄ и 100 мкМ ацетосирингон. Культуры ресуспендированных клеток затем инкубировали при 28°C со встряхиванием в течение еще 3 часов. 10-кратное разведение каждой культуры в буфере для инфильтрации затем смешивали с равным объемом культуры 35S:P19, разведенной так же, и смеси использовали для инфильтрации в нижнюю сторону полностью развившихся листьев *N. benthamiana*. Смешанные культуры, включающие гены, которые должны быть экспрессированы, включали конструкцию 35S:P19 в *Agrobacterium*, кроме особо оговоренных случаев. Контрольные инфильтрации включали только конструкцию 35S:P19 в *Agrobacterium*.

Инфильтрацию листьев осуществляли с использованием смесей клеток *Agrobacterium*, и растения типично выращивали в течение еще пяти дней после инфильтрации, до получения листовых дисков

для выделения всех липидов и анализа жирных кислот. Растения *N. benthamiana* выращивали в камерах для выращивания при постоянной температуре 24°C с использованием цикла свет/темнота – 14/10 с интенсивностью освещения, составляющей приблизительно 200 люкс, используя освещение – флуоресцентные лампы мягкого белого свечения Osram, размещенные непосредственно над растениями. Типично растения возрастом 6 недель использовали для экспериментов, и осуществляли инфильтрацию надлежащих листьев, которые были почти полностью развившимися. Все не подвергнутые инфильтрации листья удаляли после инфильтрации во избежание затемнения.

Количественная ПЦР в режиме реального времени

Анализ экспрессии генов выполняли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, используя систему для детектирования продуктов ПЦР в режиме реального времени BIORAD CFX96™ и iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, США). Праймеры длиной 19–23 нуклеотидов и с температурой плавления (T_m), составляющей приблизительно 65°C, были разработаны для ген-специфических амплификаций, которые будут приводить к продуктам амплификации размером приблизительно 100–200 п.о. Реакции ПЦР выполняли в 96-луночных планшетах. Все реакции количественные ПЦР в режиме реального времени выполняли в трех повторах. Реакционная смесь содержала 1x iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, США), 5 мкМ прямого и обратного праймеров и 400 нг кДНК, и ее использовали в объеме 10 мкл на лунку. Условиями циклического изменения температуры были 95°C в течение 3 мин, с последующими 40 циклами 95°C в течение 10 сек, 60°C в течение 30 сек и 68°C в течение 30 сек. Контроль специфичности амплификации с помощью ПЦР осуществляли с помощью анализа кривой плавления, после конечной стадии ПЦР с увеличением температуры от 60°C до 95°C включительно со скоростью 0,1°C/сек. Кроме того, степень чистоты продуктов ПЦР также проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле, и продукты ПЦР подтверждали с помощью секвенирования.

Конститутивно экспрессируемый ген KASII использовали в качестве эндогенного контроля для нормализации уровней экспрессии. Данные также калибровали относительно уровня экспрессии соответствующего гена, следуя $2^{-\Delta\Delta Ct}$ способу для определения относительных количеств (Schmittgen, 2008). Данные были представлены в виде среднего значения $\pm$ SD (среднеквадратическое отклонение) трех реакций, выполненных в независимых 96-луночных планшетах.

Выделение ДНК и анализ с помощью блоттинга по Саузерну

Геномную ДНК проростков сафлора, генотип «SU», выделяли из полностью развившихся листьев, используя буфер СТАВ и следуя способу, описанному Paterson и др. (1993). Дальнейшую очистку выполняли, используя градиенты CsCl, как ранее описывалось (Liu et al., 1999). Аликвоты, каждая 10 мкг геномной ДНК сафлора, расщепляли по отдельности с использованием восьми различных рестриктаз, а именно AccI, BglII, BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, XbaI и XhoI. Геномную ДНК, расщепленную каждой рестриктазой, подвергали электрофорезу через 1% агарозный гель. Гель погружали в 0,5M NaOH, 1,5M NaCl на 30 мин, и ДНК блоттировали на нейлоновую мембрану Hybond-N⁺ (Amersham, Соединенное Королевство). Фильтры зондировали с использованием α -P³² dCTP-меченного фрагмента ДНК, соответствующего всей кодирующей области гена CtFAD2-6 сафлора в качестве типичного представителя семейства генов CtFAD2, в условиях гибридизации пониженной жесткости. Гибридизацию выполняли в течение ночи при 65°C в растворе, содержащем 6x SSPE, 10% раствор Денхардта, 0,5% SDS и 100 мкг/мл денатурированной ДНК молока лосося. После гибридизации и после кратковременной промывки в 2x SSC/0,1% SDS при 50°C, фильтры трижды промывали, каждый раз в течение 20 мин, в 0,2 x SSC/0,1% SDS при 50°C до автордиографии.

Трансформация сафлора и *Arabidopsis thaliana*

Химерные векторы, включающие гены, используемые для трансформации *Arabidopsis*, вводили в *A. tumefaciens* штамм AGL1, и клетки культур трансформированных *Agrobacterium* использовали для обработки растений *A. thaliana* (экотипа Columbia),

используя способ погружения цветков для трансформации (Clough and Bent, 1998). Трансформированные растения сафлора получали, как описано Belide и др.. (2011), используя трансформированные культуры *Agrobacterium*.

Пример 2. Выделение кДНК сафлора, которые являются кандидатами на кодирование FAD2

Экстракция тотальной РНК и синтез кДНК

Для продуцирования кДНК из сафлора тотальную РНК выделяли из 100 мг образцов замороженных тканей сафлора, включая развивающиеся зародыши, листья, корни и гипокотили. Это было сделано для каждой ткани в отдельности, используя набор для выделения тотальной РНК растений RNeasy® (Qiagen, Hilden, Германия), в соответствии с протоколом поставщика. Концентрацию РНК в препаратах определяли с помощью спектрофотометра ND1000 NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Victoria, Австралия), и концентрации РНК делали равными до анализа. Качество и относительные количества РНК в каждом препарате визуализировали с помощью гель-электрофореза образцов через 1% (в отношении веса к объему) агарозные гели, содержащие формальдегид. Препараты РНК обрабатывали не содержащей РНКазу RQ1 ДНКазой (Qiagen, Hilden, Германия) для удаления загрязняющей геномной ДНК. Первую цепь кДНК синтезировали из 400 нг каждого препарата РНК, не содержащего ДНК, используя систему Superscript III First-Strand Synthesis System (Qiagen, Hilden, Германия) вместе с праймером олиго(dT)₂₀, следуя инструкциям производителя.

Выделение экспрессируемой в семени кДНК для FAD2 из библиотеки кДНК развивающегося семени

В начале, экспрессируемая в семени кДНК для FAD2 сафлора была получена посредством скрининга библиотеки кДНК, происходящих из развивающихся зародышей сафлора генотипа «SU» (дикого типа, с высокими уровнями линолевой кислоты). Конструирование библиотеки начинали с экстракции РНК из смеси недоразвившихся зародышей различных стадий развития, которые собирали и размельчали в порошок в жидком азоте, и экстракцию РНК осуществляли, используя TRIzol, следуя инструкциям

производителя (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Поли(А)-содержащую РНК выделяли, используя набор для очистки мРНК Qiagen (Qiagen, Hilden, Германия).

Первую цепь кДНК, праймером для синтеза которой служил олиго(dT), синтезировали и превращали в двухцепочечную ДНК, используя набор для синтеза кДНК Stratagene, в соответствии с инструкциями производителя (Stratagen, La Jolla, CA, США). кДНК с тупыми концами лигировали с EcoRI-адаптерами, фосфорилировали и фракционировали по размерам с помощью гель-фильтрации на колонке Chroma spin+TE-400 (Clontech, CA, США). Количество рекомбинантных кДНК увеличивали в *E. coli* штамме XL-1 Blue MRF', используя набор для клонирования Stratagene Predigested Lambda ZAP II/EcoRI/CIAP.

Для идентификации клонов FAD2 библиотеку подвергали скринингу, используя фрагмент ДНК, соответствующий кодирующей области FAD2 *Arabidopsis* (идентификационный № в GenBank - L26296), следуя ранее описанному протоколу (Liu et al., 1999). Позитивные бляшки очищали с использованием двух следующих один за другим циклов скрининга, и очищенные фагемиды, содержащие кДНК для предполагаемых FAD2, выделяли, как описано в руководстве для набора для синтеза кДНК λZAPII Stratagene. Анализ последовательностей FAD2 осуществляли с помощью программы NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Открытая рамка считывания была предсказана, используя VectorNTI. Две различные полноразмерные кДНК были выделены из библиотеки кДНК развивающегося семени и названы CtFAD2-1 и CtFAD2-2, соответственно.

Идентификация EST (экспрессируемых маркерных последовательностей) для генов FAD2-кандидатов

Для идентификации дополнительных кДНК для FAD2-кандидатов была детально исследована база данных, касающихся экспрессируемых маркерных последовательностей (EST), сафлора *Compositae* Genome Project (CGP) (cgpdb.ucdavis.edu/cgpdb2.), используя программу BLASTp для EST, которые кодировали полипептиды, обладающие сходством с FAD2 *A. thaliana*

(идентификационный № в GenBank - L26296). По крайней мере одиннадцать различных контингов последовательностей кДНК для FAD2 было идентифицировано, среди которых два континга продемонстрировали идентичные последовательности с CtFAD2-1 и CtFAD2-2, выделенными из библиотеки кДНК семени сафлора. Кроме того, девять различных кДНК были идентифицированы и обозначены как CtFAD2-3 - CtFAD2-11, соответственно.

3'- и 5'-RACE (быстрая амплификация концов кДНК).

Клон самой длинной EST из каждого из 9 контингов (с CtFAD2-3 по CtFAD2-11, включительно) был выбран в качестве исходной точки для выделения соответствующих полноразмерных последовательностей кДНК. В этом процессе использовалась 3'- и 5'-быстрая амплификация концов кДНК (RACE), используя кДНК, продуцированную с РНК, полученной из различных тканей сафлора, включая развивающиеся зародыши, листья, корни, гипокотили и цветки. Специфические для гена праймеры (GSP) были сконструированы, исходя из клона самой длинной EST из каждого континга. 3'-RACE выполняли, используя набор для ПЦР в режиме реального времени в один прием, следуя инструкциям производителя (Bioline, London, Соединенное Королевство). Специфический для гена праймер (GSP) использовали в первом цикле амплификации с помощью ПЦР для каждой из выбранных EST в комбинации с праймером поли(dT) с сайтом для NotI на его 3'-конце. Второй цикл ПЦР выполняли на продукте первого цикла, используя «вложенный» GSP в комбинации с праймером поли(dT). GSP для 3' RACE перечислены в таблице 2.

Клонирование 5'-конца кДНК для CtFAD2-6 выполняли с помощью набора 5' RACE System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, США). Только мРНК для CtFAD2-6 была подвергнута обратной транскрипции в кДНК, используя специфический для гена праймер GSP1, 5'-ACCTAACGACAGTCATGAACAAG-3' (SEQ ID NO: 76). «Вложенный» специфический для гена праймер GSP2, 5'-GTGAGGAAAGCGGAGTGGACAAC-3' (SEQ ID NO: 77), использовался в первой амплификации с помощью ПЦР. В условиях реакции использовался горячий старт при 95°C в течение 4 мин до

добавления полимеразы, 33 циклов денатурации при 94°C в течение 45 сек, отжига при 55°C в течение 1 мин и удлинения цепи при 72°C в течение 2 мин.

Аmplицированные 3' и 5' фрагменты субклонировали в вектор pGEM-Teasy и секвенировали в обоих направлениях. Сравнение последовательностей 3'- и 5'-концов клонированных фрагментов с соответствующими EST указало на перекрывающиеся районы, которые совпадали друг с другом, что обеспечило тем самым 3' и 5' последовательности для каждого гена и позволило собрать предполагаемую полноразмерную последовательность для каждой из 11 кДНК.

Выделение полноразмерных последовательностей кДНК для генов CtFAD2-кандидатов

Для выделения полноразмерных кодирующих белки областей для девяти генов CtFAD2 ORF (открытые рамки считывания) амплифицировали, используя набор для ПЦР в режиме реального времени в один прием, используя тотальную РНК, происходящую из нескольких тканей сафлора, включая развивающиеся зародыши, листья, корни, гипокотили и цветки (Stratagene, La Jolla, CA, США). Праймеры (таблица 3), используемые для амплификации ORF, были основаны на последовательностях ДНК, находящихся в 5' и 3' UTR каждой кДНК. Амплифицированные продукты ПЦР клонировали в вектор pGEM-Teasy®, и их нуклеотидные последовательности получали с помощью секвенирования ДНК.

Характеристики последовательностей FAD2-кандидатов из сафлора

Характеристики 11 кДНК суммированы в таблице 4, а полипептидов в таблице 5.

Предсказанные аминокислотные последовательности кодируемых полипептидов QFAD2-1-QFAD2-11 продемонстрировали большую степень идентичности последовательностей, составляющую от приблизительно 44% до 86% идентичности друг с другом. Они продемонстрировали составляющую 53-62% идентичность последовательностей с FAD2 Arabidopsis. Размеры предсказанных полипептидов находились в диапазоне от 372 до 388 аминокислот,

т.е. все они были длиной, составляющей приблизительно 380 аминокислотных остатков. кДНК имели уникальные последовательности 5' и 3' нетранслируемых районов (UTR), по этой причине эндогенные гены можно было легко опознать по их последовательностям UTR. Амплификация кодирующих белки областей из геномной ДНК сафлора привела к последовательностям ДНК, идентичным с соответствующей кДНК, для каждого из 11 генов, что означает, что не было интронов, прерывающих их кодирующие белки области.

Таблица 2.

Олигонуклеотидные праймеры, используемые в 3' RACE множества генов FAD2 сафлора.

Ген, для амплификации которого использовались праймеры	Смысловая последовательность	Антисмысловая последовательность
CtFAD2-3	5'- CTTCAGCGAGTACCAATGG CTCGAC-3' (SEQ ID NO: 58)	5'- GGTTTCATCGTCCACTCCTT GA -3' (SEQ ID NO: 59)
CtFAD2-4	5'- CTTCAGCGAGTACCAATGG CTCGAC-3' (SEQ ID NO: 60)	5'- GGTTTCATCGTCCACTCCTT GA -3' (SEQ ID NO: 61)
CtFAD2-5	5'- ATGACACCATTTGGCTTCAT CTGCCA -3' (SEQ ID NO: 62)	5'- CTTTCTGCTCACTCCATACT TC -3' (SEQ ID NO: 63)
CtFAD2-6	5'- AGCGAATATCAGTGGCTTG ACGATG -3' (SEQ ID NO: 64)	5'- ACTCCGCTTTCCTCACTCCG TAC -3' (SEQ ID NO: 65)
CtFAD2-7	5'- CATGAATGTGGTCATCATG CCTTTAG -3' (SEQ ID NO: 66)	5'- CTTCTTCATCCATTCGGTTT GC -3' (SEQ ID NO: 67)
CtFAD2-8	5'- CGTGGTTGAATGACACCAT TGGTTAC -3' (SEQ ID NO: 68)	5'- ACCTTCTACACACCGGTAT GCCT -3' (SEQ ID NO: 69)
CtFAD2-9	5'- CATGGAAGATAAGCCACCG TCGACATC -3' (SEQ ID NO: 70)	5'- AACACGGGTTCGCTTGAGC ACGA -3' (SEQ ID NO: 71)
CtFAD2-10	5'- TGCATACCCGCAAGCAAAA CCG -3' (SEQ ID NO: 72)	5'- CCATCTCTCGAGAGTTCCT TAC -3' (SEQ ID NO: 73)
CtFAD2-11	5'- ATGTGGTCACCATGCCTTT AGTGAG -3' (SEQ ID NO: 74)	5'- TGGAATGGTCCTCCATTCC GCTC -3' (SEQ ID NO: 75)

Таблица 3.

**Олигонуклеотидные праймеры, используемые
для амплификации всей кодирующей области генов FAD2 сафлора.**

Ген, для амплификации которого использовались праймеры	Смысловая последовательность	Антисмысловая последовательность
CtFAD2-1	5'- TGAAAGCAAGATGGGAGG AGG -3' (SEQ ID NO: 78)	5'- TCACAACCTTTACTTATTCTTG T -3' (SEQ ID NO: 79)
CtFAD2-2	5'- ATTGAACAATGGGTGCAG GC -3' (SEQ ID NO: 80)	5'- CATCATCTTCAAATCTTATTC -3' (SEQ ID NO: 81)
CtFAD2-3	5'- AATCAGCAGCAGCACAAG C -3' (SEQ ID NO: 82)	5'- CAAACATACCACCAAATGCT ACT -3' (SEQ ID NO: 83)
CtFAD2-4	5'- CTCAGTAACCAGCCTCAAA ACTTG -3' (SEQ ID NO: 84)	5'- GCGGATTGATCAAATACTTG TG -3' (SEQ ID NO: 85)
CtFAD2-5	5'- ATCACAGGAAGCTCAAAG CATCT -3' (SEQ ID NO: 86)	5'- GTAGGTTATGTAACAATCGT G -3' (SEQ ID NO: 87)
CtFAD2-6	5'- TGAAGACGTTAAGATGGG AGCTG -3' (SEQ ID NO: 88)	5'- GTAGGTTATGTAACAATCGT G -3' (SEQ ID NO: 89)
CtFAD2-7	5'- CAGATCCAACACTTCACCA CCAG -3' (SEQ ID NO: 90)	5'- AGATCTAAAGAATTTCCATG GTG -3' (SEQ ID NO: 91)
CtFAD2-8	5'- CTGCTCTCTACGACACTAA ATTCAC -3' (SEQ ID NO: 92)	5'- TCTATCTAATGAGTATCAAG GAAC -3' (SEQ ID NO: 93)
CtFAD2-9	5'- CTGAATTCACACCCACAGA TAGCTAG -3' (SEQ ID NO: 94)	5'- ACATCCCTTCTTAGCTTTAA CTA-3' (SEQ ID NO: 95)
CtFAD2-10	5'- ACTTCGCCCTCTGTTATCT GG -3' (SEQ ID NO: 96)	5'- CCATACACATACATCCTACA CGAT -3' (SEQ ID NO: 97)
CtFAD2-11	5'- ACTCACAATAACTTCATCT CTCTC -3' (SEQ ID NO: 98)	5'- CTACTAGCCATACAATGTCT TCG -3' (SEQ ID NO: 99)

Таблица 4.

Характеристики кДНК для FAD2-кандидатов из сафлора

Название гена	Длина кДНК (нуклеотидов)	Кодирующая белок область	Размер 5'UTR	Размер 3'UTR	Положение интрона	Размер интрона	ORF нуклеотидная SEQ ID NO
CtFAD2-1	1422	124-1266	123	156	-13	1144	12
CtFAD2-2	1486	81-1233	80	253	-12	3090	13
CtFAD2-3	1333	51-1197	50	136	-11	114	14
CtFAD2-4	1403	52-1227	51	176	-11	124	15
CtFAD2-5	1380	66-1194	65	186	-33	122	16
CtFAD2-6	1263	15-1146	14	117	*	*	17
CtFAD2-7	1375	66-1185	65	190	-29	253	18
CtFAD2-8	1345	58-1207	57	138	*	*	19
CtFAD2-9	1326	108-1172	107	154	*	*	20
CtFAD2-10	1358	56-1199	55	159	-38	2247	21
CtFAD2-11	1229	58-1092	57	137	-22	104	22

Таблица 5.

Характеристики полипептидов CtFAD2-кандидатов.

Название гена	Длина полипептида (количество аминокислот)	Положение (& последовательность) от первого His-бокса	Положение (& последовательность) от второго His-бокса	Положение (& последовательность) от третьего His-бокса	Аминокислотная SEQ ID NO
CtFAD2-1	380	105 HECGH*	141 HRRHH	315 HVVHH	27
CtFAD2-2	384	106 HECGH	142 HRRHH	316 HVTTHH	28
CtFAD2-3	381	104 HECGH	140 HRTTHH	314 HAVVHH	29
CtFAD2-4	380	103 HECGH	139 HRTTHH	313 HAVVHH	30
CtFAD2-5	375	102 HDCGH	138 HRTTHH	311 HVVHH	31
CtFAD2-6	376	101 HDLGH	137 HRSHH	310 HVVHH	32
CtFAD2-7	372	99 HECGH	135 HRTTHH	308 HAVVHH	33
CtFAD2-8	382	103 HECGH	139 HRTTHH	313 HAVVHH	34
CtFAD2-9	387	107 HECGH	143 HRTTHH	318 HAVVHH	35
CtFAD2-10	380	104 HECGH	140 HRRHH	314 HVVHH	36

CtFAD2-	377	100 HECGH	136 HRNHH	310 HVLHH	37
11					

* HECGH (SEQ ID NO: 159), HDCGH (SEQ ID NO: 160), HDLGH (SEQ ID NO: 161), HRRHH (SEQ ID NO: 162), HRTNH (SEQ ID NO: 163), HRSHH (SEQ ID NO: 164), HRNHH (SEQ ID NO: 165), HVVHH (SEQ ID NO: 166), HVTNH (SEQ ID NO: 167), HAVHH (SEQ ID NO: 168) и HVLHH (SEQ ID NO: 169).

Для исследования родства полипептидов FAD2-кандидатов сафлора с известными ферментами FAD2, 11 выведенных полипептидных последовательностей были совмещены с последовательностями FAD2 растений, и древо, построенное методом присоединения соседа, было построено, используя Vector NTI (фиг. 1). Как показано на фиг. 1, аминокислотные последовательности CtFAD2-1 и CtFAD2-10 находились в самом близком родстве, прежде всего друг с другом, а затем с экспрессируемым в семени FAD2 из других видов. CtFAD2-2 находится в более близком родстве с конститутивно экспрессируемыми генами из других видов, чем с другими FAD2-кандидатами в сафлоре. CtFAD2-3, -4, -5, -6 и -7 образовывали новую ветвь в древе, построенном методом присоединения соседа, по всей вероятности, в результате эволюции, заключающемся в том, что недавно дивергентный ген стал увеличенным в числе в сафлоре. Примечательно, при соотнесении с другими видами, что они находились в самом близком родстве с функционально дивергентной конъюгазой FAD2 из *Calendula officinalis*. FAD2-11 находился в более близком родстве с ацетиленазамы из нескольких видов растений, в том числе vFAD2 сафлора, который был индуцирован грибными элиситорами (Cahoon et al., 2003). По-видимому, CtFAD2-8 и -9 были более дивергентными, чем другие FAD2-кандидаты из сафлора. Однако этот анализ также показал, что сравнения последовательностей, хотя они в некоторой степени намекнули о возможной функции, сами не могли дать надежные выводы о функции различных FAD2-кандидатов. По этой причине потребовался функциональный анализ, чтобы сделать выводы о функции каждого гена/полипептида.

Сравнения последовательностей показали, что полипептиды FAD2-кандидаты сафлора демонстрируют составляющую приблизительно 50-60% идентичность последовательностей и

составляющую 52–65% схожести с известными ферментами FAD2 из других видов. Степень несоответствия между нуклеотидными последовательностями генов CtFAD2 сафлора отражала их филогенетическое родство, поскольку все из CtFAD2-3, -4 и -5 являются более схожими друг с другом, чем с CtFAD2-1 или CtFAD2-10, и наоборот. Эти значения были близко соответствующими в матрице тождественности аминокислот (таблица 6).

Таблица 6.

Идентичность последовательностей ДНК в кодирующих областях и выведенных аминокислотных последовательностей в генах FAD2 сафлора.

Идентичность выведенных аминокислотных последовательностей (%)											
	CtFA D2-1	CtFA D2-2	CtFA D2-3	CtFA D2-4	CtFA D2-5	CtFA D2-6	CtFA D2-7	CtFA D2-8	CtFA D2-9	CtFA D2-10	CtFA D2-11
CtFA D2-1	-	70.3	53.2	52.5	53.5	50.9	54.1	59.7	59.5	80.1	56.4
CtFA D2-2	70.0	-	54.5	55.0	54.2	51.7	57.8	60.6	62.5	69.5	58.6
CtFA D2-3	62.0	62.0	-	97.1	62.0	61.8	63.1	52.7	50.9	51.2	56.8
CtFA D2-4	62.7	63.3	95.1	-	61.4	61.4	63.3	53.1	50.9	50.9	56.9
CtFA D2-5	61.9	60.3	69.7	70.6	-	63.2	62.0	51.4	51.3	51.7	53.9
CtFA D2-6	60.6	59.9	68.8	69.6	72.0	-	63.1	49.3	50.8	50.1	56.2
CtFA D2-7	62.2	65.8	69.4	69.3	66.6	68.2	-	51.7	49.2	51.4	60.7
CtFA D2-8	65.2	66.2	63.1	62.8	60.8	61.7	61.2	-	58.8	58.1	56.40
CtFA D2-9	64.9	66.2	59.5	59.5	58.3	59.2	59.5	63.5	-	59.3	55.9
CtFA D2-10	78.9	72.0	60.7	62.0	59.8	61.0	60.7	64.3	64.1	-	57.2
CtFA D2-11	60.0	62.9	64.1	64.4	62.4	64.1	62.7	63.9	60.9	61.7	-

Характеристики полипептидов CtFAD2-кандидатов

Каждый из предсказанных полипептидов из 11 CtFAD2-

кандидатов содержал богатый ароматическими аминокислотами мотив в самом конце С-конца. Такие мотивы были идентифицированы в полипептидах FAD2 других растений и, как полагают, необходимы для сохранения локализации в ER (McCartney et al., 2004). В соответствии со связанными с мембраной ферментами десатуразами жирных кислот других растений каждый предсказанный полипептид CtFAD2 содержал три богатых гистидинами мотива (His-бокса). Такие богатые His мотивы являются в высокой степени консервативными в ферментах FAD2 и, как установлено, вовлечены в образование дижелезного комплекса с молекулярным кислородом, используемым при биохимическом катализе (Shanklin et al., 1998). В большинстве последовательностей полипептидов CtFAD2-кандидатов первым богатым гистидином мотивом был HECGHH, при этом исключениями были CtFAD2-5 и -6, которые имели HDCGHH и HDLGHH, соответственно. Последней аминокислотой первого His-бокса в CtFAD2-8 (HECGHQ) был Q, а не H. Авторы настоящего изобретения искали этот мотив в 55 известных ферментах FAD2 растений, и замена H на Q также присутствует в отклонившемся гомологе FAD2 из *Lesquerella lindheimeri* в основном с активностью гидролазы жирных кислот (идентификационный № в Genbank - EF432246; Dauk et al., 2007). Второй богатый гистидином мотив был очень консервативным, в виде аминокислотной последовательности HRRHH, в нескольких FAD2 сафлора-кандидатах, включая CtFAD2-1, -2, -8, -9 и -10. Было отмечено, что в CtFAD2-11 в положении +3 мотива находится аминокислота N, которая также отмечалась в ряде функционально дивергентных ферментов FAD2-типа, включая CREP1 *Crepis alpina*, Cpal2 *Crepis palaestina* и vFAD2 подсолнечника (AY166773.1), FAC2 *Calendula officinalis* (AF343064.1), ацетиленазу *Rudbeckia hirta* (AY166776.1). Аминокислотой в этом положении в CtFAD2-3, -4, -5, -6 или -7 была или S, или T.

В каждом из полипептидов CtFAD2-1, -2, -9 и -10 аминокислотой, непосредственно предшествующей первому His-боксу, был аланин, так же как и в случае ферментов $\Delta 12$ -десатураз жирных кислот других растений. Аминокислота валин

(V), а не аланин присутствовала в этом положении в CtFAD2-5, в то время как другие шесть полипептидов CtFAD2 имели глицин в этом положении. Cahoon и др. (2003) предположили, что замена аланина на глицин в этом положении встречается в функционально дивергентных ферментах FAD2, кроме $\Delta 12$ -гидролазы жирных кислот. Как описано в следующих примерах, последующие эксперименты, связанные с гетерологичной экспрессией, в которых проверялась функция кандидатов, показали, что каждый из полипептидов CtFAD2-1, -2 и -10 был олеат- $\Delta 12$ -десатуразой, в то время как CtFAD2-9 продемонстрировал субстратную специфичность десатуразы к пальмитолеату (C16:1), а не олеату.

Было отмечено, что из 11 CtFAD2-кандидатов только полипептид CtFAD2-11 имел последовательность DVTH в положениях с -5 по -2 третьего His-бокса, которая соответствовала мотиву (D/N)VX(H/N), который, как полагают, встречается в ацетиленазам всех растений (Blacklock et al, 2010). Пятью аминокислотами сразу же после третьего His-бокса полипептидов CtFAD2-1, -2 и -10 были LFSTM, как и в случае других известных олеатдесатураз FAD2 растений. Напротив, CtFAD2-9, специфическая в отношении пальмитолеата десатураза жирных кислот, имела мотив LFSYI в этом положении с двумя аминокислотными заменами в положении +4 и +5. В полипептидах CtFAD2-3, -4 и -5 S в положении +3 был заменен на P, который также присутствовал только в других конъюгазах жирных кислот FAD2, включая таковые из *Calendula officinalis* (FAC2, идентификационный № - AAK26632) и *Trichosanthes kirilowii* (идентификационный № - AA037751).

Было установлено, что Серин-185 фермента FAD2-1 сои подвергается фосфорилированию во время развития семени в качестве регуляторного механизма для его ферментативной активности (Tang et al., 2005). Среди 11 полипептидов CtFAD2-кандидатов, только CtFAD2-1 имел серин в соответствующем положении (серин-181) относительно FAD2-1 сои. Был сделан вывод, что тот же посттрансляционный механизм через фосфорилирование серина-185 может работать во время развития семени сафлора и накопления масла, для модуляции $\Delta 12$ -

десатурации олеиновой кислоты в микросомах в развивающемся семени.

Пример 3. Выделение геномных последовательностей для FAD2-кандидатов

Выделение интронов в 5'UTR генов CtFAD2-кандидатов

Интрон-экзонные структуры генов FAD2 являются консервативными во многих цветущих растениях. Все гены FAD2, исследованные до сих пор, содержат только один интрон, который находится в 5'UTR, с одним исключением, являющимся FAD2-1 сои, в случае которого интрон находится в кодирующей области сразу же после первого ATG, инициирующего трансляцию кодона (Liu et al., 2001; Kim et al., 2006; Mroczka et al., 2010). Дивергенция последовательностей интронов могла бы использоваться в качестве размера эволюционного расстояния между таксономически близкородственными видами (Liu et al., 2001).

Для выделения последовательностей ДНК возможных интронов, расположенных в 5'-UTR генов CtFAD2-кандидатов, были предсказаны типичные сайты сплайсинга интронов (AG:GT) в 5' UTR каждой последовательности кДНК для CtFAD2, и праймеры для ПЦР были разработаны на основе фланкирующих последовательностей предсказанных сайтов сплайсинга. Праймеры перечислены в таблице 7. Геномную ДНК, выделенную из сафлора генотипа SU, использовали в качестве матрицы в реакциях ПЦР для амплификации геномных участков, соответствующих 5'UTR. Амплификации выполняли в реакциях объемом 50 мкл с использованием 100 нг геномной ДНК, 20 пмоль каждого праймера и Hotstar (Qiagen, Hilden, Германия), поставленного производителем. Циклические изменения температуры для ПЦР выполняли, как указано ниже: 94°C в течение 15 мин в течение одного цикла, 94°C в течение 30 сек, 55°C в течение 1 мин, 72°C в течение 2 мин в течение 35 циклов; 72°C в течение 10 мин, используя Kyratес supercycler SC200 (Kyratес, Queensland, Австралия). Продукты ПЦР клонировали в pGEM-T Easy, а затем секвенировали.

Авторы настоящего изобретения смогли получить предсказанный 5' интрон из 8 из 11 генов CtFAD2-кандидатов, а

именно CtFAD2- 1, -2, -3, -4, -5, -7, -10 и -11. Основные особенности этих интронов представлены в таблице 8. Амплификация интрона была неуспешной из CtFAD2-6, -8 и -9, вероятно вследствие недостаточной длины 5' UTR, в которых присутствовали интроны. По-видимому, о FAD2 без интрона не сообщалось, хотя утрата интронов из ядерных генов часто отмечалась у высших растений (Loguercio et al., 1998; Small et al., 2000a;b).

Таблица 7.

Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации 5'UTR районов генов FAD2-кандидатов в сафлоре.

Ген, для амплификации которого использовались праймеры	Смысловая последовательность	Антисмысловая последовательность
CtFAD2-1	5'- GAGATTTTCAGAGAGCAA GCGCTT -3' (SEQ ID NO: 100)	5'- CTTTGGTCTCGGAGGCAGAC ATA -3' (SEQ ID NO: 101)
CtFAD2-2	5'- CAAAAGGAGTTTCAGAAA GCCTCC -3' (SEQ ID NO: 102)	5'- ACTCGTTGGATGCCTTCGAG TTC- 3' (SEQ ID NO: 103)
CtFAD2-3	5'- AATCAGCAGCAGCACAAG C -3' (SEQ ID NO: 104)	5'- AAGGCGGTGACAATTATGA TATC -3' (SEQ ID NO: 105)
CtFAD2-4	5'- CTCAGTAACCAGCCTCAA AACTTG -3' (SEQ ID NO: 106)	5'- AAGGCGGAGACGATTATGA TATC -3' (SEQ ID NO: 107)
CtFAD2-5	5'- ATCACAGGAAGCTCAAAG CATCT -3' (SEQ ID NO: 108)	5'- ATCATCTCTTCGGTAGGTTA TG -3' (SEQ ID NO: 109)
CtFAD2-7	5'- CAGATCCAACACTTCACCA CCAG -3' (SEQ ID NO: 110)	5'- CTAAAGAATTTCCATGGTGT TAC -3' (SEQ ID NO: 111)
CtFAD2-10	5'- ACTTCGCCCTCTGTTATCT GG -3' (SEQ ID NO: 112)	5'- GAGAGACGGTGGAAGTAGG TG -3' (SEQ ID NO: 113)
CtFAD2-11	5'- CTCACAATAACTTCATCTC TCTC -3' (SEQ ID NO: 114)	5'- AAAGACATAGGCAACAACG AGATC -3' (SEQ ID NO: 115)

Таблица 8.

Особенность интронов в генах FAD2-кандидатах.

Особенность	CtFAD2-1	CtFAD2-2	CtFAD2-3	CtFAD2-4	CtFAD2-5	CtFAD2-7	CtFAD2-10	CtFAD2-11
Положение	-13	-12	-11	-11	-33	-29	-38	-22
Длина	1144	3090	114	124	122	253	2247	104
Содержание АТ	64.5%	65.8%	73.7%	75.0%	67.2 %	62.1%	68.9%	75%
Содержание СG	35.5%	34.2%	26.3%	25.0%	32.8%	37.9%	31.1%	25%
5'Е/І								
граница	AG:GTGCAT	AG:GTGAGA	AG:GTATGA	AG:GTAAGT	AG:GTGAAG	AG:GTATAC	TG:GTTCGT	AG:GTTTCT
3'І/Е								
граница	TTGCAG:GT	TTGCAG:GT	ATGCAG:GT	GCGCAG:GT	TTTCAG:GT	TTGCAG:GT	ATATAG:GT	TTGCAG:GT

Последовательность интрона в каждом из восьми генов располагалась в 5'-UTR каждого гена, в положениях, находящихся в пределах от 11 до 38 п.о. 5' от предполагаемого кодона начала трансляции, первого ATG в каждой открытой рамке считывания. Длина интрона находилась в пределах от 104 п.о. (CtFAD2-11) до 3090 п.о. (CtFAD2-2) (таблица 8). В случае CtFAD2-1 размер интрона составлял 1144 п.о., что схоже с размерами интронов, идентифицированных в генах FAD2 из *Arabidopsis* (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>), хлопчатника (Liu et al., 2001) и кунжута (*Sesamum indicum*) (Kim et al., 2006). Динуклеотиды в предполагаемых сайтах сплайсинга, AG и GT, были консервативными во всех восьми исследованных генов CtFAD2, но во всем остальном все последовательности интронов были дивергентными по последовательности без какой-либо значительной гомологии между ними. Все последовательности интронов были А/Т-богатыми с содержанием А/Т между 61% и 75%, что соответствовало многим другим интронным последовательностям из двудольных растений. В случае генов других двудольных растений ген FAD2 *Arabidopsis* содержал интрон размером 1134 п.о. 5' на расстоянии лишь 5 п.о. от своего иницирующего трансляцию кодона ATG. Размер интрона в 5'-UTR гена FAD2-1 *Gossypium*, находящегося 5' на расстоянии 9 п.о. от иницирующего трансляцию кодона, составлял 1133 п.о. Напротив, гены FAD2-4 и FAD2-3 хлопчатника содержали более большие интроны размером 2780 п.о. и 2967 п.о., соответственно, находящиеся 5' на расстоянии 12 п.о. от иницирующего трансляцию кодона. Каждый ген CtFAD2-кандидат можно было отличить по различиям в положении и размере интрона в 5'-UTR в каждом гене. Различия могли быть также важны в обеспечении дифференциальной экспрессии генов. Как сообщалось, такие интроны оказывают положительный эффект на экспрессию генов-репортеров в кунжute (Kim et al., 2006). Соответствующий интрон, как было установлено, является эффективной мишенью для посттрансляционного сайленсинга гена FAD2 в сое (Mroczka et al., 2010).

Было известно, что интроны могут оказывать существенные

воздействия на профили экспрессии генов. Анализ последовательностей интронов с помощью программы PLACE (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) позволил идентифицировать несколько предполагаемых цис-регуляторных элементов. Например, несколько мотивов, таких как ABRE и SEF4, обычно присутствующих в специфических для семени промоторах, были определены в специфическом для семени CtFAD2-1. AG-мотив, который обычно встречается в промоторе связанных с защитной реакцией генов, индуцируемых различными стрессами, такими как скарификация или обработка элиситорами, был определен в CtFAD2-3, который специфически экспрессируется в гипокотилиях и семядолях молодых проростков сафлора.

Пример 4. Анализ с помощью блот-гибридизации по Саузерну генов FAD2 сафлора – кандидатов

Сложность семейства FAD2-подобных генов в сафлоре была исследована с помощью анализа с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Анализ гибридизации в условиях пониженной жесткости показал, что в сафлоре, FAD2 кодируется сложным мультигенным семейством (фиг. 2). Посредством подсчета гибридизующихся фрагментов, полученных, используя различные рестриктазы для расщепления геномной ДНК, было установлено, что существует более 10 FAD2 или FAD2-подобных генов в сафлоре. Отмечаемые различия в силе гибридизации в случае различных фрагментов, по-видимому, коррелировали с относительными степенями идентичности последовательностей с ДНК зонда, который использовался. Сафлор является двудольным видом и, как полагают, имеет один дикий вид-прародитель, *C. palaestinus* (Chapman and Burke, 2007). Авторы настоящего изобретения полагают, что необычно большое семейство генов FAD2 в сафлоре, вероятно, является результатом нескольких дупликаций древнего гена, приводящих к специализации и дифференциальной активности различных членов семейства генов.

Пример 5. Функциональный анализ генов-кандидатов в клетках растений

Экспрессия генов CtFAD2-кандидатов при анализе функции в дрожжевых клетках

В качестве удобной клетки-хозяина, дрожжи *S. cerevisiae*

использовались для исследования функциональной экспрессии нескольких FAD2 $\Delta 12$ специфических в отношении олеата десатураз жирных кислот растений (Covello and Reed 1996; Dyer et al., 2002; Hernandez et al., 2005). *S. cerevisiae* имеет относительно простой профиль жирных кислот, и он содержит олеиновую кислоту с избытком в своем фосфолипиде, который может использоваться в качестве субстрата для ферментов FAD2. В нем также отсутствует эндогенная активность FAD2. По этой причине 11 генов CtFAD2-кандидатов были проверены в дрожжевом штамме YPH499, используя происходящие из pYES2 конструкции, каждая открытая рамка считывания в которых находится под контролем промотора GAL1, как описано в примере 1.

Как продемонстрировано на фиг. 3, когда анализировали жирнокислотный состав в дрожжевых клетках, содержащих «пустой вектор» pYES2, линолевая кислота (18:2) или гексадекадиеновая кислота (16:2) не обнаруживалась, как и ожидалось, поскольку у дрожжей нет эндогенного FAD2. Напротив, на газовой хроматограмме для жирных кислот, полученных из дрожжевых клеток, экспрессирующих каждую из открытых рамок считывания для CtFAD2-1, CtFAD2-2 и CtFAD2-10, выявлялся пик жирной кислоты со временем удержания, составляющим 11,293 мин, соответствующим линолевой кислоте (C18:2), и на газовых хроматограммах для CtFAD2-9 и CtFAD2-10 выявлялся пик жирной кислоты со временем удержания, составляющим 8,513 мин, соответствующим C16:2. Эти данные указывали на то, что CtFAD2-1, CtFAD2-2 и CtFAD2-10 были способны превращать олеиновую кислоту в линолевую кислоту и, следовательно, были $\Delta 12$ олеатдесатуразами. Однако уровень образованной 18:2 был ниже, чем в случае конструкции AtFAD2 *Arabidopsis*, которая использовалась в качестве положительного контроля. CtFAD2-10 образовывал как линолевую кислоту (C18:2), так и гексадекадиеновую кислоту (C16:2), используя олеиновую кислоту (C18:1) и пальмитолеиновую кислоту (C16:1) в качестве субстратов, соответственно, в то время как CtFAD2-9 десатурировала пальмитолеиновую кислоту и, следовательно, была $\Delta 12$ пальмитолеатдесатуразой. Два новых малых пика, которые

появлялись на хроматограммах для FAME из дрожжевых клеток, экспрессирующих CtFAD2-11, были идентифицированы как линолевая кислота ($18:2 \Delta^9(Z),12(Z)$) и ее трансизомер ($18:2 \Delta^9(Z),12(E)$) при GC-MS его пирролидиновых аддуктов, и DMOX (фиг. 3H). В таблице 9 суммирован жирнокислотный состав в дрожжевых клетках, экспрессирующих кодирующие CtFAD2 области. Новые пики не были выявлены в дрожжевых клетках, экспрессирующих CtFAD2-3, -4, -5, -6, -7 и -8.

Для исследования, обладал ли какой-либо из полипептидов CtFAD2-кандидатов активностью гидролазы жирных кислот, осуществляли реакцию FAME, приготовленных из дрожжевых клеток, экспрессирующих каждую их открытых рамок считывания для CtFAD2, с силилирующим агентом, который превращает гидроксильные остатки в производные TMS-эфиры, исходя из которых можно было исследовать масс-спектры. Однако производные гидроксильных остатков распространяемых жирных кислот, таких как олеиновая кислота, не были выявлены в какой-либо из линий дрожжевых клеток, экспрессирующих открытые рамки считывания для CtFAD2-кандидатов. Это означало, что ни один из 11 генов CtFAD2 не кодировал полипептиды, обладающие активностью гидролазы жирных кислот в дрожжах.

Дополнительные эксперименты были проведены для обнаружения активности $\Delta 12$ -эпоксигеназы и $\Delta 12$ -ацетиленазы, обе из которых используют линолевую кислоту в качестве жирнокислотного субстрата, посредством дополнения сред для роста тех же линий дрожжевых клеток свободной линолевой кислотой и анализа жирнокислотного состава впоследствии. Дополнение осуществляли после добавления галактозы в культуры для экспрессии конструкций. На газовых хроматограммах не выявлялись новые пики жирных кислот, в том числе те, которые представляли собой производные в виде эпоксикислот и жирных кислот ацетиленового ряда. Гетерологичная экспрессия этих новых жирных кислот в дрожжах, с дополнением экзогенной свободной жирной кислотой, столкнулась с некоторыми трудностями в демонстрации активности (Lee et al., 1998; Cahoon et al., 2003). По этой причине

функциональные анализы в клетках растений были проведены, как указано ниже.

Таблица 9.

Жирнокислотный состав в дрожжевых клетках, экспрессирующих выбранные гены CtFAD2.

	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C16:2	C18:0	C18:1	C18:1 ^{±11}	C18:2	C18:2 ^{±9Z,12E}
Вектор	1.30 ± 0.15	0.31 ± 0.06	23.62 ± 1.62	36.04 ± 1.77		7.69 ± 0.74	29.62 ± 0.99	1.42 ± 0.20		
CtFAD2-1	1.17 ± 0.02	0.31 ± 0.01	22.96 ± 0.04	37.15 ± 0.16	0.28 ± 0.02	7.37 ± 0.12	26.36 ± 0.24	1.57 ± 0.02	2.82 ± 0.14	
CtFAD2-2	1.17 ± 0.06	0.29 ± 0.01	22.02 ± 0.46	36.60 ± 0.07		7.38 ± 0.07	30.95 ± 0.51	1.48 ± 0.04	0.11 ± 0.01	
CtFAD2-9	1.13 ± 0.06	0.18 ± 0.01	21.30 ± 0.59	34.32 ± 0.54	1.61 ± 0.09	8.90 ± 0.13	31.29 ± 0.25	1.27 ± 0.08		
CtFAD2-10	1.04 ± 0.01	0.27 ± 0.02	22.31 ± 0.03	34.79 ± 0.21	1.23 ± 0.03	8.08 ± 0.09	25.43 ± 0.07	1.34 ± 0.01	5.49 ± 0.09	
CtFAD2-11	0.83 ± 0.01	0.17 ± 0.00	18.41 ± 0.34	37.27 ± 0.16		7.52 ± 0.07	33.25 ± 0.26	1.91 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.51 ± 0.03
(n=3)										

Транзиторная экспрессия генов CtFAD2-кандидатов в *N. benthamiana*

Для конститутивной экспрессии генов в клетках растений, в частности в листьях растений, каждую из ORF для CtFAD2 встраивали в смысловой ориентации в модифицированных бинарный вектор pORE04 между промотором CaMV-35S с увеличенной активностью и терминатором nos3', содержащим последовательность сигнала полиаденилирования (Coutu et al., 2007) (SEQ ID NO: 54). Предшествующее исследование показало, что экспрессию трансгенов можно значительно увеличить посредством коэкспрессии вирусного белка-супрессора сайленсинга, P19, для уменьшения сайленсинга трансгена в хозяине в анализе транзиторной экспрессии на основе листьев *N. benthamiana* (Voinnet et al., 2003; Wood et al., 2009; Petrie et al., 2010). Эти эксперименты проводились, как описано в примере 1.

Как описано выше, функцию CtFAD2-11 в начале исследовали посредством экспрессии в *S. cerevisiae*, и две новые жирные кислоты были идентифицированы с помощью GC-MS как 18:2 $\Delta^9(Z), 12(Z)$ и 18:2 $\Delta^9(Z), 12(E)$, соответственно. В соответствии с результатами, полученными на дрожжах, экспрессия CtFAD2-11 в листьях *N. benthamiana* дала новый 18:2 трансизомер. Метилловый эфир этого изомера продемонстрировал время удержания при GC, которое было одинаковым с таковым для метилового эфира 18:2 $\Delta^9(Z), 12(E)$ (фиг.

4В). Новый 18:2 $\Delta^{9(Z),12(E)}$ обуславливал 0,35% жирных кислот в листьях после транзитной экспрессии CtFAD2-11 (таблица 10). Кроме того, был выявлен другой новый пик, который не был выявлен в дрожжевых культурах. Хроматограмма всех ионов и масс-спектр этой новой жирной кислоты соответствовали крепениновой кислоте (18:2 $\Delta^{9(Z),12(C)}$) (фиг. 4В и С), что означает, что полипептид CtFAD2-11 обладал Δ^{12} -ацетиленазной активностью. Как показано в таблице 10, крепениновая кислота обуславливала 0,51% от всех жирных кислот.

Было отмечено, что транзитная экспрессия CtFAD2-11 в клетках *N. benthamiana* приводила к уменьшению содержания 18:2 $\Delta^{9(Z),12(Z)}$ по сравнению с нетрансформированным контролем (таблица 10). Вероятно, это было обусловлено конкуренцией CtFAD2-11 с эндогенной цис- Δ^{12} олеатдесатуразой в клетках *N. benthamiana* за имеющийся в распоряжении пул олеиновой кислоты, субстрата для обоих ферментов. В целом, результаты экспериментов по экспрессии в дрожжах и *N. benthamiana* показали, что CtFAD2-11 функционировал в основном как специфичная в отношении олеата Δ^{12} -десатураза без специфичности в отношении стереоизомеров, образуя как линолевую кислоту, так и ее транс- Δ^{12} изомеры. Кроме того, он мог также десатурировать Δ^{12} двойную связь линолевой кислотой с образованием ацетиленовой связи крепениновой кислоты.

Другие десять полипептидов CtFAD2-кандидатов были также транзитно экспрессированы в листьях *N. benthamiana* таким же образом, но авторы настоящего изобретения не выявили какие-либо новые жирные кислоты, которые не присутствовали эндогенно в листьях *N. benthamiana*, которые уже имели высокие уровни FAD2.

Таблица 10.

Жирнокислотный состав в листьях *N. benthamiana*, транзитивно экспрессирующих CtFAD2-11.

	C16:0	C16:1	C16:2	C16:3	C18:0	C18:1	C18:1 ^{Δ11}	C18:2 ^{Δ12,12E}	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C18:2Ac
Контроль	17.42 ± 0.48	0.25 ± 0.02	0.83 ± 0.12	7.24 ± 0.15	3.32 ± 0.33	1.02 ± 0.09	0.46 ± 0.03		12.03 ± 0.65	56.79 ± 0.19	0.46 ± 0.10	0.18 ± 0.15	
CtFAD2-11	23.70 ± 2.57	0.28 ± 0.05	0.62 ± 0.09	5.50 ± 0.81	5.30 ± 0.72	3.82 ± 0.30	1.15 ± 0.36	0.35 ± 0.07	11.63 ± 0.84	45.78 ± 4.01	0.95 ± 0.19	0.41 ± 0.04	0.51 ± 0.06
(n=3)													

Обсуждение

11 генов CtFAD2-кандидатов, описанных выше, которые были идентифицированы в сафлоре, представляют собой самое большое семейство генов FAD2, выявленное в каком-либо виде растения, который был исследован до сих пор. Хотя только один ген FAD2 был идентифицирован в *Arabidopsis* (Okuley et al., 1994), FAD2, по-видимому, кодируется множеством генов в геномах большинства других растений, исследованных до сих пор. Два отличных гена FAD2 были описаны в сое (Heppard et al., 1996), льне (Fofana et al., 2004; Khadake et al., 2009) и маслине европейской (Hernandez et al., 2005); три гена в подсолнечнике (Martinez-Rivas et al., 2001) и *Camelina sativa* (Kang et al., 2011); и пять генов в хлопчатнике (Liu et al., 1998). В амфитетраплоидном виде *Brassica napus* 4–6 различных генов FAD2 были идентифицированы в каждом диплоидном субгеноме (Scheffler et al., 1997). Все гены CtFAD2-кандидаты были экспрессированы в растениях сафлора, поскольку последовательности были выделены из кДНК. Это в дальнейшем проверяли, как описано в примере 6.

Хотя сравнимые исследования отсутствуют, очевидно, что сафлор является необычным, что касается эволюции семейства генов FAD2. Сафлор является самоопыляющимся диплоидным видом растений, который находится в самом близком родстве с диким диплоидным видом *Carthamus palaestinus*, и он, как известно, не характеризуется дупликацией или реаранжировкой генома в большой степени (Chapman and Burke, 2007). кДНК для множества FAD2, которые были идентифицированы, не могли быть связаны с альтернативным сплайсингом, поскольку гены FAD2-кандидаты не содержали интроны в последовательностях кодирующих областей.

Скорее, дупликация гена, с большей степенью вероятности, была ответственна за создание сложности в семействе FAD2 в сафлоре. Топология филогенетического древа показала, что дупликации гена могли произойти на нескольких иерархических уровнях. Например, полипептиды CtFAD2-3, -4 и -5 находились в более близком родстве с другими последовательностями в этом кладе, чем с другими последовательностями FAD2 сафлора, что означает, что более недавние дупликации гена могли быть ответственны за появление этого клада.

Пример 6. Уровень экспрессии генов FAD2-кандидатов в сафлоре

Профиль экспрессии генов FAD2 в различных тканях

Для определения картин экспрессии в тканях различных генов CtFAD2-кандидатов были выполнены анализы с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени, как описано в примере 1. Тотальную РНК экстрагировали из семядолей, гипокотилей, тканей корней и листьев, полученных из проростков сафлора 10 DAG генотипа с высоким содержанием линоленовой кислоты SU, и из тканей цветков и развивающихся зародышей из цветущих растений, и использовали в анализах. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для анализа, перечислены в таблице 11.

Таблица 11.

Олигонуклеотидные праймеры, используемые для количественной ПЦР в режиме реального времени в исследовании профилей экспрессии генов FAD2 сафлора.

Ген, для амплификации которого использовались праймеры	Смысловая последовательность	Антисмысловая последовательность
CtFAD2-1	5'- GTGTATGTCTGCCTCCGAGA -3' (SEQ ID NO: 116)	5'- GCAAGGTAGTAGAGGACGAAG -3' (SEQ ID NO: 117)
CtFAD2-2	5'- GCCTCCAAAGATTCATTCAGGTC - 3' (SEQ ID NO: 118)	5'- CAAGATGGATGCGATGGTAAGG -3' (SEQ ID NO: 119)
CtFAD2-3	5'- ACGTGGCGGTCTCAGGTT -3' (SEQ ID NO: 120)	5'- AGGCGGTGACAATTATGATATC -3' (SEQ ID NO: 121)
CtFAD2-4	5'- AAGGCAGGCCGTGATGCCGAT -3' (SEQ ID NO: 122)	5'- AGTATTTGATCAATCCGCTGG -3' (SEQ ID NO: 123)
CtFAD2-5	5'- CAATACGGTAGAGGCCACACAG -3' (SEQ ID NO: 124)	5'- ATCATCTCTTCGGTAGGTTATG -3' (SEQ ID NO: 125)
CtFAD2-6	5'- GACATGTGCTCACGTGGTGCAT -3' (SEQ ID NO: 126)	5'- GTTGCTAATATCCACACCCTA -3' (SEQ ID NO: 127)
CtFAD2-7	5'- CGAATCACACCCACGGGATC -3' (SEQ ID NO: 128)	5'- CTAAAGAATTTCCATGGTGTTAC -3' (SEQ ID NO: 129)
CtFAD2-8	5'- GAGCAACGGAGAGAAGTAACC -3' (SEQ ID NO: 130)	5'- GAGGGATGATAGAAAGAGGTCC -3' (SEQ ID NO: 131)
CtFAD2-9	5'- CATGTGTGGCTGGAGGATTCGA -3' (SEQ ID NO: 132)	5'- GCACCGAGTTTAGCCTTTGTCT -3' (SEQ ID NO: 133)
CtFAD2-10	5'- CCAACAAACAACCATCTCTCG -3' (SEQ ID NO: 134)	5'- GAGAGACGGTGGAAGTAGGTG -3' (SEQ ID NO: 135)
CtFAD2-11	5'- CCATTGATCCACCCTTCACCTTA -3' (SEQ ID NO: 136)	5'- AAAGACATAGGCAACAACGAGATC -3' (SEQ ID NO: 137)
KASII	5'- CTGAACTGCAATTATCTAGG -3' (SEQ ID NO: 138)	5'- GGTATTGGTATTGGATGGGCG -3' (SEQ ID NO: 139)

Временная и пространственная картина экспрессии 11 генов CtFAD2 представлена на фиг. 5. Анализ с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени показал, что CtFAD2-1 экспрессировался только в развивающихся семенах. Напротив, CtFAD2-2 экспрессировался на низких уровнях в семенах, а также других исследованных тканях. Кроме того, экспрессия CtFAD2-4, -5, -6, -7, -8, -9 не выявлялась в развивающихся зародышах. Низкие, тем не менее, выявляемые, уровни экспрессии CtFAD2-10 и -11 отмечались в развивающихся семенах, особенно на поздней стадии развития, когда семена сафлора достигают зрелости. Все из CtFAD2-4, -6, -7, -9 и -11 продемонстрировали высокие уровни экспрессии в тканях молодых проростков, в том числе в семядолях и гипокотилиях. CtFAD2-5 и -8, по-видимому, были специфическими в отношении корней, а CtFAD2-10 преимущественно экспрессировался в тканях цветков, при этом относительно низкие уровни выявлялись в различных других исследованных тканях, включая развивающиеся семена и тканях проростков возрастом десять дней.

Продукты амплификации не детектировались после 40 циклов амплификации в контрольных реакциях с использованием матрицы в виде тотальной РНК, но без обратной транскриптазы, что означает отсутствие примесной геномной ДНК в препаратах РНК.

Пример 7. Демонстрация генетической мутации в линии S317 сафлора

Первый идентифицированный признак высокого содержания олеиновой кислоты в сафлоре, обнаруженный при внедрении сафлора из Индии, контролировался частично рецессивным аллелем, обозначенным ol, в одном локусе OL (Knowles and Hill, 1964). Содержание олеиновой кислоты в генотипах olol обычно составляло 71-75% в случае выращиваемых в теплице растений (Knowles, 1989). Knowles (1968) включил аллель ol в программу селекции сафлора и вывел первый сорт сафлора с высоким содержанием олеиновой кислоты (НО) «UC-1» в 1966 в США, с последующим выведением улучшенных сортов «Oleic Leed» и серии Saffola, в том числе Saffola 317 (S-317), S-517 и S-518. Генотипы olol (высокое содержание олеиновой кислоты) были относительно

устойчивыми при различных температурах (Bartholomew, 1971). Кроме того, Knowles (1972) также описал отличный аллель ol_1 в том же локусе, который порождал в гомозиготном состоянии между 35 и 50% олеиновой кислоты. В отличие от генотипа $olol$, генотип ol_1ol_1 продемонстрировал сильную реакцию на температуру (Knowles, 1972).

Сообщалось о дополнительной зародышевой плазме с более высоким содержанием олеиновой кислоты (>85%) (Fernandez-Martinez et al., 1993; Bergman et al., 2006). Fernandez-Martinez и др. (1993) сообщили о содержании олеиновой кислоты вплоть до 89% в сафлоре в поступлении зародышевой плазмы PI401472, первоначально поставленной из Бангладеш. Серия Montola, выведенная Bergman и др. (2006), содержит более 80% олеиновой кислоты, явно ниже самого верхнего уровня олеиновой кислоты в сорте «UC-1», содержащем аллель $olol$, как описано Knowles и Hill (1964). Генетический анализ на всем протяжении скрещиваний и анализ расщеплений линий с высоким и очень высоким содержанием олеиновой кислоты, свидетельствовал о том, что две линии имеют одинаковые аллели в локусе OL. Очень высокое содержание олеиновой кислоты (85%) было порождено в результате объединения аллелей ol и модификации генов с небольшим положительным эффектом на олеиновую кислоту (Hamdan et al., 2009).

In vitro биохимическая характеристика мутантной линии S-317 с высоким содержанием олеиновой кислоты

Микросомы сафлора были свежеприготовленны из развивающихся семян генотипа S-317, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, на стадии середины созревания, через приблизительно 15 дней после пыления (DPA), как описано Stymne и Appelqvist (1978). Стандартная реакционная смесь объемом 90 мкл содержала 40 мкг микросомального белка, 2 нмоль [^{14}C]олеоил-КоА в 0,1 ммоль калий-фосфатном буфере pH 7,2. Затем добавляли 10 мкл 50 mM NADH, и инкубацию продолжали в течение еще 5, 10 или 20 мин. Реакции останавливали, добавляя 90 мкл 0,15M уксусной кислоты, и липид экстрагировали с использованием 500 мкл $CHCl_3:MeOH$ (1:1). Нижнюю $CHCl_3$ фазу получали, и полярные

липиды из нее разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (TLC), используя систему растворителей $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HAc}/\text{H}_2\text{O}$ (90:15:10:3 в объемном отношении). Споты, соответствующие РС, выскребали с пластины, и связанные ацильные (жирнокислотные) группы подвергали переметилированию в 2 мл 2% серной кислоты в MeOH при 90°C в течение 30 мин. Полученные в результате FAME разделяли на обработанных AgNO_3 пластинах для TLC с использованием смеси гексан:DEE:HAc (85:15:1 в объемном отношении). ^{14}C -меченые стандарты метиловых эфиров олеиновой и линоленовой кислот наносили на пластину в качестве контролей. Пластины экспонировали и анализировали с помощью формирователя изображения на люминесцентном фосфорном покрытии Fujifilm FLA-5000. Радиоактивность каждого образца количественно определяли с помощью программного обеспечения Fujifilm Multi Gauge.

После добавления NADH в реакции с микросомами дикого типа отмечали, что добавленный [^{14}C]олеил-КоА быстро исчезает, в пределах 10 мин, в то время, когда появляется [^{14}C]линолеат, что указывает на эффективное превращение олеата в линолеат в микросомах сафлор дикого типа. Напротив, в случае генотипа S-317 с высоким содержанием олеиновой кислоты, значительное большее отношение [^{14}C]олеата к [^{14}C]линолеату было обнаружено в *vitro* реакциях на всем протяжении времени (таблица 12), что означает, что биосинтез линолевой кислоты через десатурацию олеата с помощью микросом был существенно уменьшенным в этом генотипе.

Таблица 12.

Процент C18:2 продукта, образуемого из C18:1 в микросомах сафлора.

Время (мин)	Дикий тип		НО	
	C18:1	C18:2	C18:1	C18:2
0	99.2±1.1	0.8±1.1	100.0±0.0	0.0±0.0
5	79.6±1.2	20.4±1.2	99.4±0.3	0.6±0.3
10	69.6±0.4	30.4±0.4	95.4±1.6	4.6±1.6
20	60.6±0.6	39.4±0.6	95.1±1.5	4.9±1.5
n=2				

Молекулярная характеристика определяющего высокого

содержание олеиновой кислоты аллеля ol

Для понимания молекулярной основы генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, (olol) в сафлоре кДНК для двух экспрессируемых в семени FAD2, а именно CtFAD2-1 и CtFAD2-2, амплифицировали с помощью ПЦР из трех сортов с высоким содержанием олеиновой кислоты: S-317, LeSaf 496 и CW99-OL и секвенировали. кДНК, охватывающие полные кодирующие области генов CtFAD2-1 из трех сортов с высоким содержанием олеиновой кислоты, были идентичными по нуклеотидной последовательности друг другу и продемонстрировали составляющую приблизительно 98% идентичность последовательностей с кДНК для CtFAD2-1, происходящей из сорта дикого типа SU, включая делецию одного нуклеотида и 22 замены нуклеотидов в генотипе HO по сравнению с диким типом. Делеция одной пары оснований была обнаружена в положении 606 нуклеотида, считая с первого ATG, приблизительно в середине кодирующей области CtFAD2-1. Эта делеция приводила к сдвигу трансляционной рамки считывания, который создавал стоп-кодон вскоре после делеции, так что мутантный ген в трех сортах olol кодировал предсказанный, усеченный полипептид без третьего His-бокса, присутствующего в белке дикого типа (фиг. 6). Было отмечено, что существовал относительно высокий уровень вариации последовательностей в последовательностях ДНК вблизи места делетированного одного нуклеотида аллеля ol, что наводит на мысль, что дополнительные мутации накопились в мутантном гене.

Районы ДНК, включающие интроны в 5' UTR CtFAD2-1 и CtFAD2-2, были также выделены из мутанта olol S-317 и сравнены с интронами дикого типа. Размер интрона в CtFAD2-1 из S-317 составлял 1144 п.о., на 61 п.о. больше интрона дикого типа из SU, размер которого составлял 1083 п.о. Сравнение нуклеотидных последовательностей интронов в CtFAD2-1 показало, что общая идентичность последовательность составляет 76,8%, при этом интроны отличались по 27 вставкам или делециям и 95 однонуклеотидным заменам (фиг. 7).

Примечательно, что замены нуклеотидов в мутантном гене не были распределены равномерно на всем протяжении района длиной 1142 п.о., соответствующего кодирующей области дефектного

CtFAD2-1, поскольку 14 из 22 (63,6%) замен присутствовали вблизи делеции нуклеотида, большинство в пределах 123 п.о. немного 3' от делеции одного нуклеотида. Напротив, интроны в CtFAD2-2 в диком типе и мутантных генотипах продемонстрировали составляющую в общем 99,5% идентичность последовательностей, только с 12 заменами нуклеотидов и одной 2-нуклеотидной делецией. Это означает, что или некоторое давление отбора имело место в дефектном гене CtFAD2-1 в мутанте НО, или, возможно, с большей степенью вероятности, что мутация CtFAD2-1 была древнего происхождения и могла произойти из вида-прародителя сафлора, такого как *C. palaestinus*.

EMS мутант (S-901), полученный из коммерческого сорта с высоким содержанием олеиновой кислоты S-518, был описан в патенте США с № 5912416. Хотя генетические исследования показали, что так называемый аллель ol_2 в этом новом генотипе отличен от аллелей ol и ol_1 в локусе OL, его молекулярная природа не была определена Weisker (патент США с № 5912416). Генотип S-901 характеризовался увеличением уровня олеиновой кислоты до 89,5-91,5% от общего содержания жирных кислот в зрелых семенах. Отмечалось снижение насыщенных жирных кислот, т.е. пальмитиновой кислоты, вниз до приблизительно 4% и стеариновой кислоты вниз до приблизительно 2,5%. Однако S-901 не проявил фенотип нормального растения и страдал некоторым сниженным ростом и урожайностью. Морфологически он был короче, и цветочные головки были меньше по сравнению с его родительской линией S-518. Он также зацветал позже и содержал меньше масла в семенах.

Разработка идеальных ПЦР-маркеров для селекции признака «высокое содержание олеиновой кислоты»

Различие в делеции одного нуклеотида в последовательности мутантного аллеля CtFAD2-1, которая, как было сделано заключение, являются каузальной мутацией, ответственной за фенотип НО, было положено в качестве молекулярной основы для очень эффективного маркера для отслеживания мутантного аллеля ol . Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали анализ молекулярного маркера, который позволял идентифицировать

и отбирать мутантный аллель *ol* с селекционной целью или с целью идентификации сортов, даже когда он присутствует в гетерозиготном состоянии. Отбор с помощью молекулярного маркера, таким образом, устраняет необходимость в получении дополнительного поколения растений, которые необходимо подвергнуть скринингу в отношении жирнокислотного фенотипа. Простая генетики в сочетании с исследованием идеального молекулярного маркера даст возможность селекционерам сафлора быстро включить признак высокого содержания олеиновой кислоты в их селекционную программу.

Представлялось, что существует недостаточная вариация последовательностей в экзонах *CtFAD2-1* между генотипом дикого типа *SU* и генотипом *S-317*, определяющим высокое содержание олеиновой кислоты, чтобы без труда создать дифференциальный маркер на основе реакций ПЦР. Однако авторы настоящего изобретения смогли использовать относительно высокую дивергенцию последовательностей в интроне в 5' UTR *CtFAD2-1* между аллелями *OL* и *ol*. Существовали участки очень вариабельных последовательностей между этими двумя аллелями, которые позволили разработать уникальные праймеры для ПЦР. Следующие иллюстративные праймеры были разработаны для амплификации специфического продукта размером 315 п.о. из генотипов, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты, содержащих мутантный аллель *olol*, но не в генотипе дикого типа *SU*. НО-смысловой: 5'-ATAAGGCTGTGTTACGGGTTT-3' (SEQ ID NO: 140); и НО-антисмысловой: 5'-GCTCAGTTGGGGATACAAGGAT-3' (SEQ ID NO: 141) (фиг. 7). Другая пара иллюстративных праймеров, специфических в отношении гена дикого типа в сорте *SU*, которая обуславливала продукт ПЦР размером 603 п.о., была следующей: НЛ-смысловой: 5'-AGTTATGGTTCGATGATCGACG-3' (SEQ ID NO: 142); и НЛ-антисмысловой: 5'-TTGCTATACATATTGAAGGCACT-3' (SEQ ID NO: 143) (фиг. 7). Пару праймеров, происходящих из гена *KASII* сафлора, *ctkas11*-смысловой: 5'-CTGAAGTCAATTATCTAGG-3' (SEQ ID NO: 144) и *ctkas11*-антисмысловой: 5'-GGTATTGGTATTGGATGGGCG-3' (SEQ ID NO: 145), использовали в качестве положительного контроля для гарантии равного внесения матричной ДНК и хорошего выполнения

ПЦР.

Условиями реакций ПЦР были 94°C в течение 2 мин, с последующими 40 циклами 94°C в течение 30 сек, 58°C в течение 30 сек и 72°C в течение 30 сек. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и визуализировали под ультрафиолетовым светом после окрашивания геля этидием бромидом. Фрагмент размером приблизительно 300 п.о. отмечался в реакциях амплификации в случае всех пяти исследованных генотипов, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты, а именно S-317, S-517, CW99-OL, LeSaf496 и Ciano-OL, в то время как такой фрагмент отсутствовал в случае генотипа дикого типа SU. Наоборот, фрагмент размером приблизительно 600 п.о. присутствовал при амплификациях в случае сафлора дикого типа SU, но не присутствовал в каком-либо из проверенных сортов с высоким содержанием олеиновой кислоты. В качестве положительного контроля, полоса размером 198 п.о., происходящая из гена KASII, была амплифицирована в реакциях в случае всех проверенных линий. Подлинности ампликонов подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Таким образом, дивергенция последовательностей в интроне в 5'UTR гена CtFAD2-1 между определяющим высокое содержание олеиновой кислоты аллелем и аллелем дикого типа сафлора способствовала разработке ПЦР-маркера, определяющего присутствие или отсутствие мутации в CtFAD2-1. Он был полностью сцеплен с аллелем ol, независимо от генетического фона, т.е. он был полностью сцепленным маркером. Однако этот молекулярный маркер был доминантным маркером, и поэтому использование только этого маркера не позволило бы отличить гомозиготные по аллелю ol генотипы от гетерозиготных по нему генотипов. Для преодоления этого была разработана другая пара праймеров для ПЦР, которая приводила к амплификации только аллеля Ol дикого типа. Следовательно, использование таких специфических для дикого типа праймеров в сочетании с праймерами для ПЦР, специфическими в отношении генотипов, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты, позволило отличить гомозиготные

от гетерозиготных генотипов в локусе CtFAD2-1.

Экспрессия CtFAD2-1 существенно уменьшена в генотипах, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты.

В приведенных выше разделах было показано, что CtFAD2-1 экспрессируется только в развивающихся зародышах развивающихся семян и является невыявляемым в различных других исследованных тканях, в том числе листе, корне, цветке, семядоле и гипокотиле, происходящих из молодых проростков сафлора. CtFAD2-1 экспрессировался на высоком уровне в развивающихся семенах, в которых скорость метаболизма жирных кислот была высокой, и приводил к активному накоплению масла, содержащему в основном C18:2, за относительно короткий период времени. CtFAD2-1 характеризовался наибольшим уровнем экспрессии приблизительно в середине развития семени, с более умеренным уровнем экспрессии и на ранней, и на поздней стадиях развития семени.

Используя метод анализа с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, уровень нормализованной экспрессии гена CtFAD2-1 определяли в трех сортах с высоким содержанием олеиновой кислоты, а именно S-317, Lesaff496 и CW99-OL, и сравнивали с таковым в развивающихся семенах генотипа дикого типа SU. Как видно на фиг. 8, экспрессия CtFAD2-1 детектировалась на всех трех стадиях развития зародышей в генотипе сафлора дикого типа SU, при этом наибольший уровень экспрессии отмечался на стадии достижения середины зрелости, в соответствии с предшествующими результатами и с подтверждением временной картины транскрипции этого ключевого гена FAD2. Однако транскрипты CtFAD2-1 были едва выявляемыми в трех сортах с высоким содержанием олеиновой кислоты S-317, Lesaff496 и CW99-OL (фиг. 8), что означает высокий уровень нестабильности РНК-транскриптов с этого гена в мутантных зародышах.

Напротив, уровни транскриптов с CtFAD2-2 были схожими в случае генотипа дикого типа и генотипов, определяющих высокое содержание олеиновой кислоты, что свидетельствует о том, что экспрессия CtFAD2-2 была не затронута в зародышах НО, также о том, что препараты РНК были соответственно чистыми для этих анализов. Поэтому был сделан вывод, что экспрессия CtFAD2-2

может также вносить вклад в $\Delta 12$ -десатурацию жирных кислот для запасаемых липидов в развивающихся семенах сафлора, но в намного меньшей степени, чем CtFAD2-1 в семенах дикого типа, а также быть вовлеченной в $\Delta 12$ -десатурацию жирных кислот для мембранных липидов в корне, листе и стебле. Не было данных, что экспрессия CtFAD2-2 была увеличенной в мутанте с высоким содержанием олеиновой кислоты в ответ на, или в качестве компенсации за, уменьшение активности CtFAD2-1 в развивающихся семенах сафлора мутанта CtFAD2-1.

Причиной существенно уменьшенного уровня транскриптов CtFAD2-1 в линиях НО является опосредованная несмысловым полинуклеотидом деградация мРНК (NMD).

Причиной существенно уменьшенного уровня транскриптов CtFAD2-1 в зародышах НО могла бы быть опосредованная несмысловым полинуклеотидом деградация мРНК (NMD) для CtFAD2-1, поскольку стоп-кодон был обнаружен в середине кодирующей последовательности вскоре после делеции одного нуклеотида. Система NMD, как полагают, является механизмом, участвующим в деградации абберрантных мРНК, которые содержат преждевременный стоп-кодон (PTC), являющийся результатом неожиданных ошибок, таких как мутации в геноме, ошибки при транскрипции и неправильный сплайсинг. Она является механизмом, который повсюду присутствует у эукариот, и, в особенности, он был тщательно изучен у дрожжей и млекопитающих. Она сравнительно плохо изучена у высших растений, но существует несколько сообщений, включая ген ингибитора трипсина Кунитца из сои (Kti3), ген фитогемагглютинаина (PHA) из фасоли обыкновенной (Jofuku et al., 1989; Voelker et al., 1990), ген ферредоксина из гороха (FED1) (Dickey et al., 1994) и ген Waxu из риса (Isshiki et al., 2001).

В этих экспериментах было установлено, что мутация ol, приводящая к признаку высокое содержание олеиновой кислоты в семядоли сафлора, находилась в соответствии с низкими уровнями накопления мРНК для CtFAD2-1 в развивающихся семенах. Предшествующее исследование показало, что аллель ol был

полурецессивным, что не соответствовало механизму посттранскрипционного сайленсинга гена, опосредованного короткими РНК. В генный сайленсинг вовлечены 21-24-нуклеотидные киРНК, образуемые из двухцепочечной РНК, которая является результатом транскрипции антисмысловой или шпилечной РНК и может функционировать генетически как доминантный или полидоминантный локус (Brodersen and Voinnet, 2006). Для подтверждения того, что механизм мутации ol отличен от сайленсинга гена, связанного с РНК-интерференцией, авторы настоящего изобретения выполнили секвенирование коротких РНК, как указано ниже.

Были созданы две библиотеки коротких РНК, происходящих из генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, S-317 и генотипа дикого типа SU, используя объединенные РНК, выделенные из развивающихся зародышей на стадии достижения середины зрелости. Общее секвенирование библиотек коротких РНК выполняли с использованием технологии Solexa (Hafner et al., 2008). Секвенирование этих двух библиотек было выполнено в секвенаторе Illumina's Solexa Sequencer, и образцы анализировали одновременно. Секвенирование библиотек коротких РНК SU и S-317 породило в целом 23160261 и 21696852 грубых считываний, соответственно. Анализ трех считываний привел к идентификации 22860098 и 21427392 последовательностей, длина которых находилась в пределах от 18 до 30 нуклеотидов, соответственно. Было определено присутствие и распределение коротких РНК, соответствующих CtFAD2-1, в библиотеках SU и S-317. Лишь низкие, едва выявляемые уровни коротких РНК, соответствующих CtFAD2-1, были выявлены исходя из обеих библиотек коротких РНК и распределялись почти равномерно по кодирующим областям генов CtFAD2-1. Не было явного различия между библиотеками, производящими из генотипа дикого типа и генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты.

Исходя из этих данных, был сделан вывод, что механизм опосредованного короткими РНК посттранскрипционного сайленсинга гена не был основным механизмом, с помощью которого было предотвращено накопление транскриптов с мутантного CtFAD2-1.

Исследования транзиторной экспрессии в листьях *N. benthamiana*

С целью дополнительного изучения феномена NMD авторы настоящего изобретения выполнили эксперименты по транзиторной экспрессии CtFAD2-1, происходящего и из генотипа дикого типа, и из генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, в листьях *N. benthamiana*.

Каждую из ORF для CtFAD2-1 встраивали в смысловой ориентации в модифицированный бинарный вектор pORE04 под контроль промотора CaMV-35S. Для инфильтрации в нижнюю сторону полностью развившихся листьев *N. benthamiana* использовали штамм AGL1 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий или 35S:CtFAD2-1, или его мутантную форму 35S:CtFAD2-1 Δ , вместе с 35S:P19, как описано в примере 5. После периода выращивания в течение еще 5 дней при 24°C участки с инфильтратами вырезали, из образцов получали тотальную РНК, используя набор RNeasy Mini Kit (Qiagen). Для измерения уровней РНК для CtFAD2-1 анализы с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени выполняли в трех повторах, используя Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), и проводили в ABI 7900HT Sequence Detection System, как описано в примере 1. ПЦР выполняли в следующих условиях: в начале 48°C в течение 30 мин, затем 95°C в течение 10 мин, с последующими 40 циклами: 95°C в течение 15 сек и 60°C в течение 60 сек. Праймерами для экзогенного гена CtFAD2-1 были: смысловой: 5'-GTGTATGTCTGCCTCCGAGA-3' (SEQ ID NO: 146); антисмысловой: 5'-GCAAGGTAGTAGAGGACGAAG-3' (SEQ ID NO: 147). Контрольный ген, CtKASII сафлора, использовали для нормализации уровней экспрессии; специфическим для него праймерами были: смысловой: 5'-CTGAAC TGCAATTATCTAGG-3' (SEQ ID NO: 144); и антисмысловой: 5'-GGTATTGGTATTGGATGGGCG-3' (SEQ ID NO: 145). Высокие уровни экспрессии CtFAD2-1 отмечали в листьях *N. benthamiana* с гена 35S-CtFAD2-1, происходящего из сорта дикого типа SU. В сравнении, намного более низкие уровни экспрессии отмечались в случае гена 35S-CtFAD2-1 Δ , происходящего из генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты.

Растения *A. thaliana* экотипа Col-0 трансформировали с использованием штамма AGL1 *A. tumefaciens*, содержащего бинарный вектор, содержащий специфический для семени промотор Fp1, управляющий областью, кодирующей или CtFAD2-1, или CtFAD2-1Δ, в соответствии со способом Clough и Bent (1998). Тотальную РНК выделяли из стручков, содержащих зародыши на стадии достижения середины созревания, потомков полученных в результате трансформированных растений, используя набор RNeasy Mini Kit (Qiagen). Исследования экспрессии генов проводили, используя препараты РНК, с использованием анализов с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, проводимых в трех повторах, как описано выше. Высокие уровни экспрессии CtFAD2-1 отмечались в стручках *Arabidopsis*, экспрессирующих Fp1-CtFAD2-1, происходящий из SU, однако экспрессия Fp1-CtFAD2-1Δ, происходящего из генотипа, определяющего высокое содержание олеиновой кислоты, была существенно уменьшенной в сравнении.

Было продемонстрировано, что специфические в отношении CtFAD2-1 короткие РНК не продуцировались на значительно более высоких уровнях в развивающихся семенах сафлора с высоким содержанием олеиновой кислоты, чем короткие РНК с гена дикого типа, несмотря на то, что количество транскрипта с мутантного CtFAD2-1 было существенно уменьшенным. Поэтому был сделан вывод, что уменьшение РНК для CtFAD2-1 в генотипе, определяющем высокое содержание олеиновой кислоты, обусловлено NMD, отличной от механизма опосредованного короткими РНК посттранскрипционного сайленсинга гена. Явление NMD также наблюдали, когда мутантную кодирующую область экспрессировали экзогенно или в листьях *N. benthamiana*, или в стручках *Arabidopsis*.

Пример 8. Выделение кДНК сафлора, которые являются кандидатами на кодирование FATB

Выделение последовательностей кДНК для FATB сафлора

Масло семени сафлора содержит приблизительно 7% пальмитиновой кислоты. Эта жирная кислота синтезируется в пластидах клеток развивающегося семени, из которых она

экспортируется в цитозоль клеток для включения в триацилглицерины. Основным ферментом для экспорта пальмитиновой кислоты является пальмитоил-АСР-тиоэстераза, которая гидролизует тиоэфирную связь между пальмитоильной составляющей и ацилпереносящим белком (АСР), с которым ацильная группа ковалентно связана, когда она синтезируется в пластиде. Фермент пальмитоил-АСР-тиоэстераза относится к группе растворимых, направляемых в пластиды ферментов, названных FATB. В масличных растениях этот фермент проявляет специфичность по отношению к переносящему короткоцепочечные насыщенные ацильные группы АСР в качестве субстрата. Ген, кодирующий фермент FATB, был в начале выделен из видов растений, накапливающих среднецепочечные насыщенные жирные кислоты, такие как лауриновая кислота (C12:0), из калифорнийского лавра (*Umbellularia californica*). Последующие исследования показали, что ортологи FATB присутствовали во всех тканях растения, в основном в семенах, с субстратной специфичностью, колеблющейся от C8:0-АСР до C18:0-АСР. В *Arabidopsis* и большинстве среднеширотных масличных культур, включая сафлор, пальмитиновая кислота является основной насыщенной жирной кислотой в масле семени.

Для выделения кДНК сафлора, которые кодируют кандидаты на FATB, библиотеку кДНК развивающихся семян сафлора подвергали скринингу, используя гетерологичный зонд, состоящий из фрагмента кДНК для FATB из хлопчатника (*Gossypium hirsutum*), как описано в примере 1. Одна полноразмерная кДНК, названная StFATB-T12, была выделена из библиотеки кДНК семян сафлора. Эта кДНК содержала открытую рамку считывания длиной приблизительно 1029 нуклеотидов, кодирующую полипептид из 343 аминокислот. Длины ее 5' и 3' UTR составляли 236 нуклеотидов и 336 нуклеотидов, соответственно. В соответствии с предсказаниями полипептид StFATB-T12 содержит предсказанный, ответственный за перенос пептид длиной приблизительно 60 аминокислот и остов из 210 аминокислотных остатков, который содержит два повтора сложения в виде спирали и многотяжевого листа, характерного для белков с так называемым сложением «хот-дог».

Исходя из базы данных, касающихся экспрессируемых

маркерных последовательностей (EST), сафлора *Compositae* Genome Project (CGP) ([cgpdb.ucdavis.edu/cgpdb2.](http://cgpdb.ucdavis.edu/cgpdb2)), были идентифицированы три различных EST, гомологичные CtFATB-T12, а именно EL379517, EL389827 и EL396749. Каждая была неполной длины. Соответствующие гены были названы CtFATB-A, CtFATB-B и CtFATB-C, соответственно. Полноразмерная кДНК CtFATB-T12, выделенная из библиотеки кДНК семени сафлора, была идентична по нуклеотидной последовательности EST из CtFATB-C в их перекрывающемся участке. Представлялось, что CtFATB-A был более отличающимся по своей нуклеотидной последовательности, чем другие две последовательности CtFATB.

Профиль экспрессии генов CtFATB, определенный с использованием анализа с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени.

Профиль экспрессии трех генов CtFATB исследовали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени, как изложено в примере 1. Были разработаны олигонуклеотидные праймеры, соответствующие уникальному району каждого из трех генов, включая CtFATB-A, смысловой праймер: 5'-AGAGATCATTTGGAGACTAGAGTG-3' (SEQ ID NO: 148); антисмысловой праймер: 5'-CCCATCAAGCACAATTCTTCTTAG-3' (SEQ ID NO: 149); CtFATB-B, смысловой праймер: 5'-CTACACAATCGGACTCTGGTGCT-3' (SEQ ID NO: 150); антисмысловой праймер: 5'-GCCATCCATGACACСТАТТСТА-3' (SEQ ID NO: 151); CtFATB-C, смысловой праймер: 5'-CCTCACTCTGGGACCAAGAAAT-3' (SEQ ID NO: 152); антисмысловой праймер: 5'-TTCTTGGGACATGTGACGTAGAA-3' (SEQ ID NO: 153). Реакции ПЦР проводили в трех повторах, как описано в примере 1.

Как продемонстрировано на фиг. 9, CtFATB-A продемонстрировал низкие уровни экспрессии в листьях, корнях и на всех трех стадиях развития зародышей, которые были проверены. CtFATB-B был действующим в листьях и корнях, но продемонстрировал экспрессию на более низком уровне в развивающихся зародышах, чем в листьях и корнях. Это наводило на мысль о том, что этот ген, вероятно, играет лишь незначительную роль, если вообще играет, в биосинтезе жирных кислот в развивающихся семенах. Напротив, CtFATB-C

продемонстрировал высокие уровни экспрессии во всех проверенных тканях, в частности, в развивающихся зародышах. Это означало, что CtFATB-C был основным геном, кодирующим FATB для продукции пальмитиновой кислоты в масле семени сафлора. Это не расходится с выделением авторами настоящего изобретения только одного клона кДНК для FATB из библиотеки, происходящей из зародыша семени, а именно CtFATB-T12, который был идентичен по последовательности CtFATB-C. На основе этих данных был выбран фрагмент ДНК размером приблизительно 300 п.о., происходящий из CtFATB-T 12 (CtFATB-C), в качестве последовательности гена, которая должна была использоваться для приготовления конструкций шпилечных РНК для уменьшения экспрессии FATB в семени сафлора, как описано в следующих примерах.

Пример 9: Выделение и экспрессия кДНК сафлора, кодирующей FAD6

Выделение последовательности кДНК для FAD6 сафлора

Особые жирнокислотные составы, обнаруживаемые в липидах мембран микросом и хлоропластов и запасаемых маслах семян, являются результатом сложной метаболической сети, которая функционирует с контролем этого состава, регулируя биосинтез жирных кислот и постоянное движение по так называемым прокариотическим и эукариотическим путям. Очевидно, что микросомальный фермент FAD2 играет основную роль в превращении олеата в линолеат в ER после экспорта олеиновой кислоты из пластиды и превращения в эфиры КоА в цитоплазме. Хлоропластная омега-6 десатураза (FAD6) является ферментом, который десатурирует 16:1 и 18:1 жирные кислоты до 16:2 и 18:2, соответственно, во всех 16:1- или 18:1-содержащих липидах мембран хлоропластов, включая фосфатидилглицерин, моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и сульфогвиновозилдиацилглицерин. Мутант *fad6 Arabidopsis*, как сообщалось, является слабым в десатурации 16:1 и 18:1 до 16:2 и 18:2, соответственно, во всех липидах хлоропластов (Browse et al., 1989). Когда мутант *fad6* выращивали при низкой температуре (5°C), листья становились хлоротическими, и скорость роста была

значительно уменьшенной по сравнению с диким типом (Hugly and Somerville, 1992). Последовательность кДНК, кодирующая FAD6, была сначала выделена из *Arabidopsis Falcone* и др. (1994). С того времени кДНК, кодирующая FAD6, и гены FAD6 были выделены из нескольких видов растений, включая *Brassica napus*, *Portulaca oleracea*, сою и *Ricinus communis*.

Для выделения клона кДНК, кодирующего хлоропластную десатуразу $\omega 6$ жирных кислот, кодируемую геном FAD6 из сафлора, провели поиск гомологичных последовательностей в базе данных CPG. Восемь последовательностей EST, а именно EL378905, EL380564, EL383438, EL385474, EL389341, EL392036, EL393518, EL411275, были идентифицированы и объединены в последовательность одного континга размером 808 нуклеотидов. Эта последовательность имела интактный 5'-конец, но была неполной на 3'-конце. Полноразмерная кДНК была впоследствии получена посредством амплификации с помощью ПЦР 3'RACE, используя, в качестве матрицы, ДНК, экстрагированную из библиотеки в лямбда кДНК, полученных из развивающихся семян сафлора (SU). Условиями ПЦР были условия, описанные в примере 2. Один олигонуклеотидный праймер, обозначенный ctFAD6-s2, использовали в реакции амплификации в сочетании с прямым праймером M13, поскольку последовательность для этого праймера присутствовала в векторе библиотеки кДНК. Последовательностью праймера ctFAD6-s2 была: 5'-CATTGAAGTCGGTATTGATATCTG-3' (SEQ ID NO: 154). Была получена кДНК размером 1545 п.о., которая имела открытую рамку считывания размером 1305 п.о., которая кодировала полипептид FAD6-кандидат длиной 435 аминокислот. Этот полипептид имел составляющую 60-74% идентичность аминокислотной последовательности с другими клонированными полипептидами FAD6 растений. Дендрограмма, демонстрирующая филогенетическую связь между последовательностью FAD6 сафлора и типичной пластидной $\Delta 12$ десатуразой FAD6, идентифицированной у высших растений, была создана с помощью Vector NTI (фиг. 10).

Профиль экспрессии CtFAD6, определенный с использованием анализа с помощью количественной ПЦР в режиме реального

времени.

Профиль экспрессии CtFAD6 был исследован с помощью количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, которую проводили, используя Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), и исследовали в системе ABI 7900HT Sequence Detection System с использованием параметров по умолчанию, описанных в примере 1. Используемыми праймерами были: ctFAD6-S2: 5'-CATTGAAGTCGGTATTGATATCTG-3' (SEQ ID NO: 155) и ctFAD6-a2: 5'-GTTCCAACAATATCTTCCACCAGT-3' (SEQ ID NO: 156). Реакции выполняли в трех повторах в общих объемах=10 мкл, содержащих 20 нг матрицы в виде тотальной РНК, 800 нМ каждого праймера, 0,25 мкл обратной транскриптазы и 5 мкл реагентов мастер-микс для ОТ-ПЦР в один прием. Условиями для обратной транскрипции и амплификации были 48°C в течение 30 мин, затем 95°C в течение 10 мин, с последующими 40 циклами 95°C в течение 15 сек и 60°C в течение 60 сек. Экспрессию с контрольного гена сафлора CtkasII использовали для нормализации уровней экспрессии FAD6. Расчеты были сделаны, как описано в примере 1.

Этот анализ показал, что CtFAD6 экспрессировался на относительно низких уровнях в листьях, корнях и на трех следующих одна за другой стадиях развития зародышей. Низкие уровни экспрессии, отмечаемые в развивающихся зародышах, не противоречили идеи, что FAD6 может играть относительно незначительную роль в десатурации олеата в семенах.

Пример 10. Разработка и приготовление генетических конструкций для сайленсинга генов биосинтеза жирных кислот в сафлоре

Шпилечные РНК (шРНК) представляют собой тип молекул РНК, которые широко использовались для уменьшения экспрессии генов в растениях. Шпилечные РНК типично транскрибируются в клетках растений с ДНК-конструкции, содержащей инвертированный повтор последовательности, происходящий из гена, подвергнутого сайленсингу. Таким образом, транскрипт в виде шпилечной РНК имеет полностью комплементарные смысловую и антисмысловую последовательности, которые гибридизуются с образованием

участка двухцепочечной РНК (дцРНК), соединенного с помощью последовательности петли. Такие структуры дцРНК подвергаются процессингу эндогенными аппаратами сайленсинга в клетках растений с образованием молекул коротких РНК длиной приблизительно 21-24 нуклеотида, соответствующих по последовательности гену, активность которого уменьшается. Эти короткие РНК могут образовывать комплексы с эндогенными белками, которые специфически подавляют экспрессию представляющего интерес гена. Такой сайленсинг может происходить на транскрипционном уровне, с использованием метилирования ДНК частей гена-мишени, на посттранскрипционном уровне посредством деградации мРНК-мишени, или в результате связывания мРНК с ингибированием их трансляции и, таким образом, уменьшением синтеза белка, кодируемого геном. Когда шпилечная РНК включает последовательность, которая является общей между членами семейства генов, шпилечная РНК может подавлять экспрессию каждого из этих генов, которые имеют эту последовательность.

Сафлор имеет большое семейство генов FAD2, при этом по крайней мере 11 членов были идентифицированы, как здесь описано (примеры 2-6). Сафлор также имеет множество генов, кодирующих полипептиды FATB, при этом по крайней мере три члена были идентифицированы (пример 8), и по крайней мере один ген FAD6 был идентифицирован (пример 9). Действительно, в результате экспериментов, описанных выше, не смогли идентифицировать все члены семейств генов в сафлоре. Для определения того, какие члены семейства генов FAD2 и FATB участвовали в биосинтезе линолевой кислоты или насыщенных жирных кислот, обнаруживаемых в масле семени сафлора, в частности, пальмитиновой кислоты, и того, был ли FAD6 также таким членом, было создано несколько генетических конструкций для экспрессии молекул шРНК в семени сафлора, для сайленсинга различных комбинаций генов FAD2, FATB и FAD6. Каждая из конструкций для шРНК была разработана для специфической экспрессии в развивающихся семенах сафлора во время периода синтеза масла. Это было осуществлено, используя или чужеродные промоторы, или промоторы, выделенные из сафлора,

для экспрессии конструкций, которые были введены в сафлор посредством трансформации растений.

Конструирование pCW600

Бинарный экспрессионный вектор для растений был разработан для экспрессии трансгенов в семенах, используя промотор гена *Oleosin1 Arabidopsis* (примечание на Web-сайте TAIR к гену At4g25140) (SEQ ID NO: 52). Выделенный промотор был длиной 1192 п.о., начиная с нуклеотида 12899298 в идентификационном № NC003075.7, за исключением того, что, внутри последовательности длиной 1198 п.о., 6 п.о. были пропущены во избежание расщепляемых распространёнными рестриктазами последовательностей для способствования стадиям клонирования позже. Промотор *AtOleosin* ранее использовался для сильной, специфической для семени экспрессии трансгенов в сафлоре и видах *Brassica* (Nykiforuk et al., 1995; Vanrooijen and Moloney, 1995). Этот промотор, вероятно, был действующим в двух направлениях промотором, управляя сильной, специфической для семени экспрессией кодирующих областей, соединённых с обоими концами фрагмента промотора. Промотор олеозина *Arabidopsis* имеет общие особенности с промотором олеозина *Brassica napus*, характеризующимся обладанием двунаправленного характера (Sadanandom et al., 1996). Промотор был химически синтезирован, клонирован в pGEMT-Easy, и EcoRI-фрагмент, содержащий промотор, концы которого были затуплены посредством реакции заполнения с помощью фермента фрагмента Кленова, лигирован в сайт для HindIII pCW265 после затупления концов с помощью фрагмента Кленова (Belide et al., 2011), создавая pCW600 (*AtOleosinP::* пусто). Этот вектор содержал ген - селектируемый маркер, который кодировал гигромицин-фосфотрансферазу (HPT), позволяющий, таким образом, осуществлять отбор на предмет устойчивости к гигромицину в культуре тканей во время процесса трансформации. Вектор также включал 35S::ген GFP, который позволял осуществлять отбор трансформированных клеток и тканей в соответствии с флуоресценцией при ультрафиолетовом освещении. Посредством встраивания промотора *AtOleosin* был разработан вектор для экспрессии кодирующей области, представляющей

интерес, которую можно было вставить в сайт множественного клонирования, расположенный 3' от промотора и 5' от сигнала полиаденилирования *nos* (*nos3'*). Этот вектор служил в качестве базового вектора для конструкций *pCW602* и *pCW603*, описанных ниже.

Конструирование *pXZP410*

Промотор линина льна (патент США с № 7642346) (SEQ ID NO: 53) был вставлен в виде *NotI*-*XhoI*-фрагмента в бинарный вектор *pT7-HELLSGATE12* (Wesley et al., 2001), создавая Gateway[™] приводящий к сайленсингу бинарный вектор *pXZP410*. Вектор *pXZP410* содержал ген - селектируемый маркер, который придавал устойчивость к канамицину во время культивирования тканей, и делал возможной специфическую для семени экспрессию конструкций для шпилечных РНК под контролем промотора линина. Вектор имел два интрона, один в смысловой ориентации, а другой в антисмысловой ориентации относительно промотора, и имел сайты для рекомбиназы *AttL1* и *AttL2*, фланкирующие интроны.

Для создания приводящей к сайленсингу конструкции исходя из *pXZP410*, две копии последовательности из гена-мишени в Gateway исходном векторе, экспрессия которого должна быть подавлена, были вставлены в вектор, одна вставлена 5', другая - 3' от двух интронов, в обратных ориентациях относительно друг друга, с образованием инвертированного повтора. Сайты для рекомбиназы позволяли быстро вставить две копии, используя систему для клонирования с использованием рекомбиназы Gateway (Invitrogen, Carlsbad, США), как описывалось ранее (Wesley et al., 2001). Этот вектор *pXZP410* использовался в качестве базового вектора для создания *pCW631* и *pCW632*, как описано ниже.

Конструирование *pCW571*

Последовательность длиной 300 п.о. (SEQ ID NO: 50), идентичная району гена *CtFATB-3* сафлора, соответствующему нуклеотидам 485-784 кДНК для *CtFATB-3*, была химически синтезирована и вставлена в *pENTR/D topo* (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя, создавая Gateway исходный клон, обозначенный *pCW569*. Фрагмент размером 756 п.о.

(SEQ ID NO: 49) кДНК для CtFAD2-2, соответствующий нуклеотидам 427-1182, был синтезирован и амплифицирован с помощью ОТ-ПЦР, исходя из РНК, выделенной из развивающихся семян сафлора. Праймерами были D28-PstI-5 (5'-CCTGCAGGTACCAATGGCTCGACGACACTG-3') (SEQ ID NO: 157) и D28-AscI-3 (5'-CGGCGCGCSTTCACSTCCTCATCTTTATCC-3') (SEQ ID NO: 158), соответственно. Праймеры включали 5' сайт для рестриктазы PstI и 3' сайт для рестриктазы AscI, таким образом позволяющие вставить амплифицированный фрагмент в соответствующие сайты pCW569, создавая pCW570. Этот вектор содержал составные районы из генов CtFATB и CtFAD2-2 в виде фрагмента размером 1080 п.о., фланкированного сайтами для рекомбиназы, AttL1 и AttL2. Две копии этого фрагмента FATB-FAD2-2 затем были вставлены в pXZP410, вторая копия инвертировано относительно первой, используя клоназу LR в соответствии с инструкциями поставщика (Invitrogen, Carlsbad, США). Результирующая плаزمида pCW571 содержала промотор линина льна для транскрипции района в виде инвертированного повтора специфическим для семени образом, чтобы продуцировать шРНК для уменьшения экспрессии генов CtFATB и CtFAD2-2 в семенах.

Конструирование pCW603

Фрагмент ДНК из pCW571, содержащий инвертированный повтор фрагментов CtFATB-CtFAD2-2 с двумя промежуточными интронами, был вырезан с помощью SpeI, затуплен, используя фрагмент Кленова I ДНК-полимеразы, и лигирован в сайт для EcoRV pCW600, создавая pCW603. Эта конструкция pCW603 была способна экспрессировать шРНК под контролем промотора AtOleosin в семенах сафлора, для уменьшения экспрессии CtFATB и CtFAD2-2.

Конструирование pCW581

Фрагмент размером 590 п.о. (SEQ ID NO: 51) ДНК, состоящий из фрагмента размером 290 п.о. CtFAD6, соответствующего нуклеотидам 451-750 кДНК для CtFAD6, и фрагмента размером 300 п.о. CtFATB, как и в случае pCW571, был химически синтезирован и вставлен в pENTR/D topo, создавая pCW579. Фрагмент размером 780 п.о. CtFAD2-2, описанный выше для pCW570, был клонирован в сайт для AscI pCW579, создавая pCW580. Эта конструкция была

исходным клонированным вектором, содержащим последовательности из генов CtFATB, CtFAD6 и CtFAD2-2, соединенные в том же порядке, что и во фрагменте ДНК размером 1370 п.о. с фланкирующими сайтами для рекомбиназы, AttL1 и AttL2. Две копии этого фрагмента FATB-FAD6-FAD2-2 были затем вставлены в виде инвертированного повтора в pXZP410, используя клоназу LR, создавая pCW581. Эта конструкция pCW581 представляла собой бинарный вектор, содержащий промотор линина льна, функционально связанный с инвертированным повтором, который после транскрипции в клетках развивающегося семени сафлора был способен экспрессировать шРНК для уменьшения экспрессии генов CtFATB, CtFAD6 и CtFAD2-2.

Конструирование pCW602

Фрагмент ДНК, содержащий инвертированный повтор соединенных районов CtFATB-CtFAD6-CtFAD2-2, с двумя промежуточными интронами, был ферментативно вырезан из pCW571 с помощью NotI, затуплен, используя фрагмент Кленова I, и затем лигирован в сайт для EcoRV pCW600, создавая pCW602. pCW602 содержал последовательности CtFATB-CtFAD6-CtFAD2-2 под контролем промотора AtOleosin, в отличие от pCW581, который имел ту же конструкцию и те же фрагменты генов за исключением промотора линина.

Конструирование pCW631 и pCW632

Хотя промотор линина был применим для экспрессии шРНК в семенах, и pCW571, и pCW581 содержали селектируемый маркер, который придавал устойчивость к канамицину. В предварительных экспериментах, относящихся к трансформации сафлора, авторы настоящего изобретения отметили, что экспланты не были в достаточной степени чувствительными к канамицину. По этой причине генную кассету устойчивости к канамицину pCW571 и pCW581 заменили генной кассетой устойчивости к гигромицину в качестве гена селектируемого маркера. Ген устойчивости к гигромицину, состоящий из промотора enCUP:ген устойчивости к гигромицину:район полиаденилирования nos3', вырезали из pCW265 с помощью расщепления рестриктазами SpeI и AvrII и использовали для замены кассеты устойчивости к канамицину в pCW571 и pCW581,

таким образом создавая pCW631 и 632, соответственно.

Суммируя, конструкции, используемые в этом первом ряде трансформаций сафлора, содержали следующие основные элементы.

<u>Вектор</u>	<u>Промотор</u>	<u>Фрагменты генов в инвертированном повторе</u>
pCW631	гена линина	<i>CtFAD2-2</i> и <i>CtFATB</i>
pCW632	гена линина	<i>CtFAD2-2</i> , <i>CtFAD6</i> и <i>CtFATB</i>
pCW602	AtOleosin	<i>CtFAD2-2</i> , <i>CtFAD6</i> и <i>CtFATB</i>
pCW603	AtOleosin	<i>CtFAD2-2</i> и <i>CtFATB</i>

Эти конструкции вводили в штамм AGL1 *Agrobacterium* и использовали для трансформации сафлора, как описано в примере 1, со следующими результатами.

Пример 11. Трансформация сафлора приводящими к генному сайленсингу конструкциями

Геномные конструкции использовали для трансформации извлеченных семядолей и гипокотилей сорта S317 сафлора, используя способ с использованием *Agrobacterium*, со спасением генерированных ростков, используя трансплантацию (Belide et al., 2011). Свыше 30 независимых трансформированных ростков, выращиваемых на нетрансформированных корневищах, (ниже называемых растениями T₀) было регенерировано в случае вектора pCW603 и выращено до достижения зрелости, как описано в примере 1. Интеграцию Т-ДНК в побеги сафлора T₀ проверяли с помощью ПЦР, используя специфические для векторной Т-ДНК праймеры, как описано Belide и др. (2011). Большинство растений, в которых, как обнаружено, отсутствовала Т-ДНК, использованная в случае конкретной трансформации, продолжавшие «ускользать» от отбора с помощью гигромицина во время регенерации в культуре тканей, были забракованы. Однако некоторые из них были сохранены в качестве «нулевых» растений или отрицательных контролей для сравнения с трансформированными растениями. Эти контрольные растения обрабатывали в тех же условиях, что и трансформированный материал в условиях культивирования тканей, трансплантации и таблицы.

Пример 12. Анализ жирнокислотного состава масла из семени трансгенного сафлора

Анализы жирных кислот проводили на отдельных семенах T_1 , полученных от трансформированных растений сафлора, как указано ниже. 30 независимых растений T_0 , трансформированных pCW603 на генетическом фоне S317, выращивались в теплице и самоопылялись для образования семени. До 10 зрелых семян из одной семенной шапки от каждого растения T_0 анализировали в отношении состава липидов, используя анализ с помощью GC, как описано в примере 1. Результаты анализа жирнокислотного состава семян сафлора, S317, трансформированного pCW603, суммированы в таблице 13. Поскольку каждое трансформированное растение сафлора T_0 , как ожидалось, является гетерозиготным по T-ДНК и, следовательно, порождает расщепляющуюся популяцию семян T_1 , предполагалось, что анализ 5-10 семян от каждого растения будет включать некоторые «нулевые» (сегреганты) семена. Такие семена-нулевые сегреганты были хорошими отрицательными контролями в этом эксперименте, поскольку они выросли и развивались в той же семенной шапке, что и трансформированные семена от того же растения. Как можно заметить, исходя из данных, представленных в таблице 13, уровни олеиновой кислоты, превышающие 87% (в виде вес% от общего содержания жирных кислот), отмечались в 6 независимых линиях (линиях 9, 12, 14, 20, 34 и 36) из 30 регенерированных линий. Многие из трансформированных семян имели содержание олеиновой кислоты в диапазоне 87-91,7%, с уровнями линолевой кислоты, составляющими 2,15-5,9%, и уровнями пальмитиновой кислоты, составляющими 2,32-3,45%. Уровни других жирных кислот в семенах не отличались значительно от нетрансформированных контролей. Максимальное содержание олеиновой кислоты, отмеченное в семени сафлора T_1 , трансформированного pCW603, составляло 91,7%, по сравнению с приблизительно 77% в нетрансформированных контрольных семенах S317 и семенах-нулевых сегрегантах. Примечательно, что липиды в семенах были также значительно уменьшенными по уровням 16:0, уменьшаясь с 4,5% вниз до 2,3%. Профили жирных кислот фракций TAG масел из семян, очищенных на пластинах для TLC, не отличались значительно от таковых для всех липидов, экстрагированных из семян.

Два показателя рассчитывали на основе общего жирнокислотного состава семени сафлора, принимая во внимание самые важные жирные кислоты в масле из семени. Ими были доля десатурации олеиновой кислоты (ODP) и значение отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO). Их рассчитывали для каждого семени, и данные представлены в таблице 13. Семена дикого типа (S317, нетрансформированные) и нулевые сегреганты имели отношение ODP, составляющее приблизительно 0,1500, и значение PLO, составляющее приблизительно 0,2830. Семена, трансформированные Т-ДНК из pCW603, продемонстрировали значительные уменьшения значений ODP и PLO. 13 семян, регенерированных из 6 независимых случаев, имели значение PLO, составляющее менее 0,1 и ODP, составляющее менее 0,06. Одна трансформированная линия имела ODP, составляющее 0,0229, и PLO, составляющее 0,0514.

Зрелые отдельные семена одной элитной линии, S317, трансформированной pCW603, строка 9, и нетрансформированной родительской линии S317 были подвергнуты липидному анализу, используя LC-MS. Эти анализы ясно показали, что масло из семян, трансформированных конструкцией AtOleosinp:шпилька CtFATB-CtFAD2-2 для РНК-интерференции, имело существенно измененный состав TAG и DAG (фиг. 11 и 12). Отмечалось явное увеличение уровня TAG(54:3) и уменьшение TAG(54:5), которые представляли собой в основном 18:1/18:1/18:1-TAG (триолеин) и 18:1/18:2/18:2-TAG, соответственно. Среди семян, проанализированных с помощью LC-MS, содержание триолеина (=54:3) в TAG составляло до 64,6% (моль%) при самом высоком уровне олеиновой кислоты (>90%, таблица 14) для семени из линии с сайленсингом с помощью РНК-интерференции, по сравнению с нетрансформированным (S-317) родителем, который имел уровни триолеина, находящиеся в пределах 47%-53%. Вторым содержащим олеат в наибольшем количестве TAG был 18:0/18:1/18:1, а затем 18:1/18:1/18:2. Наиболее очевидную разницу между этими маслами сафлора можно было также отметить для липидного класса DAG. Уровень DAG(36:1) был удвоенным в масле из трансформированного семени по сравнению с родительским семенем, в то время как

DAG(36:4) был уменьшенным на вплоть до 10%. DAG(36.1) представляет собой в основном 18:0/18:1-DAG, а DAG(36:4) представляет собой 18:2/18:2-DAG (дилинолеат). DAG в липидах семени были лишь минорным компонентом, поскольку уровни всех TAG были в приблизительно 100 раз выше таковых всех DAG (таблица 15).

Рост и морфология трансгенных растений

Трансформанты сафлора T_0 , содержащие Т-ДНК из pCW603, образовывали семя T_1 , которое расщеплялось по Т-ДНК, давая совокупность гомозигот, гемизигот и нулевых сегрегантов. Соотношение этих субпопуляций зависело от числа и сцепления событий вставки Т-ДНК в растениях T_0 , как и ожидалось в соответствии с менделеевской генетикой. Поэтому семена T_1 от растения T_0 были проанализированы по отдельности. Анализ профилей липидов из отдельных семян ясно показал, что отдельные семенные шапки содержат и нулевые и трансгенные случаи.

Таблица 13.

Жирнокислотный состав липидов в отдельных семенах сафлора Т1, трансформированных Т-ДНК pCW603 на фоне S-317. Уровень каждой жирной кислоты (%) представлен в виде процента от общего содержания жирных кислот.

Образец	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	PLO**	ODP** *
S317 (1)	4.60	1.47	75.69	0.69	16.49	0.00	0.31	0.26	0.27867	0.1789
S317 (2)	4.64	1.47	77.02	0.68	15.09	0.00	0.32	0.28	0.25620	0.1638
S317 (3)	4.56	1.38	76.20	0.68	16.14	0.00	0.32	0.26	0.27161	0.1748
S317 (4)	4.61	1.57	76.41	0.69	15.64	0.00	0.34	0.26	0.26506	0.1699
S317 (5)	4.55	1.51	77.90	0.69	14.28	0.00	0.33	0.25	0.24176	0.1549
Нулевой (1)	4.77	2.10	78.07	0.85	13.82	0.00	0.38	0.00	0.23815	0.1504
Нулевой (2)	4.93	1.96	76.02	0.89	15.55	0.00	0.38	0.28	0.26942	0.1698
Нулевой (3)	5.59	2.22	75.15	0.92	15.68	0.00	0.45	0.00	0.28302	0.1726
Нулевой (4)	4.61	1.65	78.52	0.78	13.58	0.00	0.35	0.28	0.23163	0.1474
Нулевой (5)	5.57	2.93	78.10	0.93	11.96	0.00	0.51	0.00	0.22445	0.1328
TS603.12 (5)	2.56	2.05	91.73	0.84	2.15	0.00	0.37	0.29	0.05136	0.0229
TS603.09 (4)	2.32	1.87	91.45	0.74	3.09	0.00	0.20	0.34	0.05911	0.0326
TS603.09 (5)	2.66	2.43	91.41	0.78	2.45	0.00	0.27	0.00	0.05587	0.0261
TS603.09 (1)	2.42	2.08	91.17	0.74	3.02	0.00	0.23	0.33	0.05972	0.0321
TS603.36 (1)	2.65	2.40	91.01	0.67	2.25	0.00	0.45	0.32	0.05379	0.0241
TS603.36 (2)	2.73	1.77	90.53	0.69	3.36	0.00	0.36	0.32	0.06728	0.0358
TS603.20 (4)	2.94	1.31	89.63	0.88	4.58	0.00	0.31	0.34	0.08393	0.0486
TS603.34 (4)	3.21	2.55	89.62	0.89	2.92	0.00	0.48	0.32	0.06847	0.0316
TS603.14 (2)	2.99	1.74	89.31	0.88	4.39	0.00	0.35	0.34	0.08257	0.0468
TS603.09 (3)	2.90	1.75	89.00	0.83	5.52	0.00	0.00	0.00	0.09465	0.0584
TS603.34 (5)	3.36	2.23	88.92	0.85	3.89	0.00	0.43	0.32	0.08151	0.0419
TS603.34 (2)	3.24	1.76	88.74	1.02	4.51	0.00	0.37	0.37	0.08725	0.0483
TS603.14 (1)	3.21	1.51	88.65	0.88	5.05	0.00	0.34	0.37	0.09310	0.0539

Образец*	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	PLO**	ODP***
TS603.20 (3)	3.29	1.39	88.44	0.98	5.90	0.00	0.00	0.00	0.10391	0.0625
TS603.12 (2)	3.00	1.63	88.42	0.75	5.60	0.00	0.31	0.30	0.09722	0.0595
TS603.20 (2)	3.45	1.66	88.36	0.99	5.54	0.00	0.00	0.00	0.10175	0.0590
TS603.20 (1)	3.30	1.46	88.16	0.89	5.53	0.00	0.33	0.31	0.10021	0.0590
TS603.14 (5)	3.45	1.66	87.43	0.87	5.88	0.00	0.36	0.35	0.10673	0.0630
TS603.14 (4)	3.37	1.84	87.36	0.88	5.81	0.00	0.39	0.35	0.10509	0.0624
TS603.36 (4)	3.24	2.21	87.33	0.67	5.60	0.00	0.42	0.30	0.10117	0.0602
TS603.36 (3)	3.42	2.33	86.82	0.71	5.68	0.00	0.45	0.32	0.10491	0.0614
TS603.14 (3)	3.58	1.61	86.50	0.86	6.74	0.00	0.36	0.35	0.11931	0.0723
TS603.12 (4)	3.68	1.39	85.46	0.92	7.97	0.00	0.29	0.30	0.13624	0.0853
TS603.12 (3)	3.55	2.06	85.01	0.74	8.02	0.00	0.35	0.27	0.13609	0.0862
TS603.23 (5)	4.93	1.75	82.63	1.04	8.75	0.00	0.41	0.31	0.16561	0.0958
TS603.17 (5)	4.68	1.57	82.06	0.70	10.37	0.00	0.33	0.31	0.18339	0.1122
TS603.17 (4)	4.41	1.31	81.94	0.68	11.11	0.00	0.28	0.28	0.18940	0.1194
TS603.24 (3)	4.24	2.17	81.70	0.68	10.28	0.00	0.42	0.27	0.17772	0.1118
TS603.24 (5)	4.48	2.18	81.15	0.69	10.56	0.00	0.41	0.27	0.18541	0.1152
TS603.24 (4)	4.39	2.16	80.94	0.70	10.88	0.00	0.41	0.25	0.18869	0.1185
TS603.23 (4)	4.38	2.01	80.86	0.82	11.23	0.00	0.40	0.29	0.19312	0.1220
TS603.24 (2)	4.50	2.39	80.70	0.68	10.79	0.00	0.44	0.26	0.18946	0.1180
TS603.17 (3)	4.60	1.75	80.65	0.68	11.69	0.00	0.35	0.27	0.20203	0.1266
TS603.24 (1)	4.28	2.01	80.54	0.70	11.53	0.00	0.40	0.27	0.19632	0.1252
TS603.17 (2)	4.40	1.75	80.33	0.73	11.92	0.00	0.35	0.28	0.20316	0.1292
TS603.06 (3)	4.38	1.60	80.22	0.88	12.31	0.00	0.34	0.28	0.20803	0.1330
TS603.06 (5)	4.52	1.47	80.11	0.84	12.50	0.00	0.29	0.27	0.21245	0.1350
TS603.15 (3)	4.65	2.01	79.94	0.85	11.92	0.00	0.38	0.26	0.20720	0.1297
TS603.34 (3)	4.77	2.44	79.79	0.86	11.42	0.00	0.45	0.28	0.20281	0.1252
TS603.36 (5)	4.92	2.43	79.78	0.68	11.24	0.00	0.44	0.26	0.20258	0.1235

Образец*	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	PLO**	ODP** *
TS603.06 (1)	4.49	1.89	79.53	0.82	12.61	0.00	0.38	0.29	0.21495	0.1368
TS603.23 (2)	4.47	1.74	79.45	0.86	12.86	0.00	0.35	0.28	0.21810	0.1393
TS603.28 (4)	4.99	2.08	79.45	0.94	12.14	0.00	0.41	0.00	0.21554	0.1325
TS603.28 (1)	4.73	2.31	79.42	0.85	12.26	0.00	0.43	0.00	0.21390	0.1337
TS603.28 (5)	5.04	1.96	79.37	0.97	12.66	0.00	0.00	0.00	0.22301	0.1376
TS603.28 (2)	4.95	2.16	79.33	0.88	12.29	0.00	0.39	0.00	0.21728	0.1341
TS603.15 (2)	4.55	1.73	79.31	0.89	12.90	0.00	0.36	0.27	0.21995	0.1399
TS603.06 (4)	4.60	1.73	79.25	0.88	12.93	0.00	0.33	0.28	0.22121	0.1403
TS603.15 (1)	4.50	2.11	79.11	0.84	12.79	0.00	0.39	0.26	0.21860	0.1392
TS603.12 (1)	4.28	1.33	79.08	0.76	13.82	0.21	0.27	0.26	0.22880	0.1507
TS603.06 (2)	4.63	2.24	79.08	0.78	12.58	0.00	0.42	0.27	0.21765	0.1373
TS603.09 (2)	4.39	1.72	78.80	0.73	13.30	0.19	0.34	0.30	0.22453	0.1462
TS603.23 (1)	4.56	2.11	78.63	0.79	13.24	0.00	0.39	0.27	0.22648	0.1442
TS603.17 (1)	4.43	1.49	78.47	0.74	13.92	0.37	0.31	0.26	0.23386	0.1540
TS603.15 (4)	4.67	1.99	78.41	0.84	13.48	0.00	0.36	0.26	0.23138	0.1467
TS603.28 (3)	4.89	1.67	78.31	0.88	13.29	0.31	0.35	0.31	0.23208	0.1479
TS603.34 (1)	4.65	2.13	77.75	0.83	13.58	0.35	0.41	0.30	0.23441	0.1519
TS603.23 (3)	4.59	1.70	77.28	0.85	14.63	0.31	0.36	0.28	0.24866	0.1620
TS603.15 (5)	4.69	1.64	77.23	0.97	14.85	0.00	0.35	0.27	0.25302	0.1613

* Образцы, помеченные с использованием этого условного обозначения: TS603.12(5) означает растение, трансформированное вектором pCW603, случай 12, семя 5. Образцы, помеченные как «нулевые», определены с использованием анализа с помощью ПЦР как нетрансформированные «ускользания» при трансформации растений.

** Показатель PLO, рассчитанный как $(16:0+18:2)/18:1$

***Показатель ODP, рассчитанный как $(18:2+18:3)/(18:1+18:2+18:3)$

Таблица 14.

Жирнокислотный состав всех липидов одного семени
(% от общего содержания жирных кислот).

Образец	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
S317 Семя 1	5.21	2.35	77.36	0.88	14.20	0.00	0.00	0.00
S317 Семя 2	5.08	3.04	77.20	0.80	13.88	0.00	0.00	0.00
S317 Семя 3	5.00	2.65	78.89	0.78	12.67	0.00	0.00	0.00
TS603.9 Семя 1	3.76	3.07	87.93	0.91	4.34	0.00	0.00	0.00
TS603.9 Семя 2	3.33	2.98	89.97	0.93	2.80	0.00	0.00	0.00
TS603.9 Семя 4	3.61	4.28	88.20	0.87	3.05	0.00	0.00	0.00
TS603.9 Семя 5	3.61	3.13	88.45	0.92	3.38	0.00	0.50	0.00
TS603.9 Семя 6	4.45	3.04	85.50	0.90	5.62	0.00	0.51	0.00

Таблица 15.

Относительное количество TAG и DAG.

Образец	Отношение TAG/DAG
S317 Seed 1	60.4
S317 Seed 2	84.7
S317 Seed 3	71.2
TS603.9 Семя 1	117.5
TS603.9 Семя 2	124.2
TS603.9 Семя 4	97.8
TS603.9 Семя 5	96.5
TS603.9 Семя 6	95.9

Семена от некоторых из трансгенных линий выращивали в контролируемых условиях (температуры, почвы, оптимального полива и внесения удобрений, но при естественном освещении) в теплице для исследования морфологии и скорости роста растений. Фенотипические различия не отмечались между трансформированными растениями T_1 и их сибсами – нулевыми сегрегантами. Трансформированные семена прорастали с той же скоростью, что и нетрансформированные семена, и давали проростки, имеющие одинаковую начальную скорость роста проростков (силу). Все посеянные семена укоренялись и вырастали в полностью плодоносящие растения. ДНК экстрагировали из верхушечных концов соответствующих листьев отдельных растений поколения T_1 , и анализ с помощью ПЦР проводили для определения соотношения нулевых и трансгенных растений. Как и ожидалось, были идентифицированы нулевые сегреганты.

Этот фенотипический анализ показал, что растения сафлора, трансформированные Т-ДНК pCW603 и экспрессирующие трансгены, не

страдают от каких-либо вредных эффектов по сравнению с нулевыми сегрегантами.

Семена сафлора поколения T_2 проверяли в отношении масличности. Семена от нескольких растений с высокими уровнями олеиновой кислоты (таблица 13) выращивали в зрелые растения, образующие семена второго поколения (семя T_2). Эти семена собирали при достижении созревания и анализировали в отношении жирнокислотного состава их масла. Данные представлены в таблице 16. Хотя семя T_1 продемонстрировало вплоть до приблизительно 92% олеиновой кислоты, в семени T_2 достигалось 94,6% олеиновой кислоты. Отмеченное увеличение в поколении T_2 по сравнению с поколением T_1 могло быть обусловлено гомозиготностью трансгена, или просто большим числом проанализированных линий.

Анализ с помощью блот-гибридизации по Саузерну используется для определения числа вставок Т-ДНК в каждой трансформированной линии, и линии с одной вставкой Т-ДНК отбирают. Масличность семян T_2 не отличается значительно от таких контрольных, нетрансформированных семян с тем же генетическим фоном и выращенных в тех же условиях.

Анализ семян сафлора, трансформированных Т-ДНК из pCW631.

Семена T_1 сорта сафлора S-317, трансформированного pCW631, анализировали так же в отношении их жирнокислотного состава. В таблице 17 представлены данные и показали ODP и PLO для этих семян. Содержание олеиновой кислоты в липидах этих семян составляло вплоть до 94,19%. Содержание пальмитиновой кислоты в семени TS631-01 T_1 (21) с наибольшим уровнем олеиновой кислоты составляло 2,43%, значение ODP составляло 0,0203, и значение PLO составляло 0,0423. Эти анализы показали, что конструкция для шпилечной РНК в pCW631, как правило, порождала более высокие уровни олеиновой кислоты, чем конструкция в pCW603 после трансформации в сафлор с генетическим фоном S-317. Эти данные наблюдений означали, что промотор линина, используемый в pCW631, экспрессировал шпилечную РНК сильнее или с лучшим согласованием по времени экспрессии, или и то, и другое, по сравнению с промотором AtOleosin, используемом в pCW603.

Семена T_2 сорта сафлора S-317, трансформированного Т-ДНК

из pCW631, были проанализированы с помощью GC. Отмечались уровни олеиновой кислоты вплоть до 94,95% со значением ODP, составляющим 0,01, и значением PLO, составляющим 0,035.

Семена и растения сафлора, трансформированные T-ДНК из конструкций pCW632 и pCW602, анализируют так же, как и семена и растения, трансформированные pCW603 и pCW631. Анализ с помощью GC семени T₁ сорта сафлора S-317, трансформированного pCW632, показал, что уровень олеиновой кислоты составляет вплоть до 94,88%, со значением ODP, составляющим 0,0102, и значением PLO, составляющим 0,0362. Их семена T₂ продемонстрировали вплоть до 93,14% олеиновой кислоты, со значением ODP, составляющим 0,0164, и значением PLO, составляющим 0,0452.

Экстракция более больших объемов масла из семян сафлора

Семена T4 от гомозиготной трансгенной линии, обозначенной TS603-22.6, собирали, и все масло из семян экстрагировали, используя устройство Soxhlet, как описано в примере 1. Аликвоты экстрагированного масла анализировали с помощью GC (таблица 18). Всего 643 грамм масла было выделено. Экстракции 2, 3, 5, и 6 объединяли, в то время как экстракции 4, 7 и 8 объединяли в обособленной серии. Смеси в дальнейшем анализировали в отношении жирнокислотного состава с помощью GC. Эти данные представлены в таблице 18.

Пример 13. Разработка и приготовление дополнительных, вызывающих генный сайленсинг конструкций

На основе результатов, описанных в примерах 10-12, другие вызывающие генный сайленсинг конструкции были приготовлены, как указано ниже, для увеличения содержания олеиновой кислоты в масле семени сафлора и уменьшения отношений ODP или PLO. Эти вызывающие генный сайленсинг конструкции включали сочетание различных промоторов, из несафлоровых источников, а также сафлоровых источников, для достижения максимального уменьшения экспрессии генов FAD2-2, FATB-3 и FAD6 сафлора, и, кроме того, сайленсинга более чем одного гена FAD2 помимо FAD2-2. Эти конструкции используют для трансформации сортов сафлора, которые имели инактивированные варианты эндогенного гена CtFAD2-1, таких как S-317, Ciano-OL и Lesaff496.

Конструирование pCW700

Этот бинарный экспрессионный вектор для растений содержит два чужеродных (несафлоровых) промоторов с различными, но перекрывающимися картинами экспрессии в семени сафлора, а не один промотор, для образования шпилечной РНК для уменьшения экспрессии эндогенного CtFATB и CtFAD2-2. Двумя промоторами являются промотор AtOleosin и промотор линина льна, и две кассеты для экспрессии шРНК находятся в одной и той же молекуле Т-ДНК. Этот вектор конструируют посредством вырезания рестриктазами кассеты для экспрессии гена для шРНК из pCW631, содержащей промотор линина и область, кодирующую шРНК для сайленсинга CtFAD2-2 и CtFATB, и встраивают ее в Т-ДНК pCW603, таким образом создавая конструкцию, кодирующую шпилечную РНК, направленную против этих двух генов сафлора. Эту конструкцию используют для трансформации сортов сафлора, таких как Lesaff496, Ciano-OL и S-317.

Таблица 16.

Жирнокислотный состав липида из отдельных семян сафлора Т2, трансформированных Т-ДНК рСW603 на фоне S-317. Уровень каждой жирной кислоты (%) представлен в виде процента от общего содержания жирных кислот.

<u>Образец</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:0</u>	<u>C20:1</u>	<u>ODP</u>	<u>PLO</u>
TS603-22.3 T2 (4)	2.4	0.9	94.6	1.7	0.0	0.2	0.0	0.0181	0.043956
TS603-22.6(5)	2.5	1.0	94.5	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0214	0.048069
TS603-22.6(2)	2.1	0.9	94.4	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0266	0.04934
TS603-22.6(4)	2.4	1.0	94.3	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0239	0.049028
TS603-22.4 T2 (2)	2.2	1.5	94.3	1.8	0.0	0.0	0.1	0.0200	0.042739
TS603-22.6 T2 (20)	2.2	1.1	94.2	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0256	0.048622
TS603-22.05(4) T2	2.2	1.4	94.2	2.0	0.0	0.1	0.0	0.0212	0.044211
TS603-22.8 T2 (1)	2.1	1.1	93.9	2.5	0.2	0.1	0.0	0.0263	0.04839
TS603-22.6 T2 (10)	2.8	1.0	93.9	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0223	0.052359
TS603-22.6 T2 (6)	2.9	1.1	93.9	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0214	0.052318
TS603-22.05(1) T2	2.2	1.3	93.8	2.2	0.1	0.2	0.0	0.0240	0.04783
TS603-22.6 T2 (13)	2.9	1.2	93.8	1.7	0.0	0.2	0.0	0.0185	0.049564
TS603-22.6 T2 (16)	2.9	0.9	93.8	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0249	0.055517
TS603-22.4 T2 (1)	2.5	1.5	93.7	1.9	0.1	0.1	0.0	0.0204	0.046933
TS603-22.6(1)	2.7	1.2	93.7	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0241	0.052497
TS603-22.3 T2 (5)	2.5	1.1	93.6	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0278	0.05449
TS603-08.2(4)	2.2	0.8	93.6	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0355	0.05861
TS603-22.6 T2 (9)	2.9	1.2	93.5	2.2	0.0	0.2	0.0	0.0235	0.054815
TS603-22.6 T2 (19)	2.9	1.1	93.5	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0245	0.055483
TS603-22.4 T2 (3)	2.4	1.0	93.5	2.8	0.1	0.0	0.0	0.0299	0.056044
TS603-22.1 T2 (2)	2.7	0.9	93.5	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0306	0.059281
TS603-22.6 T2 (14)	3.1	1.5	93.4	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0222	0.054943
TS603-08.2(3)	2.7	0.9	93.4	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0306	0.059851

Образец	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:0</u>	<u>C20:1</u>	<u>ODP</u>	<u>PLO</u>
TS603-22.05(5) T2	2.3	1.6	93.4	2.5	0.2	0.0	0.0	0.0267	0.051234
TS603-22.6 T2 (15)	3.0	1.2	93.3	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0261	0.057723
TS603-22.5 T2 (11)	2.2	1.2	93.3	2.3	0.0	0.3	0.4	0.0285	0.048123
TS603-22.6 T2 (8)	2.9	1.2	93.3	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0265	0.057514
TS603-22.5 T2 (12)	2.2	1.3	93.3	2.3	0.0	0.3	0.4	0.0289	0.047835
TS603-22.6 T2 (7)	3.1	1.3	93.2	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0265	0.059228
TS603-22.4 T2 (8)	2.1	1.8	93.2	2.0	0.0	0.3	0.3	0.0254	0.044186
TS603-22.6 T2 (11)	2.9	1.2	93.1	2.5	0.0	0.1	0.0	0.0271	0.057755
TS603-22.3 T2 (1)	2.5	1.2	93.1	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0335	0.060295
TS603-22.5 T2 (14)	2.1	1.3	93.1	2.6	0.0	0.2	0.4	0.0318	0.050656
TS603-22.5 T2 (16)	2.3	1.5	93.0	2.3	0.0	0.3	0.3	0.0283	0.049621
TS603-22.5 T2 (18)	2.3	1.0	93.0	2.8	0.0	0.2	0.4	0.0341	0.05407
TS603-22.5 T2 (15)	2.0	0.9	92.9	3.0	0.0	0.3	0.5	0.0381	0.054149
TS603-22.6 T2 (12)	3.0	1.2	92.9	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0294	0.061518
TS603-22.05(3) T2	2.5	1.0	92.9	3.3	0.1	0.2	0.0	0.0350	0.061372
TS603-22.6 T2 (18)	2.9	0.8	92.9	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0349	0.06593
TS603-22.6(3)	2.7	0.7	92.9	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0383	0.067112
TS603-22.8 T2 (4)	2.6	1.2	92.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0358	0.063416
TS603-22.6 T2 (17)	2.7	0.8	92.9	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0375	0.067028
TS603-22.1 T2 (1)	2.7	1.1	92.8	3.1	0.2	0.0	0.0	0.0334	0.062312
TS603-22.4 T2 (11)	2.2	1.4	92.6	2.7	0.0	0.3	0.4	0.0340	0.053189
TS603-22.4 T2 (12)	2.1	1.4	92.6	2.9	0.0	0.3	0.4	0.0355	0.054077
TS603-22.1 T2 (4)	2.4	0.9	92.6	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0434	0.069653
TS603-44(2) T1	2.7	1.1	92.5	3.3	0.0	0.2	0.0	0.0358	0.065506
TS603-22.8 T2 (5)	2.9	1.1	92.4	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0381	0.069194

<u>Образец</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:0</u>	<u>C20:1</u>	<u>ODP</u>	<u>PLO</u>
TS603-22.5 T2 (6)	2.1	2.0	92.4	2.4	0.0	0.3	0.4	0.0305	0.049301
TS603-22.4 T2 (5)	2.8	1.7	92.4	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0318	0.062593
TS603-22.4 T2 (13)	2.3	1.1	92.3	3.3	0.0	0.2	0.4	0.0406	0.060311
TS603-22.3 T2 (3)	2.7	1.4	92.3	3.4	0.1	0.1	0.0	0.0368	0.065979
TS603-34.3 T2 (1)	2.6	1.1	92.3	3.9	0.0	0.1	0.0	0.0421	0.070162
TS603-34.3 T2 (13)	2.4	1.7	92.2	2.7	0.0	0.3	0.3	0.0332	0.055508
TS603-22.5 T2 (10)	2.4	1.6	92.1	3.0	0.0	0.3	0.3	0.0366	0.058947
TS603-19.02(3) T2	2.5	2.0	92.1	3.2	0.0	0.1	0.0	0.0345	0.061861
TS603-08.2(1)	2.6	1.0	92.1	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0444	0.073162
TS603-22.1 T2 (3)	2.5	1.1	92.1	4.0	0.1	0.2	0.0	0.0435	0.070895
TS603-22.5 T2 (8)	2.2	1.6	92.1	3.1	0.0	0.3	0.4	0.0381	0.058128
TS603-19.2 T2 (11)	2.4	0.9	91.9	3.9	0.0	0.2	0.4	0.0463	0.067902
TS603-44(1) T1	3.0	0.9	91.9	4.0	0.0	0.1	0.0	0.0439	0.076059
TS603-19.02(1) T2	2.4	1.8	91.7	3.4	0.2	0.2	0.1	0.0384	0.063629
TS603-22.3 T2 (2)	3.0	1.1	91.7	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0434	0.076459
TS603-22.5 T2 (7)	2.3	1.7	91.7	3.2	0.0	0.3	0.4	0.0392	0.060643
TS603-22.4 T2 (9)	2.3	1.3	91.7	3.6	0.0	0.3	0.5	0.0442	0.064255
TS603-22.5 T2 (9)	2.4	1.6	91.6	3.4	0.0	0.3	0.4	0.0414	0.063679
TS603-22.4 T2 (7)	2.4	1.3	91.5	3.9	0.0	0.3	0.4	0.0462	0.068489
TS603-22.4 T2 (10)	2.4	1.4	91.5	3.7	0.0	0.3	0.5	0.0453	0.066056
TS603-34.3 T2 (2)	2.7	1.6	91.4	3.9	0.0	0.1	0.1	0.0442	0.072984
TS603-22.4 T2 (4)	2.7	1.3	91.4	4.2	0.1	0.1	0.0	0.0461	0.076004
TS603-19.02(5) T2	2.4	1.9	91.4	4.1	0.1	0.2	0.0	0.0445	0.070234
TS603-10.02(2) T2	2.7	1.5	91.2	4.4	0.1	0.1	0.0	0.0480	0.077276
TS603-22.5 T2 (13)	2.4	1.5	91.2	4.1	0.0	0.2	0.4	0.0489	0.071172

<u>Образец</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:0</u>	<u>C20:1</u>	<u>ODP</u>	<u>PLO</u>
TS603-19.02(4)	2.6	1.8	91.1	4.3	0.2	0.1	0.0	0.0471	0.075467
TS603-22.4 T2 (6)	2.4	1.6	91.0	4.1	0.0	0.3	0.4	0.0488	0.07045
TS603-34.4 T2 (2)	2.7	1.7	90.8	4.4	0.1	0.1	0.0	0.0487	0.078563
TS603-27.5 T2 (1)	2.7	1.3	90.7	4.3	0.0	0.3	0.3	0.0511	0.076932
TS603-19.02(2) T2	2.7	1.7	90.6	4.8	0.0	0.2	0.0	0.0532	0.083056
TS603-22.5 T2 (17)	2.7	1.7	90.5	4.0	0.0	0.4	0.4	0.0480	0.074387
TS603-08.2(5)	3.0	1.1	90.5	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0583	0.091395
TS603-19.2 T2 (17)	2.6	1.8	90.5	4.2	0.0	0.3	0.3	0.0504	0.074894
TS603-19.2 T2 (10)	2.5	2.2	90.4	3.9	0.0	0.4	0.3	0.0464	0.070963
TS603-34.3 T2 (3)	2.8	1.5	90.2	5.2	0.1	0.1	0.0	0.0575	0.088097
TS603-19.2 T2 (19)	2.5	2.3	90.2	4.0	0.0	0.3	0.3	0.0481	0.073009
TS603-09.8 T2 (1)	2.8	1.3	90.0	5.0	0.0	0.3	0.3	0.0589	0.086178

<u>Образец</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:0</u>	<u>C20:1</u>	<u>ODP</u>	<u>PLO</u>
S317 (1)	5.57	2.93	78.10	11.96	0.00	0.51	0.00	0.1531	0.224455
S317 (2)	4.77	2.10	78.07	13.82	0.00	0.38	0.00	0.1770	0.23815
S317 (3)	4.55	1.51	77.90	14.28	0.00	0.33	0.25	0.1865	0.241763
S317 (4)	4.61	1.65	78.52	13.58	0.00	0.35	0.28	0.1764	0.231634

Таблица 17.

Анализ жирнокислотного состава липида из отдельных семян сафлора Т2, трансформированных Т-ДНК pCW631 на фоне S-317. Уровень каждой жирной кислоты (%) представлен в виде процента от общего содержания жирных кислот.

FAME ID#	Образец	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C20:1	C22:0	ODP	PLO
916	TS631-01 T1 (21)	2.43	0.13	1.06	94.19	1.56	0.24	0.39	0.27	0.0203	0.0423 ⁵
912	TS631-01 T1 (17)	2.37	0.10	1.17	93.73	1.87	0.23	0.34	0.19	0.0230	0.0452
913	TS631-01 T1 (18)	2.57	0.11	0.97	93.27	2.56	0.22	0.38	0.19	0.0305	0.0550
897	TS631-01 T1 (16)	2.50	0.10	1.04	93.24	2.35	0.21	0.37	0.18	0.0247	0.0521
910	TS631-03 T1 (1)	2.42	0.11	1.60	93.00	2.01	0.30	0.34	0.23	0.0250	0.0476
921	TS631-04 T1 (1)	2.49	0.11	1.31	92.93	2.34	0.27	0.34	0.20	0.0275	0.0521
895	TS631-01 T1 (14)	2.54	0.11	1.07	92.82	2.56	0.25	0.37	0.20	0.0316	0.0549
917	TS631-01 T1 (22)	2.66	0.17	1.16	92.75	2.68	0.28	0.42	0.30	0.0334	0.0576
918	TS631-03 T1 (2)	2.36	0.11	2.02	92.64	1.92	0.36	0.32	0.25	0.0242	0.0463
914	TS631-01 T1 (19)	2.68	0.12	1.23	92.30	2.84	0.28	0.34	0.21	0.0345	0.0598
898	TS631-02 T1 (1)	2.99	0.12	1.21	90.79	4.06	0.26	0.32	0.26	0.0483	0.0777
915	TS631-01 T1 (20)	3.74	0.00	1.07	90.67	4.14	0.00	0.00	0.38	0.0456	0.0869
919	TS631-03 T1 (3)	4.23	0.10	1.50	81.70	11.92	0.30	0.29	0.27	0.1494	0.1976
899	TS631-02 T1 (2)	4.54	0.08	1.61	80.87	12.07	0.31	0.26	0.25	0.1525	0.2054
900	TS631-02 T1 (3)	4.47	0.08	2.07	80.64	11.90	0.37	0.24	0.23	0.1506	0.2030
901	TS631-02 T1 (4)	4.60	0.09	1.83	80.24	12.51	0.29	0.22	0.22	0.1586	0.2132
906	TS631-02 T1 (9)	4.44	0.09	1.74	80.20	12.76	0.31	0.23	0.24	0.1619	0.2144
903	TS631-02 T1 (6)	4.47	0.10	1.60	79.99	13.06	0.30	0.25	0.24	0.1664	0.2191
907	TS631-02 T1 (10)	4.39	0.09	1.82	79.90	12.98	0.33	0.24	0.24	0.1655	0.2174
909	TS631-02 T1 (12)	4.31	0.09	1.52	79.87	13.48	0.27	0.26	0.19	0.1720	0.2227
905	TS631-02 T1 (8)	4.46	0.09	1.57	79.58	13.47	0.30	0.30	0.23	0.1730	0.2254
902	TS631-02 T1 (5)	4.72	0.08	1.45	79.05	13.87	0.32	0.27	0.24	0.1789	0.2351

Таблица 18.

Экстракция масла, используя устройство Soxhlet, и профиль жирных кислот масла

№ экстракции	Сухой вес семян (г)	Вес муки (г)	Извлеченное масло (г)	Масличность (%)	Жирнокислотный состав (вес%)								
					16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0
Экстракция-1	223.00	219.89	68.14	30.99	2.7	0.1	1.3	92.7	2.6	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-2	233.24	232.71	64.68	27.79	2.8	0.1	1.4	91.9	3.0	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-3	240.07	238.72	72.37	30.32	3.1	0.1	1.5	91.9	2.8	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-4	231.59	229.96	66.69	29.00	3.0	0.1	1.5	91.4	3.6	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-5	220.22	219.54	62.64	28.53	2.9	0.1	1.3	92.1	3.0	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-6	288.97	288.20	77.75	26.98	2.7	0.1	1.5	92.3	2.8	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-7	241.10	239.73	71.96	30.02	2.9	0.1	1.4	91.9	3.2	0.0	0.3	0.2	0.1
Экстракция-8	243.68	242.90	67.04	27.60	2.9	0.1	1.6	91.4	3.4	0.0	0.3	0.3	0.1
Экстракция-9	321.26	320.76	92.15	28.73	3.3	0.1	1.6	89.6	4.8	0.0	0.3	0.3	0.1
Смеси													
Ext-2/3/5/6					2.9	0.1	1.4	92.0	2.9	0.0	0.3	0.3	0.2
Ext-4/7/8					2.9	0.1	1.5	91.3	3.4	0.0	0.3	0.3	0.2

Конструирование pCW701-pCW710

Промоторы сафлорового происхождения, которые, как полагают, обладают оптимальной активностью в семенах сафлора, выделяют, используя технологии секвенирования ДНК, которые дают точную информацию о последовательностях районов ДНК 5' и 3' от экспрессируемого гена. Предшествующие результаты, описанные в примерах 2-6, свидетельствовали о том, что ген CtFAD2-1 экспрессируется на высоком уровне во время развития семян в сафлоре. Поэтому промоторный район этого гена является отличным кандидатом на управление эффективной экспрессии трансгенов в семенах сафлора. Как продемонстрировано в примере 6, CtFAD2-2 был активным на генетических фонах, когда CtFAD2-1 был инактивирован в результате мутации. По этой причине промотор CtFAD2-2 используется в сафлоре для управления экспрессией шпилечных РНК, мишенью которых является активность CtFAD2-2, среди других генов. Другие элементы промоторов, применимые для экспрессии трансгенов в семенах сафлора, включают эндогенные (т.е. сафлоровые) элементы промоторов в 5' частях генов для олеозина (CtOleosin) и запасаемых в семенах белков, таких как белки 2S и 11S (Ct2S и Ct11S). Элементы промоторов CtFAD2-1, CtOleosin, Ct2S и Ct11S выделяют, используя стандартные методы на основе ПЦР, основанные на геномных последовательностях сафлора, и включают в бинарные экспрессионные векторы для растений. Эти элементы промоторов используются для экспрессии вызывающих генный сайленсинг молекул шРНК в конструкциях pCW701-pCW710 или в сочетании с другими несафлоровыми промоторами, экспрессирующими те же или отличные гены для шРНК, такие как в pCW602, pCW603, pCW631 или pCW632. Комбинации генов для шРНК с различными промоторами также получают посредством скрещивания трансформированных отдельными генами растений, типично когда гены для шРНК являются несцепленными.

Для выделения промотора CtFAD2-1 фрагмент геномной ДНК размером приблизительно 3000 п.о., расположенный 5' от иницирующего трансляцию CtFAD2-1 кодона ATG, выделяют, используя методы на основе ПЦР, и используют для замены промотора AtOleosin из pCW603 и pCW602, таким образом создавая

конструкции pCW701 и pCW702, соответственно.

Для выделения промотора CtFAD2-2 фрагмент геномной ДНК размером приблизительно 3000 п.о., расположенный 5' от иницирующего трансляцию CtFAD2-2 кодона ATG, выделяют, используя методы на основе ПЦР, и используют для замены промотора AtOleosin из pCW603 и pCW602, таким образом создавая конструкции pCW703 и pCW704, соответственно.

Для выделения промотора CtOleosin-1 фрагмент геномной ДНК размером приблизительно 1500 пар оснований, расположенный 5' от иницирующего трансляцию CtOleosin кодона ATG, выделяют, используя методы на основе ПЦР, и используют для замены промотора AtOleosin из pCW603 и pCW602, таким образом создавая конструкции pCW705 и pCW706, соответственно.

Для выделения промотора Ct2S фрагмент геномной ДНК размером приблизительно 1500 пар оснований, расположенный 5' от иницирующего трансляцию Ct2S кодона ATG, выделяют и используют для замены промотора AtOleosin из pCW603 и pCW602, таким образом создавая векторы pCW707 и pCW708, соответственно.

Для выделения промотора Ct11S фрагмент геномной ДНК размером приблизительно 1500 пар оснований, расположенный 5' от иницирующего трансляцию Ct11S кодона ATG, выделяют из геномной ДНК сафлора, используя методы на основе ПЦР, и используют для замены промотора AtOleosin из pCW603 и pCW602, таким образом создавая векторы pCW709 и pCW710, соответственно.

Каждый из этих векторов используют для трансформации сортов сафлора, как описано в примере 1.

Примеры 14. Характеристики сортов сафлора, полученные в полевых условиях

Ряд нетрансформированных сортов и новых поступлений сафлора выращивали летом 2011-2012 года на полевой опытной станции наблюдения в Narrabri, New South Wales. Семена засевали на полевые участки размером 5 м × 3 м в почву из тяжелой глины, обычно встречающуюся в районе Narrabri. Растения подвергались естественному освещению и атмосферным осадкам, за исключением того, что их поливали один раз после 4 недель роста. Зрелые

семена собирали, и образцы из приблизительно 50 семян анализировали в отношении содержания липида и жирнокислотного состава масла из семени. Содержания олеиновой кислоты в масле из семян различных сортов и новых поступлений представлены в таблице 19 и на фиг. 13.

Данные полевого испытания указывали на то, что существует диапазон содержаний олеиновой кислоты в семени сафлора, неожиданный по протяженности наблюдаемого диапазона. Что особенно важно, различные новые поступления, описанные как «с высоким содержанием олеиновой кислоты» и, как сообщалось ранее, дающие масло из семени с по крайней мере 70% олеиновой кислоты, такие как Ciano-OL, продуцировали только приблизительно 42-46% олеиновой кислоты. Уровни линолевой кислоты были намного выше, чем ожидалось на основе предшествующих сообщений. Напротив, другие новые поступления, такие как PI-5601698 и PI-560169, которые, как сообщалось, дают высокие содержания олеиновой кислоты, действительно продуцировали высокие уровни олеиновой кислоты (60-76%) в маслах из семян в полевых условиях. Полагали, что причина значительно более низких уровней олеиновой кислоты, чем ожидалось, в некоторых новых поступлениях связана с присутствием аллелей CtFAD2-1, а не аллеля ol, такого как, например, аллель oil, который является чувствительным к температуре, и с условиями выращивания, которые были неидеальными в сезоне 2011-12. Дополнительные анализы жирных кислот на семени, полученном от выращенного в поле сафлора, будут проведены для подтверждения вариации, отмеченной в содержании олеиновой кислоты в некоторых новых поступлениях.

Таблица 19.

Жирнокислотный состав липида сортов сафлора, выращенных в поле.

ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
PI 613463	5.3	< 0.1	5.5	9.1	78.8	0.1	0.6	0.2
PI 537677	6.3	0.2	2.3	10.3	79.9	0.1	0.3	0.2
PI 537645	7.8	0.2	2.2	10.5	78.0	0.1	0.4	0.2
PI 572433	6.4	0.1	2.5	10.7	78.7	0.2	0.4	0.2
PI 572472	6.3	0.2	2.4	11.1	78.7	0.2	0.4	0.2
RC 1002 L	6.8	0.2	2.7	11.5	77.3	0.2	0.4	0.2
PI 537701	6.7	0.2	2.3	11.6	77.8	0.2	0.4	0.2
CC1485-3-1-1-1-1	7.8	0.2	2.2	11.6	76.9	0.2	0.4	0.2
PI 560163	7.0	0.2	1.9	11.7	77.8	0.1	0.4	0.2
PI 451958	7.1	0.2	2.7	11.8	77.1	< 0.1	0.4	0.2
PI 306609	6.6	0.2	2.5	12.0	77.3	0.2	0.4	0.2
PI 451950	6.6	0.1	2.2	12.4	77.5	0.1	0.4	0.2
PI 537705	6.6	0.2	2.6	13.1	76.3	0.2	0.4	0.2
PI 413718	7.1	0.2	2.9	13.4	74.9	0.2	0.6	0.2
PI 560161	7.1	0.2	2.1	14.4	75.0	0.1	0.4	0.2
PI 560180	6.5	0.2	2.0	18.3	71.5	0.3	0.4	0.2
PI 401477	5.8	0.2	2.3	36.8	53.2	0.2	0.5	0.2
PI 537712	6.5	0.2	2.5	40.5	48.5	0.2	0.5	0.2
PI 537695	6.0	0.2	2.3	41.9	47.9	0.2	0.5	0.3
CIANO-OL	6.9	0.3	1.9	42.9	46.5	0.2	0.5	0.3
PI 538779	6.6	0.2	2.1	43.2	46.2	0.2	0.4	0.3
Sinonaria	6.0	0.2	2.1	43.5	46.6	0.2	0.4	0.2
PI 401479	5.9	0.2	2.1	48.2	41.7	0.3	0.5	0.4
PI 560166	5.7	0.2	2.3	55.0	35.0	0.1	0.5	0.3
PI 401474	5.5	0.3	1.9	59.3	30.6	0.4	0.6	0.6
PI 560177	5.1	0.2	1.9	60.7	30.3	0.2	0.4	0.3
PI 603207	5.6	0.2	2.0	65.2	25.0	0.2	0.5	0.3
PI 560167	5.8	0.2	1.6	65.9	24.8	0.2	0.4	0.3
PI 560174	5.9	0.3	1.8	67.6	22.6	0.3	0.5	0.3
PI 603208	5.4	0.2	2.3	68.3	21.7	0.2	0.6	0.3
PI 538025	5.3	0.2	2.3	68.5	21.6	0.3	0.4	0.3
PI 560168	5.9	0.2	1.8	68.5	21.8	0.3	0.5	0.3
PI 560169	5.6	0.2	1.9	71.8	18.6	0.2	0.5	0.3
PI 577808	5.3	0.2	2.0	75.0	15.5	0.3	0.5	0.3
PI 612967	5.4	0.2	1.8	76.3	14.5	0.2	0.4	0.3

Этот эксперимент также показал, что уровень олеиновой кислоты в масле из семени, полученном от растений, выращенных в поле, типично на приблизительно 5-10% ниже, чем из растений, выращенных в теплице, даже в случае новых поступлений с наилучшими характеристиками в поле. Полагали, что причиной этого является то, что условия выращивания в поле были менее идеальными, чем в теплице.

В дальнейшем эксперименте растения сафлора сорта S317 выращивали или в поле, или в теплице для сравнения жирнокислотного состава масла из семени. Даже если полевые

условия были более благоприятными в сезон выращивания, чем в сезон 2011-12, вес 20 семян от растений, выращенных в поле, составлял 0,977 г по сравнению с 1,202 г от растений, выращенных в теплице. От восемнадцати до 20 семян из каждой группы были проанализированы в отношении жирнокислотного состава с использованием анализа с помощью GC. Уровень олеиновой кислоты в семенах растений, выращенных в поле, находился в диапазоне от 74,83 до 80,65, при этом среднее значение (+/- среднееквадратическое отклонение) составляло 78,52 +/-1,53, по сравнению с диапазоном для семян растений, выращенных в теплице, составляющим 75,15-78,44, при этом среднее значение составляло 76,33+/-1.00. Другие жирные кислоты присутствовали на уровне, указанном в таблице 20.

Таблица 20.

Жирнокислотный состав масла из семени S317, выращенного или в поле, или в теплице.

Образец	16:0	16:1 $\Delta 9z$	18:0	18:1 $\Delta 9z$	18:1 $\Delta 11z$	18:2 $\Delta 9z$ $\Delta 12z$	18:3 $\Delta 9z$ $\Delta 12z$ $\Delta 15z$	20:0	20:1 $\Delta 11z$	22:0
Выращенный в поле										
Среднее значение	4.90	0.00	2.40	78.52	0.75	12.5	0.00	0.47	0.20	0.21
Среднеквадратическое отклонение	0.24	0.00	0.31	1.53	0.28	1.66	0.00	0.05	0.13	0.13
Выращенный в теплице										
Среднее значение	4.80	0.04	2.72	76.33	0.72	14.2	0.00	0.46	0.23	0.25
Среднеквадратическое отклонение	0.1	0.04	0.3	1.00	0.17	1.06	0.00	0.12	0.06	0.06

Пример 15. Переход трансенов в другие сорта сафлора

Сорта сафлора вручную скрещивают, используя общепринятые способы, например, описанные в Mundel and Bergman (2009). Отбирают самые лучшие из трансформированных линий, содержащих конструкции, описанные выше, в частности, трансформированные линии, содержащие только одну вставку Т-ДНК, и их скрещивают с растениями других сортов сафлора, нетрансформированных или уже трансформированных отличной конструкцией, которые обладают оптимальными агрономическими характеристиками. Используя многократные циклы возвратного скрещивания с возвратным

родителем, например, в течение 4 или 5 возвратных скрещиваний, и затем самоопыление, получают растения, которые являются гомозиготными по желаемой конструкции(ям) на генетическом фоне для оптимальных агрономических характеристик. Отбор с помощью маркера, такого как, например, использование идеального маркера для аллеля *ol*, описанного в примере 7, может использоваться в процессе скрещивания.

Пример 16. Модификация состава масла из семени с помощью опосредованного искусственными микроРНК генного сайленсинга

МикроРНК являются классом регуляторных коротких РНК (кРНК) длиной 20–24 нуклеотида, эндогенных по отношению к растениям и животным, которые регулируют активность эндогенных генов. Трансгенная экспрессия модифицированных РНК-предшественников микроРНК (искусственных предшественников микроРНК) представляет собой недавно разработанную, основанную на РНК и специфическую в отношении последовательности стратегию сайленсинга эндогенных генов. Было установлено, что замена нескольких нуклеотидов в последовательности предшественника микроРНК для создания искусственного предшественника микроРНК не влияет на биогенез микроРНК при условии, если остаются незатронутыми положения соответствий и несоответствий в структуре «петля-на-ножке» предшественника.

CSIRO пакет программ MatchPoint (www.pi.csiro.au/RNAi) (Horn and Waterhouse, 2010) использовали для идентификации специфических 21-нуклеотидных последовательностей в генах *FAD2*, *FATB* и *FAE1* *Arabidopsis*, которые были уникальными в геноме *Arabidopsis* и поэтому с меньшей долей вероятности вызывают сайленсинг не являющихся мишенями генов (воздействие вне гена) при экспрессии в виде искусственных микроРНК. Уникальная 21-нуклеотидная последовательность была отобрана для каждого из 3 генов, при этом 21-нуклеотидная последовательность в каждом случае была полностью комплементарна (антисмысловой) району транскрипта с соответствующего гена. Для каждого была разработана искусственная молекула предшественника микроРНК, на основе последовательности предшественника *ara-miR159b* *A. thaliana*. В каждом случае последовательность предшественника

miR159b была модифицирована в ее ножке для размещения антисмысловой 21-нуклеотидной последовательности. Были созданы три конструкции, каждая из которых кодирует одну из РНК-предшественников, каждая под контролем специфического для семени промотора FP1, и их клонировали в бинарный экспрессионный вектор для создания конструкций, названных pJP1106, pJP1109 и pJP1110.

Три конструкции использовали по отдельности для трансформации штамма AGL1 *A. tumefaciens* с помощью электропорации, и трансформированные линии использовали для введения генетической конструкции в *A. thaliana* (экотип Columbia) с использованием метода погружения цветков (пример 1). Семена (семена T₁) от обработанных растений высевали на чашки со средой MS, дополненной 3,5 мг/л PPT для отбора трансформированных проростков, которые переносили в почву для укоренения подтвержденных трансгенных растений T₁. Предполагалось, что большинство этих растений T₁ будут гетерозиготными по введенной генетической конструкции. Семена T₂ от трансгенных растений собирали при достижении зрелости и анализировали в отношении их жирнокислотного состава. Эти растения T₂ включали линии, которые были гомозиготными по генетической конструкции, а также линии, которые были гетерозиготными. Гомозиготные растения T₂ самоопылялись для получения семени T₃, и растения-потомки T₃, полученные из этих семян, в свою очередь использовались для получения растений-потомков T₄. Поэтому это позволило проанализировать устойчивость генного сайленсинга на протяжении трех поколений растений-потомков.

Профили жирных кислот в масле из семени, полученном из партий семян T₂, T₃ и T₄, анализировали с помощью GC, как описано в примере 1. Изменения активности Δ 12-десатуразы, вызванные действием трансгена на основе FAD2, отмечались в виде увеличения количества олеиновой кислоты в профилях для масел из семян. Связанный метод оценки кумулятивных эффектов активности Δ 12-десатуразы во время синтеза жирных кислот в семени

осуществляли посредством расчета показателя доли десатурации олеиновой кислоты (ODP) для каждого масла из семени, полученного, используя следующую формулу: $ODP = \%18:2 + \%18:3 / \%18:1 + \%18:2 + \%18:3$. Масло из семени *Arabidopsis* дикого типа типично имело величину ODP, составляющую приблизительно 0,70–0,79, что означает, что 70–79% 18:1, образованной во время синтеза жирных кислоты в семени, были впоследствии превращены в полиненасыщенные C18 жирные кислоты, прежде всего под действием $\Delta 12$ -десатуразы с образованием 18:2, а затем в результате дальнейшей десатурации до 18:3. Следовательно, показатель ODP применялся для определения степени сайленсинга гена FAD2 на уровне активности эндогенной $\Delta 12$ -десатуразы.

Уровни C18:1^{Δ9} (олеиновой кислоты) в семени T₂, трансформированным конструкцией rJP1106 (мишенью которой является FAD2), находились в пределах от 32,9% до 62,7% в 30 трансгенных случаях по сравнению со средним уровнем C18:1 дикого типа, составляющим 14,0%±0,2. Подвергнутая сайленсингу в высокой степени линия (растение ID-30), которая имела одну вставку трансгена, характеризующаяся коэффициентами сегрегации (3:1) селектируемого маркера растений (PPT), была переведена в следующее поколение (T₃). Так же в семени T₃ отмечались высокие уровни 18:1^{Δ9}, находящиеся в пределах от 46,0% до 63,8%, при этом среднее значение составляло 57,3±5,0%. В следующем поколении семья T₄ также продемонстрировало схоже высокие уровни 18:1^{Δ9}, находящиеся в пределах от 61% до 65,8%, этом среднее значение составляло 63,3±1,06%. Общее содержание PUFA (18:2+18:3) в масле из трансгенного семени T₂ находилось в пределах от 6,1% до 38%, но в масле из семени гомозиготной линии ID-30 общее содержание PUFA было дополнительно уменьшено и находилось в пределах от 4,3 до 5,7%. Масло из семени контрольного *Arabidopsis* экотипа Columbia имело значение ODP, находящееся в пределах 0,75–0,79, что означает, что более 75% олеиновой кислоты, образованной в развивающемся семени, было впоследствии превращено в 18:2 или 18:3. Напротив, масло из

семени мутанта *fad2-1* *Arabidopsis* имело значение ODP, составляющее 0,17, что означает уменьшение на приблизительно 75% Δ^{12} -десатурации вследствие мутации *fad2-1*. Значение ODP находилось в пределах от 0,08 до 0,48 в масле из трансгенного семени T₂, 0,07-0,32 в масле из семени T₃ и 0,06-0,08 в масле из семени T₄, в отличие от значения=0,75 в масле из контрольного семени *Arabidopsis*. Существенное уменьшение значений ODP в трансгенных линиях ясно указывало на эффективный сайленсинг эндогенного гена *FAD2*, используя подход с использованием искусственных микроРНК. Этот эксперимент также свидетельствовал об устойчивости генного сайленсинга на протяжении трех поколений. Схожие степени генного сайленсинга также отмечались в случае двух других конструкций для уменьшений экспрессии соответствующих им генов.

Степень сайленсинга гена *FAD2* и количество 18:1^{A9} (63,3 ± 1,06%), отмечаемые в этом исследовании, используя искусственную микроРНК, была выше, чем в хорошо охарактеризованном мутанте *FAD2-2* (59,4%), линии с сайленсингом *FAD2*, используя подход с использованием шпилечной РНК (56,9±3,6%) и шпилечный-антисмысловой подход (61,7±2,0%). Среднее содержание 18:2+18:3% в масле из семени с сайленсингом *FAD2*, используя микроРНК, составляло 4,8±0,37%, что ниже, чем в мутанте *FAD2-2*, о котором сообщалось ранее, (7,5±1,1%) и линии с сайленсингом *FAD2*, используя шпилечный-антисмысловой подход (7,2±1,4%). Следовательно, эти данные свидетельствовали о преимуществе искусственных микроРНК по степени сайленсинга, а также об устойчивости сайленсинга на протяжении поколений потомков.

Пример 17. Анализ содержания и состава стеролов в маслах

Фитостеролы из 12 образцов растительных масел, приобретенных из коммерческих источников в Австралии, были охарактеризованы с использованием анализа с помощью GC и GC-MS как производные О-триметилсилилилового эфира (OTMSi-эфира), как описано в примере 1. Стероиды были идентифицированы в соответствии с данными о времени удержания, в результате интерпретации масс-спектров и сравнения с литературными и

лабораторными данными, касающимися стандартных масс-спектров. Количество стеролов определяли, используя внутренний стандарт 5β (Н)-холан-24-ол. Базовая структура фитостерола и химические структуры некоторых из идентифицированных стеролов представлены на фиг. 14 и в таблице 21.

Таблица 21.

IUPAC/систематические названия идентифицированных стеролов.

№ стерола	Обычное название (я)	Систематическое название
1	холестерин	холест-5-ен-3 β -ол
2	брассикастерин	24-метилхолеста-5, 22 (E) -диен-3 β -ол
3	халинастерол/24-метилхолестерин	24-метилхолеста-5, 24 (28) E-диен-3 β -ол
4	кампестерол/24-метилхолестерин	24-метилхолест-5-ен-3 β -ол
5	кампестанол/24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3 β -ол
7	Δ 5-стигмастерол	24-этилхолеста-5, 22E-диен-3 β -ол
9	эргост-7-ен-3 β -ол	24-метилхолест-7-ен-3 β -ол
11	эбурикол	4, 4, 14-триметилэргоста-8, 24 (28) -диен-3 β -ол
12	β -ситостерол/24-этилхолестерин	24-этилхолест-5-ен-3 β -ол
13	Δ 5-авенастерол/изофукостерол	24-этилхолеста-5, 24 (28) Z-диен-3 β -ол
19	Δ 7-стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 β -ол	24-этилхолест-7-ен-3 β -ол
20	Δ 7-авенастерол	24-этилхолеста-7, 24 (28) -диен-3 β -ол

Проанализированные растительные масла были из: кунжута (*Sesamum indicum*), маслины европейской (*Olea europaea*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), клещевины обыкновенной (*Ricinus communis*), канола (*Brassica napus*), сафлора (*Carthamus tinctorius*), арахиса (*Arachis hypogaea*), льна (*Linum usitatissimum*) и сои (*Glycine max*). В уменьшающемся относительном содержании, для всех образцов масел, основными фитостеролами были: β -ситостерол (диапазон 28-55% от общего содержания стеролов), Δ^5 -авенастерол (изофукостерол) (3-24%), кампестерол (2-33%), Δ^5 -стигмастерол (0,7-18%), Δ^7 -стигмастерол (1-18%) и Δ^7 -авенастерол (0,1-5%). Было идентифицировано несколько других, менее значительных по размеру стеролов, ими были холестерин, брассикастерин, халинастерол, кампестанол и эбурикол. Были также детектированы четыре C29:2 и два C30:2 стерола, но необходимо дальнейшее исследование для полной идентификации этих менее значительных по размеру стеролов. Кроме того, несколько других не идентифицированных стеролов присутствовали в некоторых их масел, но вследствие их очень низкого относительного содержания, масс-спектры не были в достаточной степени интенсивными, чтобы сделать возможной идентификацию их структур.

Содержания стеролов, представленные в виде мг/г масла, в уменьшающемся количестве составляли: каноловое масло (6,8 мг/г), кунжутное масло (5,8 мг/г), льняное масло (4,8-5,2 мг/г), подсолнечное масло (3,7-4,1 мг/г), арахисовое масло (3,2 мг/г), сафлоровое масло (3,0 мг/г), соевое масло (3,0 мг/г), оливковое масло (2,4 мг/г), касторовое масло (1,9 мг/г). Составы стеролов в % и общее содержание стеролов представлены в таблице 22.

Во всех образцах масла из семян основным фитостеролом был, как правило, β -ситостерол (диапазон 30-57% от общего содержания стеролов). Среди масел отмечалось колебание в широком диапазоне относительных содержаний других основных стеролов: кампестерола (2-17%), Δ^5 -стигмастерола (0,7-18%), Δ^5 -авенастерола (4-23%), Δ^7 -стигмастерола (1-18%). Масла из различных видов имели

различные профили стеролов, при этом некоторые имели довольно характерные профили. Каноловое масло имело наибольшее относительное содержание кампестерола (33,6%), в то время как образцы других видов, как правило, имели более низкие уровни, например, вплоть до 17% в арахисовом масле. Сафлоровое масло имело относительно высокую долю Δ^7 -стигмастерола (18%), в то время как содержание этого стерола было обычно низким в маслах других видов, вплоть до 9% в подсолнечном масле. Поскольку они были характерными для каждого вида, профили стеролов можно, по этой причине, использовать для содействия в идентификации конкретных растительных масел или проверки их подлинности или подмешивания в другие масла.

Были сравнены два образца, каждый из них из подсолнечника и сафлора, в каждом случае один был получен с помощью холодного отжима из семян и был нерафинированным, в то время как другой не был подвергнут холодному отжиму и был рафинированным. Хотя отмечались некоторые различия, два источника масел имели схожий состав стеролов и общее содержание стеролов, что говорит о том, что обработка и рафинирование оказывали незначительный эффект на эти два показателя. Содержание стеролов в образцах отличалось в три раза и находилось в пределах от 1,9 мг/г до 6,8 мг/г. Каноловое масло имело наибольшее содержание стеролов, а касторовое масло – наименьшее содержание стеролов.

Таблица 22.

Содержание и состав стеролов в проанализированных растительных маслах.

Номер стерола	Обычное название стерола	Кунжутное	Оливковое	Подсол- нечное	Подсолнечное, холодного отжима	Касто- ровое	Кано- ловое	Сафлор- овое	Сафлоровое, холодного отжима	Арахисо- вое	Льняное (из льняного семени)	Льняное (из льняного семени)	Соевое
1	холестерин	0.2	0.8	0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.2
2	брасикастерин	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
3	халинастерол/ 24-метилхлестерин	1.5	0.1	0.3	0.1	1.1	2.4	0.2	0.1	0.9	1.5	1.4	0.8
4	кампестерол/ 24-метилхлестерин	16.2	2.4	7.4	7.9	8.4	33.6	12.1	8.5	17.4	15.7	14.4	16.9
5	кампестанол/ 24-метилхлестанол	0.7	0.3	0.3	0.1	0.9	0.2	0.8	0.8	0.3	0.2	0.2	0.7
6	C29:2*	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.5	0.5	0.0	1.2	1.3	0.1
7	Δ^5 -стигмастерол	6.4	1.2	7.4	7.2	18.6	0.7	7.0	4.6	6.9	5.1	5.8	17.6
8	неизвестно	0.5	1.3	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	1.3	0.4	0.7	0.6	1.3
9	эргост-7-ен-3 β -ол	0.1	0.1	1.9	1.8	0.2	0.4	2.7	4.0	1.4	1.4	1.4	1.0
10	неизвестно	0.0	1.3	0.9	0.8	1.2	0.9	1.8	0.7	1.2	0.7	0.5	0.7
11	эбурикол	1.6	1.8	4.1	4.4	1.5	1.0	1.9	2.9	1.2	3.5	3.3	0.9
12	β -ситостерол/ 24-этилхлестерин	55.3	45.6	43.9	43.6	37.7	50.8	40.2	35.1	57.2	29.9	28.4	40.2
13	Δ^5 -авенастерол/ изофукостерол	8.6	16.9	7.2	4.1	19.3	4.4	7.3	6.3	5.3	23.0	24.2	3.3
14	спирт	0.0	2.4	0.9	1.1	0.0	0.0	1.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.9
15	тритерпеновый спирт	0.0	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	2.8	1.8	0.0	0.0	0.3	0.0
16	C29:2*	0.0	0.5	0.7	0.7	1.5	1.2	2.8	1.9	2.0	1.0	0.7	0.5
19	Δ^7 -стигмастерол/ стигмаст-7-ен-3 β -ол	2.2	7.1	9.3	10.9	2.3	0.9	10.5	18.3	1.1	7.9	8.7	5.6
20	Δ^7 -авенастерол	1.3	0.1	4.0	3.6	0.6	0.2	2.0	4.7	0.7	0.4	0.4	0.6
21	неизвестно	0.7	7.1	0.9	0.8	0.0	0.4	0.3	0.4	0.0	3.0	3.6	0.0
22	неизвестно	0.3	0.0	0.3	0.9	0.0	0.0	1.2	1.3	0.2	0.1	0.0	0.3
23	неизвестно	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.5
24	неизвестно	0.0	3.1	0.9	1.3	0.6	0.4	0.2	0.4	0.7	1.7	1.9	0.8
25	неизвестно	0.9	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.5	0.7	0.3	0.1	0.1	0.6
26	C30:2	2.2	6.0	4.6	5.7	1.4	0.6	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	5.2
27	неизвестно	0.0	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.3
Сумма		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Все стеролы (мг/ масла)		5.8	2.4	4.1	3.7	1.9	6.8	3.2	3.0	3.2	4.8	5.2	3.0

C29:2* и C30:2* означает C29 стерол с двумя двойными связями и C30 стерол с двумя двойными связями, соответственно.

Был проведен отдельный анализ масел сафлора из контрольного семени тепличного происхождения (S серия), генетически модифицированного семени с высоким содержанием олеиновой кислоты (Т серия) и двух коммерческих сафлоровых масел. Было отмечено несколько особенностей (таблица 23). Во-первых, существовала высокая степень схожести профиля стеролов между контрольными и модифицированными семенами, и, во-вторых, коммерческие сафлоровые масла относятся к отдельной группе и

поэтому, как было установлено, имеют значительно отличный профиль фитостеролов. Дальнейшее исследование профилей стеролов также свидетельствовало о схожести профилей фитостеролов из образцов контрольных и модифицированных семян сафлора.

Квалифицированным в данной области техники специалистам будет понятно, что многочисленные вариации и/или модификации могут быть внесены в настоящее изобретения, продемонстрированное в конкретных вариантах осуществления, без отступа от сущности или объема настоящего изобретения в широком определении. Поэтому варианты осуществления настоящего изобретения должны рассматриваться во всех аспектах как иллюстративные и не ограничивающие.

Настоящая заявка притязает на приоритет заявки на патент США с № 61/638447, поданной 25 апреля 2012, и заявки AU 2012903992, поданной 11 сентября 2012, обе из которых включены сюда посредством ссылки.

Все публикации, которые здесь обсуждаются и/или на которые здесь ссылаются, включены сюда в их полном объеме.

Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое было включено в описание настоящей заявки, служит исключительно цели обеспечения контекста для настоящего изобретения. Не следует принимать как допущение, что какие-либо или все из этих материалов образуют часть основы известного уровня техники или были известными общими знаниями в области техники, относящейся к настоящему изобретению, поскольку они существовали до даты приоритета каждого пункта формулы этой заявки.

Таблица 23.

Состав стеролов (% от всех стеролов) и содержание стеролов (мг/г) в образцах масла из семян сафлора.

№ стерола	Обычное название(я)	Систематическое название	P2589 S317 (1)	P2590 S317 (2)	P2591 TS603.9.2 T1	P2592 TS603.9.4 T1	P2593 TS603.9.5 T1
1	холестерин	холест-5-ен-3 β -ол	0.5	0.6	0.5	3.0	1.1
2	брасикастерин	24-метилхолеста-5,22(E)-диен-3 β -ол	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
3	халинастерол/24-метилхолестерин	24-метилхолеста-5,24(28)E-диен-3 β -ол	0.8	0.8	1.1	1.1	1.2
4	кампестерол/24-метилхолестерин	24-метилхолест-5-ен-3 β -ол	10.5	11.6	11.0	11.8	11.8
5	кампестанол/24-метилхолестанол	24-метилхолестан-3 β -ол	0.0	0.1	0.2	0.0	0.3
6	C29:2**		0.9	0.8	0.2	7.2	0.4
7	Δ 5-стигмастерол	24-этилхолеста-5,22E-диен-3 β -ол	0.7	0.9	0.8	0.8	0.6
8	неизвестно***		1.8	2.1	2.3	2.1	2.0
9	эргост-7-ен-3 β -ол	24-метилхолест-7-ен-3 β -ол	2.8	3.3	2.6	2.3	2.6
10	неизвестно***		1.5	1.6	1.3	1.8	1.4
11	эбурикол	4,4,14-триметилэргоста-8,24(28)-диен-3 β -ол	1.7	2.2	5.0	2.8	2.6
12	β -ситостерол/24-этилхолестерин	24-этилхолест-5-ен-3 β -ол	35.9	37.0	35.7	36.2	37.5
13	Δ 5-авенастерол/изофукостерол	24-этилхолеста-5,24(28)Z-диен-3 β -ол	10.4	8.2	10.0	7.9	9.3
14	тритерпеновый спирт		1.6	1.9	1.4	1.2	1.4
15	тритерпеновый спирт		1.8	2.2	1.3	0.9	1.6
16	C29:2**		4.4	0.6	3.1	2.8	2.1
17	C29:2**		2.2	2.2	2.1	2.1	1.7
18	C30:2**		1.9	0.8	1.8	1.9	2.1
19	Δ 7-стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 β -ол	24-этилхолест-7-ен-3 β -ол	11.4	13.6	10.3	8.9	10.7
20	Δ 7-авенастерол****	24-этилхолеста-7,24(28)Z-диен-3 β -ол	6.1	5.7	5.3	3.4	4.9
21	неизвестно***		0.2	0.4	0.2	0.5	0.4
22	неизвестно***		0.9	1.0	1.1	1.1	0.9
23	неизвестно***		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24	неизвестно***		0.2	0.6	0.9	1.5	0.9
25	неизвестно***		0.9	0.6	0.3	1.0	0.5
26	C30:2		0.9	1.0	0.5	2.9	1.4
27	неизвестно***		0.0	0.1	0.8	2.2	0.4
Сумма			100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Все стеролы (мг/г масла)			1.9	2.2	2.0	2.0	1.8

*Номера стеролов относятся к GC записям. ** C29:2 и C30:2 означает C29 стерол с двумя двойными связями и C30 стерол с двумя двойными связями, соответственно.
 *** unk означает неизвестно. **** предварительная идентификация.
 Образцы S317 представляют собой немодифицированные родительские контроли, а образцы TS являются образцами масла модифицированного сафлора с высоким содержанием олеиновой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abdullah et al. (1986) Biotech. 4:1087.
- Almeida and Allshire (2005) TRENDS Cell Biol 15: 251-258.
- Alonso et al. (2010) Green Chem. 12:1493-1513.
- Ascherio and Willett (1997) Am. J. Clin. Nutr. 66:1006S-1010S.
- Bartholomew (1971) Temperature effects on the fatty acid composition of developing seeds in safflower, *Carthamus tinctorius* L.
- Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
- Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.
- Beclin et al. (2002) Current Biology 12:684-688.
- Belide et al. (2011) Plant Methods 7:12.
- Bergman et al. (2006) Crop Sci. 46:1818-1819.
- Blacklock et al. (2010) J Biol Chem 285: 28442-28449.
- Bligh and Dyer (1959) Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37:911-7.
- Bonanome and Grundy (1988). N. Engl. Med. 318: 1244-1248.
- Brodersen and Voinnet (2006) Trends Genet. 22:268-280.
- Broothaerts et al. (2005) Nature 433:629-633.
- Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.
- Broun et al. (1999) Annu. Rev. Nutr. 19: 197-216.
- Browse et al. (1989) Plant Physiol. 90:522-529.
- Cahoon et al. (2003) Plant J. 34:671-683.
- Chapman and Burke (2007) Evolution 61:1773-1780.
- Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.
- Chung et al. (2006) BMC Genomics 7:120.
- Clough and Bent (1998) Plant J. 16:735-743.
- Comai et al. (2004) Plant J 37: 778-786.
- Coutu et al. (2007) Transgenic Research 16:771-781.
- Covello and Reed (1996) Plant Physiol. 111:223-226.
- Dauk et al. (2007) Plant Science 173:43-49.
- Dickey et al. (1994) Plant Cell 6:1171-1176.
- Dougherty et al. (1995). Am. J. Clin. Nutr. 61:1120-1128.
- Durrett et al. (2008) Plant J. 54:593-607.
- Dyer et al. (2002) Plant Physiology 130:2027-2038.

- Ellerstrom et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1019-1027.
- Endalew et al. (2011) *Biomass and Bioenergy* 35:3787-3809.
- Falcone et al. (1994) *Plant Physiol.* 106:1453-1459.
- Fernandez San Juan (1995). *Alimentaria* 33: 93-98.
- Fernandez-Martinez et al. (1993) *Euphytica* 69: 115-122.
- Fofana et al. (2004) *Plant Science* 166:1487-1496.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Lett.* 2:74.
- Gamez et al. (2003) *Food Res International* 36: 721-727.
- Glewin et al. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
- Gong and Jiang (2011) *Biotechnol. Lett.* 33:1269-1284.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Greenwell et al. (2011) *J. R. Soc. Interface* 7:703-726.
- Gunstone (2001) *Inform* 11: 1287-1289.
- Hafner et al. (2008) *Methods* 44:3-12.
- Hamdan et al. (2009) *Euphytica* 168: 61-69.
- Henikoff et al. (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Heppard et al. (1996) *Plant Physiology* 110:311-319.
- Hernandez et al. (2005) *Phytochemistry* 66:1417-1426.
- Hill and Knowles (1968) *Crop Sci.* 8:275-277.
- Hinchee et al. (1988) *Biotechnology* 6:915-922.
- Hu et al. (1997). *N. Engl. J. Med.* 337: 1491-1499.
- Hugly and Somerville (1992) *Plant Physiol.* 99:197-202.
- Isshiki et al. (2001) *Plant Physiol.* 125:1388-1395.
- Jofuku et al. (1989) *Plant Cell* 1:427-435.
- Kang et al. (2011) *Plant Physiology and Biochemistry* 49:223-229.
- Karmakar et al. (2010) *Bioresource Technology* 101:7201-7210.
- Khadake et al. (2009) *Mol Biotechnol.* 42: 168-174.
- Kim et al. (2006) *Molecular Genetics and Genomics* 276:351-368.
- Knothe (2005) *Fuel Process. Technol.* 86:1059-1070.
- Knothe and Steidley (2005) *Fuel* 84:1059-1065
- Knowles (1968) *Economic Botany* 22: 195-200.
- Knowles (1969) *Economic Botany* 23:324-329.
- Knowles (1972) *Journal of the American Oil Chemists'*

Society 49:27-29.

Knowles (1989) Oil crops of the world: their breeding and utilization/ed G. Robbelen,

R. Keith Downey, A.Ashri. McGraw-Hill, New York.

Knowles and Hill (1964) Crop Science 4:406-409.

Lacroix et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 105: 15429-15434.

Langridge et al. (2001) Aust J Agric Res 52: 1043-1077.

Lee et al. (1998) Science 280:915-918.

Lemieux (2000) Current Genomics 1: 301-311.

Liu (1998) The isolation and characterisation of fatty acid desaturase genes in cotton.

PhD. Thesis University of Sydney.

Liu et al. (1999) Functional Plant Biology 26:101-106.

Liu et al. (2001) American Journal of Botany 88:92-102.

Liu et al. (2002a). J. Am. Coll. Nutr. 21: 205S-211S.

Liu et al. (2002b). Plant Physiol. 129: 1732-1743.

Liu et al. (2010) Fuel 89:2735-2740.

Loguercio (1998) Current genetics 34:241-249.

Maher and Bressler (2007) Bioresource Technology 98:2351-2368.

Marangoni et al. (1995) Trends in Food Sci. Technol. 6: 329-335.

Martinez-Rivas et al. (2001) Molecular Breeding 8:159-168.

McCartney et al. (2004) Plant J 37: 156-173.

Mensink and Katan (1990). N. Engl. J. Med. 323: 439-445.

Millar and Waterhouse (2005) Funct Integr Genomics 5:129-135.

Mroczka et al. (2010) Plant Physiology 153:882-891.

Mundel and Bergman (2009) Safflower. Oil Crops: Handbook of Plant Breeding 4. Ed.

J. Vollman and I. Rajcan. Springer Science. Pp 423-447.

Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.

Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403.

Noakes and Clifton (1998) Am. J. Clin. Nutr. 98: 242-247.

Nykiforuk et al. (2011) Plant Biotechnology Journal 9:250-

263.

Oil World Annual (2004) International Seed Testing Association (ISTA) Mielke GmbH, Hamburg, Germany

Okuley et al. (1994) Plant Cell 6:147-158.

Ow et al. (1986) Science 234:856-859.

Pasquinelli et al. (2005) Curr Opin Genet Develop 15: 200-205.

Paterson et al. (1993) Plant Molecular Biology Reporter 11: 122-127.

Perez-Vich et al. (1998) JAOCS 75:547-555

Perrin et al. (2000) Mol Breed 6:345-352.

Peterson et al. (1997) Plant Molecular Biology Reporter 15:148-153.

Petrie et al. (2010) Plant Methods 6: 8-14.

Phillips et al. (2002) Journal of Food Composition and Analysis 12:123-142.

Potenza et al. (2004) In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 40:1-22.

Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:31-36.

Roche and Gibney (2000) Am. J. Clin. Nutr. 71: 232S-237S.

Ryan et al. (1984) J. Am. Oil Chem. Soc. 61:1610-1619.

Sadanandom et al. (1996) Plant Journal 10:235-242.

Scarth and Tang (2006) Crop Science 46:1225-1236.

Scheffler et al. (1997) TAG Theoretical and Applied Genetics 94:583-591.

Schmittgen (2008) Nature Protocols 3: 1101-1108.

Sebedio et al. (1994) Fett. Wiss. Technol. 96: 235-239.

Semwal et al. (2011) Bioresource Technology 102:2151-2161.

Shanklin and Cahoon (1998) Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49:611-641.

Slade and Knauf (2005) Transgenic Res 14: 109-115.

Small (2000a) Genetics 155: 1913-1926.

Small (2000b) Molecular phylogenetics and evolution 16:73-84.

Smith et al. (2000) Nature 407: 319-320.

- Speranza et al. (2012) *Process Biochemistry* (In Press)
- Stalker et al. (1988) *Science* 242: 419-423.
- Stymne and Appelqvist (1978) *European Journal of Biochemistry* 90:223-229.
- Tang et al. (2005) *The Plant Journal* 44:433-446.
- Taylor (1997) *The Plant Cell* 9:1245-1249.
- Thelen and Ohlrogge (2002) *Metabolic Engineering* 4: 12-21
- Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem* 263:12500-12508.
- Tholstrup et al. (1994) *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 371-377.
- Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- Tzfira and Citovsky (2006) *Curr. Opin. Biotech.* 17:147-154.
- Vanrooijen and Moloney (1995) *Bio-Technology* 13:72-77.
- Voinnet et al. (2003) *Plant Journal* 33:949-956.
- Voinnet et al. (2003) *Plant Journal* 33: 949-956.
- Voelker et al. (1990) *Plant Cell* 2:255-261.
- Waterhouse et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964.
- Wesley et al. (2001) *Plant Journal* 27: 581-590.
- Wood (2009) *Plant Biotechnology Journal* 7: 914-924.
- Wood et al. (2009) *Plant Biotechnology Journal* 7:914-924.
- Zhou et al. (2006) *Plant Science* 170:665-673.
- Zhou et al. (2011) *Journal of Biological Chemistry* 286:2877-2885.
- Zock and Katan (1992) *J. Lipid Res.* 33:399-410.
- Zock et al. (1994) *Arterioscler Thromb.* 14: 567-575.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research
Organisation
Grains Research and Development Corporation

<120> МАСЛА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

<130> 513426

<150> US 61/638,447

<151> 2012-04-25

<150> AU 2012903992

<151> 2012-09-11

<160> 171

<170> Патент в версии 3.5

<210> 1

<211> 1214

<212> ДНК

<213> *Carthamus tinctorius*

<400> 1

ctctgtagcc atatcaattc aggttgaaag caagatggga ggaggagggt gtatgtctgc	60
ctccgagacc aaagctgaag aaaagaagaa cccactcgac cgagtccctt gtgcaaaacc	120
tcctttcacc atcagtgaca tcaagcaagc cattccttcc cactgtttca accgttcctt	180
tatccgttcc ttctcttaca ttgtctatga ccttgctata gccttcgtct tctactacct	240
tgccaccacc tacatccacc gtctcccaac ccctttctcc tatctggcat ggctggctta	300
ctggatagtc caaggctgcg tgctcaccgg agcttgggtc gtagccacg aatgcggccca	360
ccatgccttt agcgattatc aatgggttga cgacaccgtg ggcttcatag tccactcctt	420
tttactcgtc ccctacttct cgtggaaata cagtcacggt cgccaccact cgaacactgc	480
atcgctcgag cgcgatgaag tctttgtccc aaagcccaga tcaaaactcc cttgggtactc	540
gaaatacttg aacaaccgc ctggccgcat catcagcctg ttcgccactc tcaactctcg	600
ctggcccttg tacttgtctt tcaacgtctc tggaagacct tatgaccgct tcgcctgcc	660
ctacgctcct aacagcccga tatacaacca ccgtgaacgc ctccagattt ggctctctga	720
tgtgggaatc gtggccatgg cattcgtcct ttaccgtgtt gcactgggtga aaggcgtgag	780
ctgggtgggtc tgtgtgtatg ggataccgtt gttgatcgtg aacgggttcc tgggtgttgat	840
cacgttcctt cagcatacgc acccttcgtt gcctcactac gacgggtcgg aatgggactg	900
gctgagaggg gcgttggcga cgggtgaccg agactacggt gtgctgaaca aggtgttcca	960
taacatcacg gacacgcacg tgggtgcacca tctgttctcg acaatgccgc attatcatgc	1020
gatggaggca acgagggcgg tgaaggggtt gctgggggag tattatcagt ttgacgagac	1080
cccgttttac gcagcgatgt ggagagaggg aaaggagtgt ctgtttgtgg aggcagatga	1140

agggaaagga ggtgtgtttt ggtacaagaa taagtaaagt tgtgatgtgg tgtgcttagg	1200
aggtttatgg aatc	1214

<210> 2
 <211> 1456
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 2	
gcacgaggcc caaacggccc atttcgctat tcaaaaggag tttcagaaag cctccaaaga	60
ttcattcagg tcattgaaca atgggtgcag gcgggcgaat gtcgaacccc tccgagggcg	120
aaaagaaaac cgaactcgaa ggcatccaac gagtcccata ccaaaaacct ccgttcacag	180
tcggggatgt caaaaaagcc atcccacctc attgtttcaa tcgatcggtc atccgctctt	240
tctcgtacgt cgtttacgac cttaccatcg catccatctt gtactacatc gccacaactt	300
tcatcccgt cctcccgac ccgctcgct acgtggcctg gccatttac tgggccgttc	360
agggctgtgt catgaccggg gtctgggtca tagcccacga atgcggccat cagcccttta	420
gcgactacca atggctcgac gacactgtcg gccttatcct acattctgtt cttcttgttc	480
cttactttct gtggaaatac agccaccgcc gccaccactc caacaccggc tcgattgagc	540
acgacgaggt cttcgtcccg aaactcaaat ccgggggtccg gtccaccgca aaatacctaa	600
acaaccccc cggccggatc ttgacccttc ttgtcacctt caccctcggc tggccgttgt	660
acctcatgtt caacgtctcc ggccgtact acgaccgctt tgccctgcat tttgacccaa	720
acagcccat ctactgaac cgtgaacgtg ccagatctt catctccgac gccgggatct	780
tcgccgtcct ctacgggctc taccggctcg cggcgggtcaa agggctcgtg tgggtcctga	840
ccgtctatgc cggaccgttg ctcggtgtca acgggtttct tgtcctgatc acgttcctcc	900
agcacacca cccgtcgttg ccgcactacg actcaaccga gtgggactgg ctccgtgggg	960
ccctggccac catcgaccgt gactacgga ttttaaaca ggtgttccac aacatcacgg	1020
acaccacgt gaccaccat ctgttttcga cgatgccgca ttatcacgcg atggaggcca	1080
cgaaggcgat aattccgatc ctcggggatt attatcagtt cgatgggacg tcagttttta	1140
aggcgatgta tagggagacg aaggagtgc tttatgtgga taaagatgag gaggtgaagg	1200
atggggttta ctggtaccgg aataagattt gaagatgatg gatgaaatga aaaaatggta	1260
ttaatagagt ggcgaaatgg tgtctttaat tagtggtgtt ttagagtatg gttttatgag	1320
ttatgatatg ccatttaaat ggacatggaa ttgttagtga tttgaataac ttttgactc	1380
tgaatatggt gtttgtaggc tatgtagcca ctctgttttt agctttttta atgcacttat	1440
ctatgttgga acctta	1456

<210> 3

<211> 1285
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 3
aatcagcagc agcacaagct caaaacttgt gcaaaagggt gaaaccatgg gggctggtgg 60
acgaatgaac gtggcggtct caggttccga aaaacccac gccttcaagc gcgttccggt 120
ctccaagcct ccattcgagc ttagcgatct caagaaagca gtcccaccac actgtttcaa 180
acgatctctt gtacgctcct ttgcagccct tttccgtgat atcataattg tcaccgcctt 240
atactacctg gccgcaacca tcattccggt gtcctctaaa ccccttacat acgtagcgtg 300
gccgctttat tgggttcttc aaggagccta tcttatgggt ttgtgggtca ttggccacga 360
gtgcgggccat catggcttca gcgagtacca atggctcgat gacaccgttg gtttcatcgt 420
ccactccttc attctcactc cgtacttttg gttcaaatac agccaccgaa cccaccacgc 480
caacaccaac tccatcgaat acgatgaggt ttggatccct aaacgcaagt ctgataaatt 540
gtactcgga gttctcaaca acccactcgg atcctttatt gtatttgtgt tcaagatcgt 600
tcttggaattt cccttgtagt tcgtattcaa tctttacgga aggaagtacg agaagggaat 660
cacaagccac ttttaccgt atagtcccat ctttaacgat agcgagcgct tccagatctt 720
tctcaccgat cttggagtct ttggcacttt gtacgggtgtc taccgtcttg cgttgataaa 780
gggcacgga tgggtgatca acttctacgg aatgccgatc cttttcatga gtgggttttt 840
catcttggtg acatatcttc accacacca cccttccatc cctcactacg attccacgga 900
atgggactgg cttagagggt ctttgggcac ggtggaccga aactttgggt tcttgaacca 960
tgctttccat gacgtaactc gaactcacgc cgtacaccat ctgttcccaa ccatcccaca 1020
ttaccatact ttcgaggcaa ggcaggccgt gatgccgatc ttgggcgatt actacaaata 1080
cgacgatacc ccgattctac aggccatatg gagagaaaca aaagattgca tctttatcga 1140
acctgaagag gttaatggag agaaaaaggg tatctactgg ttttaciaat agatggagggt 1200
tgcttaatta tatatgtatg ttgtgttgaa ttttctcct atataataag ggcataatat 1260
tgagtagcat ttggtggtat gtttg 1285

<210> 4
<211> 1346
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 4
ctcagtaacc agcctcaaaa cttgatctaa aggggtgaaa tcatgggggc tggaggacga 60
atggatggtg cggcaagctc cgagaaaccg cagccttta aacgtgttcc ggtctcgaag 120
cctccattcg agcttagcga tctcaagaaa gcagttccac cacactgttt caagcgatct 180
cttgtgcgct cttttgcagc ctttttccgt gatatcataa tcgtctccgc cttatactat 240

ctggccgcaa ccgtcattcc ggtgctccct aaacccctta cgtacgtagc atggccgctt	300
tattggttct tccaaggagc ttatcttatg ggtttgtggg tcattggcca cgaatgcggc	360
catcatggct tcagcgagta ccaatggctc gatgacaccg ttggtttcat cgtccactcc	420
ttgattctca ctccgtactt tgggttcaaa tacagccacc gaaccaccca cgccaacacc	480
aactccatcg aatacgatga ggtttggatc cctaaacgca agtctgataa attgtactcg	540
gaaatcctca acaaccact cggtatcctt gttgtatttg tgttcaagat cgttcttgga	600
tttcccttgt acttcgtggt caatctttat ggaaggaagt acgagaaggg aatcacgagc	660
cacttttacc catacagtcc catcttcaac gatagcgagc gtttccagat ctttctcacc	720
gatctcgag tctttggcac tttgtatggt gtctaccgct ttgcgttgat aaagggcacg	780
gaatgggtga tcaacttcta cggaatgccg atccttttca tgagtgggtt tttcatcttg	840
ttgacatatc ttcaccacac ccacccttcc atccctcact acgattccac cgaatgggac	900
tggcttagag gtgctttggc cacggtggac cgaaactttg ggttcttgaa ccatgccttc	960
catgacgtaa ctcgaactca cgcggtacac catctgttcc caaccatccc acattaccat	1020
actttcgagg caaggcaggc cgtgatgccg atcttgggtg attactacaa atacgatgat	1080
accccgattc tagaggccgt ttggagagag acgaaagact gcattctttat cgaacctgaa	1140
gaggttaacg gggagaaaaa gggatatttac tggttctata agtagagaaa tcataattat	1200
atatgtacca tactgaaaga attggattaa gtacatccag cggattgatc aaatacttgt	1260
gttttgtact ggttttactt tgtataatta ataaatgttg ttatctgaaa aaaaaaaaaa	1320
aaaaaagtac tagtcgacgc gtggcc	1346

<210> 5

<211> 1215

<212> ДНК

<213> Carthamus tinctorius

<400> 5

atcacaggaa gctcaaagca tctgttaaca ggttctttga tttccttgga aattagttaa	60
ggatgggagc aggagggcga atgaatgacg acgctacgag ggaaagagat gtcttcaaac	120
atgttcccgt cgagaagcct tcattcgga ttgctgatct caagaaggcc ataccaccac	180
actgtttcaa gcggtcccta accacctctt tctactacct tttccgtgat ttgggtctca	240
tctacgcttt ctactatatt gcaacaaaat acattaccca tctcccccaa cctactcgt	300
ttgtggcatg gccactttat tggatcgccc aaggtgccat ttgcatgggt ttatggaata	360
tcgtccatga ttgtggatcat cactgcttta gcgattatca atggcttgat gacaccattg	420
gcttcatctg ccactccttt ctgctcactc catacttctc tttcaaatac agtcaccgta	480
ctcatcatgc taacaccagt tcactcgaaa gggatgaagt atgggtccca aaacgcaagc	540
acgatacttg gttttatgag gttctcagca acccagtggg aagctttatc atgcttgtgt	600

ttaggttatt	ttttggcttt	cccttgact	ttatgttcaa	tcttcatggt	aggatataca	660
agggtttccc	tagccacttc	aaccggttag	gccccatctt	caacgaccga	gagcgtgcta	720
atatctggct	ctctgatgcc	ggagttctta	ccgttgtcta	tgcgctctac	cgtattgggg	780
caaaagaagg	tctccagtcg	gtacttttcg	tctatattta	tcccttgatg	gctatgagtg	840
cctttttcat	catgttcaca	tatctacacc	acactcatcc	ttccatcgct	cactacgatt	900
cgtcggaatg	ggattgggtg	agaggtgctt	tgtcaaccgt	ggatagggat	tatgggatct	960
tgaacaacat	cttccatgac	gtaacaagtg	ctcatgtggt	gcaccatcta	ttctcgagca	1020
ttccgcatta	caatacggta	gaggccacac	agtacatcaa	gccaatcttg	ggcgactact	1080
acaactacga	ttatactccc	attctcaagg	caatctggag	agacacaaaa	gaatgtctct	1140
ttattgaaga	agatccagag	aaaaaaggtg	tatactgggt	ccacaagtag	gtgtcacgat	1200
tgttacataa	cctac					1215

<210> 6
 <211> 1148
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 6	
gatttgaaga	cgtaagatg
ggagctggtg	gtcggatgaa
cgatgctacc	actgacaaag
	60
atgttctgaa	gcgtgtcccc
accgcaaaaa	ctcctttcga
gattagtgat	ctcaagaaag
	120
caataccgcc	acattgcttc
aagcgatctc	ttaccacctc
tttctactac	cttttcogtg
	180
atatttgcat	atgctatacc
tgggtaccacc	tcggatcaaa
ttacctcccc	ctcctcccta
	240
aacccttgc	ctacatagca
tggccacttt	attggttctg
ccaaggtagt	agtttcatgg
	300
gtatatggag	cataggtcac
gatttgggcc	atcatgcctt
tagcgagtac	cagtggcttg
	360
atgatgcact	tggtttcgta
atccactccg	ctttcctcac
tccatacttt	tctttcaaat
	420
acagtcaccg	tagccaccat
gctcacacca	actcaatgga
atacgatgag	gtatggatcc
	480
ctaaaagaaa	ggccgatacc
atgtattctg	aagtctctca
caaccctctc	ggaaacttgt
	540
tcatgactgt	cgtttaggtg
cttttcagct	ttcccatgta
ctttaccttc	aacattcatg
	600
gaaggccgta	taacgggttt
gtaagccact	tctaccacac
aagtcctatg	ttcaatgaca
	660
gtgagcgcaa	actagtgtgg
ctctctgatg	ccggaatggt
tgcagctttc	tatgggcttt
	720
acaagattgc	ggcaagcacg
agtgcaacat	ggttgttttg
catctacgga	gtccttttgt
	780
tggttatgaa	tgctcatttc
atctttttca	ctttcctaca
ccatagccat	gtttcccttg
	840
cccactacga	ttcaagagag
tgggattgga	tcagaggtgc
tctatccacg	gtggatagaa
	900
actacggaat	cctaaacact
gttttccatg	atgtgacctg
tgctcacgtg	gtgcatcatc
	960
tgatctcaac	cattccgcat
taccatacag	tagaggccac
caatgcagtc	aagcccatct
	1020

taggtgacta ctacaaatac gatgatacac ccatcctaaa ggcttttctgg agagaaacaa	1080
agaactgcat ttacgtcgag ccagatgaag gtgcagagga tagtggcggtt tactgggttcc	1140
gtaggtag	1148

<210> 7
 <211> 1210
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 7	
gattcagatc caacacttca ccaccaggtg taatataggg tttcattcga aaccatggga	60
gccggtggcc gaatgaagac cgaggagaaa gacatcatga aacatgtccc ggttgcgaaa	120
ccccattcgg ggatctccga tctcaagaaa gccataccac cgcactgttt caaacgatct	180
cttatatggg cgtttggctc cttcttttga gatcttatcg taatctacag cttctactat	240
ctcgcatcga ctttcattcc tttgctccct cccgccctct cgtacgtagc gtggccgcta	300
tactggttcg cccagggcag cattctaattg gggttttgga tccttggtca tgaatgtggg	360
catcatgcct ttagcgagta ccaatgggtg gacgatgccg ttggcttctt catccattcg	420
gtttgcctca ccccgtaactt ttctttcaag tacagccacc gtagccacca cgcccacag	480
aactccatcg agtacgacga ggtctacatc ccgaaacgca aggccgacac cttctactcc	540
gagttcctaa acaacggacc cggaaacgtc ttcaccctcc tcctacggac gacgctcggc	600
ttacccttgt acctgatctt caacacctac ggccgcgact acaacggatt cgcaaaccat	660
ttctaccgc aatcgggcat tttcaacgac agcgagcgcg cccaggctcg gctctcggac	720
gtcgggatct tcgcggctct ctacgcgctc taccggctcg tcctcatcca aggctgaaa	780
tcgacgatct tcctccaggg gattccgttg ttcgtgatga gcggcttctt catcttcttg	840
acttacctaa accacacca tccggcgatc gctcactacg actccaccga atgggactgg	900
ctaagaggcg ccctatcgac catcgatagg gatttcggaa tcttgaaccg ggttttccac	960
aacgcgaatc acaccacgg gatccaccat ctgttcccca cgatcccgca ttaccacgg	1020
atcgaggccc gggaggccgt gaagcccatc ttaggcgact actacatgta cgacgatacc	1080
ccgatactaa aggccatgtg gagagacaca aaggagtgca tctacgtcga accggacgac	1140
gagaagaaaag gtgtttactg gtatttcaag tagtttatat tatgtaacac catggaaatt	1200
ctttagatct	1210

<210> 8
 <211> 1269
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 8	
actagtgatt ctgctctcta cgacactaaa ttcactagga aggtcataag tttgaaagat	60

gggttccggt ggccgagcaa cggagagaag taaccccgag agtgaagtcg tcgtgaagcg	120
ggccccatcc tcgaagcccc cattcacctc tggcgacata aagaaagcca taccaccaca	180
ctgcttcgag cgatccctca tccgatcttc ctctacctt ttcttggacc tctttctatc	240
atccctcttt tactacgtgg cggccgtcta catccccgc cttccgatct ctctttcgta	300
cgtggcatgg cccgtttatt ggatcctcca agggagcgtc cagatgggtt tgtgggtcat	360
tggccacgag tgcggccacc aagccttcag tgactaccg tggtttaatg acaccattgg	420
ttaccttcta cacaccggtg tgcttgcccc ttatttctct tggaaatata gccaccgtcg	480
ccaccattcc aacacgggct cactcgagct cgacgaatct ttcgtcccca aaaagaagtc	540
cagcctaaac tccgtagcca ggctgctcaa cccccaccc ggccgtctct ttaggcttac	600
gatcttatgc accgtaggct ggctcttgta catttgcttc aatgtttccg gccgcaagta	660
tgagaagttc gccaacact ttgacccaaa gagtctatc tacaacgacc gcgagcgctt	720
tcaaactctc ctgaccgaca tcgggcttct agtaacaagc tacgggctct acaaactggc	780
cttagcccaa ggattcgctt ggctcataac catctacttt gctcctttgg ttattgttta	840
cgggttcctg gtgggtgatca cttgggttgca ccacaccac cggtcgctgc cacactacga	900
ctccaccgag tggaactggt tgaggggagc tttgtcgacg atggatcgag attacggcgt	960
tttcaacacc gttctacatc acatcaccga cagcgacgtt gcgcaccatt tgttcttcac	1020
cattcctcat tataatgcca tggaggccac gaaagcaatc aaacctttct taggagaata	1080
ctatcagttc gacgacaccc cgataatcaa agcgatgtgg agagaagcta ccgagtgctt	1140
ctttgttgaa gctgatgaag gggaaggcaa gagcaaaggc gtctattggt tcaacaataa	1200
gatgtaaaat aagttgtaaa agatcttctt cattcagtat tgttccttga tactcattag	1260
atagaaatc	1269

<210> 9
 <211> 1296
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 9	
ctgaattcac acccacagat agctagctag ctaccatta aaagcttaat cagctcatcc	60
cctcaattcc aaaacctcaa attgaacca tttctttaag aatcatgggt gccggtggcc	120
gatcgaatcc tcgcatcta gacgttaaga aattcgatac cgtagaaggc atcaagagag	180
ccccaaactc aaaacctcca ttcacattag cagatatcaa gaaagccata ccacccatt	240
gcttccaaag atccctaatt cgatcctttt cgtatctcgt atacgacctc accgcggtct	300
cgattttcta ctatcttgcc acgacttaca tcccgcagct cccctaccct cttgcctacg	360
ttgcctggcc ggtttactgg tttgttcaag gctgtgtggt catggggcct tggcttattg	420
ctcatgaatg cggtcacat gccttcagtg atcatgtgtg gctggaggat tcgatcgggt	480

ttgttttaca ttcatgcctt ttgacccctt acttttcatg gaagataagc caccgtcgac	540
atcatgcgaa cacgggttcg cttgagcacg atgaggttta tgtcccgaag acaaaggcta	600
aactcgggtgc ctccgcgttt tacctggaca acccaatcgg tcgaacccta accctgatgg	660
ttaagctcac tcttgatgg tacatctact tggcgatcaa tgctgcgga agaccttacg	720
aaaaattcgc aagccattac gacccagaa gtgagatggt ttccgataac gagaggggtct	780
tgatactcat gtccgatatc ggacttttga gcttctcctt cttgctttac aaagtggcca	840
tggttcaagg gtttgcttgg gtcttctgcg tctacggagg tgcgttgatg gtgatgaacg	900
cttttctcgt gacgattacg taccttcacc ataccaccc ttctttgccc cactacgacg	960
actccgaatg gaactggatg aaaggcgcat tcgcgaccgt cgatagggat tacggagtag	1020
ttctaaacaa ggtgttccac aacatcacgc acacgcattg ttacaccat ttgttctcgt	1080
acattcctca ttatcatgcc atggaagcca cgaaggctat ccggccggtt ctcggggagt	1140
tttaccagat cgataggact ccgtttttcg tggcgttgtg gagggaatcc aagagctgct	1200
tgttcattga gcccgatgaa agcgatgaga agaacaaagg tatctactgg tacaggagta	1260
agtactgaag gaatagttaa agctaagaag ggatgt	1296

<210> 10
 <211> 1316
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 10	
acttcgccct ctgttatctg gttgaattat ccgatcaagc ggcattggac aacaatatgg	60
gcggaggagg gtgcataccc gcaagcaaaa ccgaagccca acaaacaac catctctcga	120
gagttcctta cgaaaaaccg gccttcactg ttggtgacat caagcgagtc atccctcccc	180
actgttttca acgttccctt atccgttcct tctcttatgt cgcatatgac cttgccatag	240
ccttctgtc gtaccacctc gccaccacct acttccaccg tctctcgccg cccctctcct	300
acctcgcatg gtccgcttac tggatcggtc aaggggtgtg gctcaccggg gtctgggtca	360
tagcccacga gtgcggtcac catgcgttta gcgaccacca atgggtcgat gacacagtcg	420
gcctcatcct ccactcggcc ttactcgtcc cctacttctc ctggaaatgc agccaccgcc	480
gccaccacct caacaccgcg tcaactggaac gcgatgaagt gttcgtcccc aaacccaaat	540
cgaaaatccc gtggtactct aaatacctga acaaccacc gggccgtttg ataatcgtgt	600
tcaccacgct cgttctcggc tggccgttgt acctggcctt taacgtttcc ggacggccct	660
acgaccgttt tgcctgccac tacgtccta acagcccgat cttcacaac cgtgaacgcc	720
tccaaatctg gatttccgat gccgggatta tcgcagtttc gtatctgctt taccgtatgg	780
ctttagccaa aagcgtcgct tgggtcgttt gcatttatgg tgtcccggtg ctgatcgtga	840

acggggttttt ggtcatgatc acataccttc aacacaccca cccttcattg cccactatg	900
acgattccga gtgggactgg ctccgggggg ctttagcgac cgtggaccgt gactacggtc	960
tcctgaacaa ggtcttccat aacataaccg acacgcacgt ggtgcaccat ctgttctcga	1020
ccatgccgca ttatcatgcc atggaggcaa cgaaggcggg cgagccgggtg cttgggggggt	1080
actatcggtt tgacgacacc ccgttttacg tggccatgtg gagggaggcg aaggagtgtc	1140
tctatgtgga gaccgatgag aagaaagggtg gcgtgttttg gtacaagaat aagtactgat	1200
gcgagcgcgga tggatggatg tcgagttcgc ttttagtgaa agagtagcta ttttatcgtg	1260
tgtttcgtgt ttaagtaagt gaacttttcg gtatcgtgta ggatgtatgt gtatgg	1316

<210> 11
 <211> 1213
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 11	
actcacaata acttcatctc tctctaagggt tgatcatata tcaacaacat gggagcagggt	60
ggtcggatgt cggattcatc tgaaagcaca gatatcctga aacgtgtccc cattgatcca	120
cccttcacct taagtgatct aaagaaagca atcccggctc attgcttcga gagatctctc	180
atccgttcat cttactatgt tgttcatgat ctcggtgttg cctatgtctt ttactacctt	240
gccgacacat atattcctca gcttcctact ccactggcgt acctagcctg gccattttac	300
tggttttgtc aagctagcat ctgcactggc ttatgggtca tcgggtcatga atgtgggtcac	360
catgccttta gtgagcatca gtggattggg gacattgttg gaatggtcct ccattctgct	420
cttttttacgc cttatttcgc ctggaaatac agccatcgaa atcaccatgc aaacacgaac	480
tcactcgata acgatgaagt ttacattcct aaacgtaagt ccaagatcgc gattttattca	540
aaactttctca acaaccacc tggtcgagtt ttaccttgg tttttagggt gaccctagga	600
tttcctttgt acctcctcac aaatatttct ggcaagaaat acggaagggt tgccaaccac	660
tttgatccaa tgagtccaat tttcactgag cgtgaacgaa ttcagggtttt ggtatcggat	720
cttggtattc ttgccgttat ttacgcaatc aagcttgctg tagcagcaaa aggagccgct	780
tgggtaattt ccatgtacgg aattccagtc ataggcgtac atgttttctt tgttttgatc	840
acttatctac atcacaccca tctctctttg cctcattacg attcaaccga atggaactgg	900
atccgaggag ctttatcgac aatcgacagg gactttggat tcctgaacag ggttttccat	960
gacgttacac aactcacgt attgcatcat ttgatctcat acattccaca ttatcatgcc	1020
aaggaggcaa gggatgcgat caagcctatt ttgggcgagt actataagat cgataggacc	1080
ccaattttca aagctatgtg gagggaggcc aaagaatgca tctacattga acctgatgag	1140
gacagcgagc acaagggtag atactggtac cataaaatgt gatcgtatggc cgaagacatt	1200
gtatggctag tag	1213

<210> 12
 <211> 1143
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 12
 atgggaggag gaggggtgtat gtctgcctcc gagaccaaag ctgaagaaaa gaagaaccca 60
 ctcgaccgag tcccttgtgc aaaacctcct ttcaccatca gtgacatcaa gcaagccatt 120
 ccttcccact gtttcaaccg ttcccttata cgttccttct cttacattgt ctatgacctt 180
 gctatagcct tcgtcttcta ctaccttgcc accacctaca tccaccgtct cccaaccctt 240
 ttctcctatc tggcatggct ggcttactgg atagtccaag gctgcgtgct caccggagct 300
 tgggtcgtag cccacgaatg cggccaccat gccttttagcg attatcaatg ggttgacgac 360
 accgtgggct tcatagtcca ctccctttta ctcgctccct acttctctgtg gaaatacagt 420
 catcggcgcc accactcgaa cactgcatcg ctcgagcgcg atgaagtctt tgtcccaaag 480
 cccagatcaa aactcccttg gtactcgaaa tacttgaaca acccgcttgg ccgcatcatc 540
 agcctgttcg ccaactctcac tctcggttgg cccttgtact tgtctttcaa cgtctctgga 600
 agaccctatg accgcttcgc ctgccactac gtccttaaca gcccgatata caaccacgt 660
 gaacgcctcc agatttggct ctctgatgtg ggaatcgtgg ccatggcatt cgtcctttac 720
 cgtgttgacac tggtgaaagg cgtgagctgg gtgggtctgtg tgtatgggat accgttggtg 780
 atcgtgaacg ggttcctggt gttgatcacg ttccttcagc atacgcaccc ttcggttgct 840
 cactacgacg ggtcggaatg ggactggctg agaggggctg tggcgacggt ggaccgagac 900
 tacggtgtgc tgaacaaggt gttccataac atcacggaca cgcacgtggt gcaccatctg 960
 ttctcgacaa tgccgcatta tcatgcatg gaggaacga gggcggtgaa ggggttgctg 1020
 ggggagtatt atcagtttga cgagaccccg ttttacgcag cgatgtggag agaggcaaag 1080
 gagtgtctgt ttgtggaggc agatgaaggg aaaggaggtg tgttttggtg caagaataag 1140
 taa 1143

<210> 13
 <211> 1152
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 13
 atgggtgcag gcgggcgaat gtcgaacccc tccgagggcg aaaagaaaac cgaactcgaa 60
 ggcatccaac gagtcccata ccaaaaacct ccgttcacag tcgggggatgt caaaaaagcc 120
 atcccacctc attgtttcaa tcgatcggtc atccgctctt tctcgtacgt cgtttacgac 180
 cttaccatcg catccatctt gtactacatc gccacaactt tcatcccgct cctcccgcac 240
 ccgctcgcct acgtggcctg gcccatcttac tgggcccgttc agggctgtgt catgaccggg 300

gtctgggtca tagcccacga atgcgggccat cagcctttta gcgactacca atgggtcgac	360
gacactgtcg gccttatcct acattctgtt cttcttggtc cttactttctc gtggaaatac	420
agccaccgcc gccaccactc caacaccggc tcgattgagc acgacgaggt cttcgtcccg	480
aaactcaaat ccgggggtccg gtccaccgca aaatacctaa acaaccccc cggccggatc	540
ttgacccttc ttgtcacctt caccctcggc tggccgttgt acctcatggt caacgtctcc	600
ggccgctact acgaccgctt tgccctgccat tttagaccaa acagcccat ctactcgaac	660
cgtgaacgtg cccagatctt catctccgac gccgggatct tcgccgtcct ctacgggctc	720
taccggctcg cggcgggtcaa agggctcgtg tgggtcctga ccgtctatgc cggaccgttg	780
ctcgtgggtca acgggtttct tgtcctgatc acgttcctcc agcacacca cccgtcgttg	840
ccgcactacg actcaaccga gtgggactgg ctccgtgggg ccttggccac catcgaccgt	900
gactacggga ttttaacaa ggtgttccac aacatcaccg acaccacgt gaccaccat	960
ctgttttcga cgatgccgca ttatcacgag atggaggcca cgaaggcgat aattccgatc	1020
ctcggggatt attatcagtt cgatgggacg tcagttttta aggcgatgta tagggagacg	1080
aaggagtgca tttatgtgga taaagatgag gaggtgaagg atggggttta ctggtaccgg	1140
aataagattt ga	1152

<210> 14
 <211> 1128
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 14	
atgaacgtgg cgggtctcagg ttccgaaaaa cccacgcct tcaagcgcgt tccggtctcc	60
aagcctccat tcgagcttag cgatctcaag aaagcagtc caccacactg tttcaaacga	120
tctcttgtag gtccttttgc agcccttttc cgtgatata taattgtcac cgccttatac	180
tacctggccg caaccatcat tccggtgctc cctaaacccc ttacatacgt agcgtggccg	240
ctttatttgt tcttccaagg agcctatctt atgggtttgt gggtcattgg ccacgagtgc	300
ggccatcatg gcttcagcga gtaccaatgg ctcgatgaca ccgttggttt catcgtccac	360
tccttcattc tactccgta ctttgggttc aaatacagcc accgaacca ccacgccaac	420
accaactcca tcgaatacga tgagggttg atccctaaac gcaagtctga taaattgtac	480
tcggaagttc tcaacaaccc actcggatcc tttattgtat ttgtgttcaa gatcgttctt	540
ggatttcctt tgtacttcgt attcaatctt tacggaagga agtacgagaa gggaatcaca	600
agccactttt acccgatatg tcccatcttt aacgatagcg agcgcttcca gatctttctc	660
accgatcttg gagtcttttg cactttgtac ggtgtctacc gtcttgcggt gataaagggc	720
acggaatggg tgatcaactt ctacggaatg ccgatccttt tcatgagtgg gtttttcac	780

ttgttgacat atcttcacca caccaccct tccatccctc actacgattc cacggaatgg	840
gactggctta gaggtgcttt ggccacggtg gaccgaaact ttgggttctt gaaccatgct	900
ttccatgacg taactcgaac tcacgccgta caccatctgt tcccaaccat cccacattac	960
catactttcg aggcaaggca ggccgtgatg ccgatcttgg gcgattacta caaatacgac	1020
gataccccga ttctacaggc catatggaga gaaacaaaag attgcatctt tatcgaacct	1080
gaagagggtta atggagagaa aaagggtatc tactggtttt acaaatag	1128

<210> 15
 <211> 1125
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 15	
atggatgttg cggcaagctc cgagaaaccg cacgccttta aacgtgttcc ggtctcgaag	60
cctccattcg agcttagcga tctcaagaaa gcagttccac cacactgttt caagcgatct	120
cttgtgcgct cctttgcagc ccttttccgt gatatcataa tcgtctccgc cttatactat	180
ctggccgcaa ccgtcattcc ggtgctccct aaaccctta cgtacgtagc atggccgctt	240
tattggttct tccaaggagc ttatcttatg ggtttgtggg tcattggcca cgaatgcggc	300
catcatggct tcagcgagta ccaatggctc gatgacaccg ttggtttcat cgtccactcc	360
ttgattctca ctccgtactt tgggttcaaa tacagccacc gaaccaccca cgccaacacc	420
aactccatcg aatacgatga ggtttggatc cctaaacgca agtctgataa attgtactcg	480
gaaatcctca acaaccact cggatccttt gttgtatttg tgttcaagat cgttcttgga	540
tttcccttgt acttcgtgtt caatctttat ggaaggaagt acgagaaggg aatcacgagc	600
cacttttacc catacagtcc catcttcaac gatagcgagc gtttccagat ctttctcacc	660
gatctcgag tctttggcac tttgtatggt gtctaccgtc ttgcgttgat aaagggcacg	720
gaatgggtga tcaacttcta cggaatgccg atccttttca tgagtgggtt tttcatcttg	780
ttgacatatc ttcaccacac ccacccttcc atccctcact acgattccac cgaatgggac	840
tggcttagag gtgctttggc cacggtggac cgaaactttg ggttcttgaa ccatgccttc	900
catgacgtaa ctcgaactca cgcggtacac catctgttcc caaccatccc acattacat	960
actttcgagg caaggcaggc cgtgatgccg atcttgggtg attactacaa atacgatgat	1020
accccgattc tagaggccgt ttggagagag acgaaagact gcacttttat cgaacctgaa	1080
gaggttaacg gggagaaaaa gggatatttac tggttctata agtag	1125

<210> 16
 <211> 1128
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 16

atgggagcag gagggcgaat gaatgacgac gctacgaggg aaagagatgt cttcaaacat	60
gttcccgtcg agaagccttc attcgggatt gctgatctca agaaggccat accaccacac	120
tgtttcaagc ggtccctaac cacctctttc tactaccttt tccgtgattt gggctctatc	180
tacgctttct actatattgc aacaaaatac attaccatc tcccccaacc ctactcgttt	240
gtggcatggc cactttattg gatcgcccaa ggtgccattt gcatggggtt atggaatata	300
gtccatgatt gtggatcatca ctgcttttagc gattatcaat ggcttgatga caccattggc	360
ttcatctgcc actcctttct gctcactcca tacttctctt tcaaatacag tcaccgtact	420
catcatgcta acaccagttc actcgaaagg gatgaagtat ggggtccaaa acgcaagcac	480
gatacttggg tttatgaggt tctcagcaac ccagtgggaa gctttatcat gcttggtgtt	540
aggttatttt ttggctttcc cttgtacttt atgttcaatc ttcatggtag gatatacaag	600
ggtttcccta gccacttcaa cccgttaggc cccatcttca acgaccgaga gcgtgctaata	660
atctggctct ctgatgccgg agttcttacc gttgtctatg cgctctaccg tattggggca	720
aaagaaggtc tccagtcggg acttttcgtc tatatttatc ccttgatggc tatgagtgc	780
tttttcatca tgttcacata tctacaccac actcatcctt ccatcgctca ctacgattcg	840
tccgaatggg attgggttgag aggtgctttg tcaaccgtgg atagggatta tgggatcttg	900
aacaacatct tccatgacgt aacaagtgc catgtggtgc accatctatt ctcgagcatt	960
ccgcattaca atacggtaga ggccacacag tacatcaagc caatcttggg cgactactac	1020
aactacgatt atactcccat tctcaaggca atctggagag acacaaaaga atgtctcttt	1080
attgaagaag atccagagaa aaaagggtga tactggttcc acaagtag	1128

<210> 17

<211> 1131

<212> ДНК

<213> Carthamus tinctorius

<400> 17

atgggagctg gtggtcggat gaacgatgct accactgaca aagatgttct gaagcgtgtc	60
cccaccgcaa aaactccttt cgagattagt gatctcaaga aagcaatacc gccacattgc	120
ttcaagcgat ctcttaccac ctctttctac taccttttcc gtgatatttg catatgctat	180
acctggtacc acctcggatc aaattacctc cccctcctcc ctaaaccctc tgcctacata	240
gcatggccac tttattggtt ctgccaaggc agtagtttca tgggtatatg gagcataggt	300
cacgatttgg gccatcatgc ctttagcgag taccagtggc ttgatgatgc acttggtttc	360
gtaatccact ccgctttcct cactccatac ttttctttca aatacagtca ccgtagccac	420
catgctcaca ccaactcaat ggaatacgat gaggtatgga tccctaaaag aaaggccgat	480
accatgtatt ctgaagtcct caacaacca ctcgaaaact tgttcatgac tgtcgttagg	540
ttgcttttca gctttcccat gtactttacc ttcaacattc atggaaggcc gtataacggg	600

tttctaagcc acttctaccc acaaagtcct atgttcaatg acagtgagcg caaactagtg	660
tggctctctg atgccggaat ggttgcagct ttctatgggc ttacaagat tgcggcaagc	720
acgagtgcaa catggttggt ttgcatctac ggagctcctt tgttggttat gaatgctcat	780
ttcatctttt tcactttcct acaccatagc catgtttccc ttgccacta cgattcaaga	840
gagtgggatt ggatcagagg tgctctatcc acggtggata gaaactacgg aatcctaaac	900
actgttttcc atgatgtgac ctgtgctcac gtggtgcac atctgatctc aaccattccg	960
cattaccata cagtagaggc caccaatgca gtcaagccca tcttaggtga ctactacaaa	1020
tacgatgata caccatcct aaaggcttcc tggagagaaa caaagaactg catttacgtc	1080
gagccagatg aaggtgcaga ggatagtggc gtttactggg tccgtaggta g	1131

<210> 18
 <211> 1119
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 18	
atgggagccg gtggccgaat gaagaccgag gagaaagaca tcatgaaaca tgtcccggtt	60
gcgaaacccc cattcgggat ctccgatctc aagaaagcca taccaccgca ctgtttcaaa	120
cgatctctta tatggtcgtt tggctccttc ttctgagatc ttatcgtaat ctacagcttc	180
tactatctcg catcgacttt cattcctttg ctccctcccg ccctctcgta cgtagcgtgg	240
ccgctatact ggttcgcccc gggcagcatt ctaatggggg tttggatcct tggatcatgaa	300
tgtggatcac atgccttttag cgagtaccaa tgggtggacg atgccgttgg cttcttcac	360
cattcgggtt gcctcacccc gtacttttcc ttcaagtaca gccaccgtag ccaccacgcc	420
cacacgaact ccatcgagta cgacgaggtc tacatccga aacgcaaggc cgacaccttc	480
tactccgagt tcctaaacaa cggaccggga aacgtcttca ccctcctcct acggacgacg	540
ctcggttac cttgtacct gatcttcaac acctacggcc gcgactacaa cggattcgca	600
aaccatttcc taccgcaatc gggcattttc aacgacagcg agcgcgccca ggtcgtgctc	660
tcggacgtcg ggatcttcgc ggtcctctac gcgctctacc ggctcgtcct catccaaggc	720
ctgaaatcga cgatcttcct ccaggggatt ccgttggtcg tgatgagcgg cttcttcac	780
ttcttgactt acctaaacca caccatccg gcgatcgctc actacgactc caccgaatgg	840
gactggctaa gaggcgccct atcgaccatc gatagggatt tcggaatctt gaaccggggtt	900
ttccacaacg cgaatcacac ccacgggatc caccatctgt tccccacgat cccgcattac	960
cacgcgatcg agggccggga ggccgtgaag cccatcttag gcgactacta catgtacgac	1020
gataccccga tactaaaggc catgtggaga gacacaaagg agtgcactca cgtcgaacgg	1080
gacgacgaga agaaagggtg ttactgggtat ttcaagtat	1119

<210> 19
<211> 1149
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 19
atgggttccg gtggccgagc aacggagaga agtaaccccg agagtgaagt cgtcgtgaag 60
cgggcccat cctcgaagcc cccattcacc cttggcgaca taaagaaagc cataccacca 120
cactgcttcg agcgatccct catccgatct tctcctacc ttttcttga cctctttcta 180
tcatccctct tttactacgt ggcgccgctc tacatccccc gccttccgat ctctctttcg 240
tacgtggcat ggcccgttta ttggatcctc caagggagcg tccagatggg tttgtgggtc 300
attggccacg agtgccggcca ccaagccttc agtgactacc cgtgggttta tgacaccatt 360
ggttaccttc tacacaccgg tatgcttgcc ccttatttct cttggaaata cagccaccgt 420
cgccaccatt ccaacacggg ctcactcgag ctcgacgaat ctttcgtccc caaaaagaag 480
tccagcctaa actccgtagc caggctgctc aacacccac ccggccgtct ctttaggctt 540
acgatcttat gcaccgtagg ctggctcttg tacatttgct tcaatgtttc cggccgcaag 600
tatgagaagt tcgccaacca ctttgacca aagagtccta tctacaacga ccgcgagcgc 660
tttcaaatec tctgaccga catcgggctt ctagtaacaa gctacgggct ctacaaactg 720
gccttagccc aaggattcgc ttggctcata accatctact ttgctccttt ggttattggt 780
tacgggttcc tgggtggtgat cacttggttg caccacaccc accggtcgct gccacactac 840
gactccaccg agtggaactg gttgagggga gctttgtcga cgatggatcg agattacggc 900
gttttcaaca ccgttctaca tcacatcacc gacacgcacg ttgcgcacca tttgttcttc 960
accattcctc attataatgc catggaggcc acgaaagcaa tcaaaccctt cttaggagaa 1020
tactatcagt tcgacgacac cccgataatc aaagcgatgt ggagagaagc taccgagtgc 1080
ttctttgttg aagctgatga aggggaaggc aagagcaaag gtgtctattg gttcaacaat 1140
aagatgtaa 1149

<210> 20
<211> 1164
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 20
atgggtgccg gtggccgata gaatcctcgc gatctagacg ttaagaaatt cgataccgta 60
gaaggatatc agagagcccc aacttcaaaa cctccattca cattagcaga tatcaagaaa 120
gccataccac cccattgctt ccaaagatcc ctaattcgat ccttttcgta tctcgtatac 180
gacctcaccg cggctctgat tttctactat cttgccacga cttacatccc gcagctcccc 240
taccctcttg cctacgttgc ctggccggtt tactgggttg ttcaaggctg tgtgttcattg 300

gggctttggc ttattgctca tgaatgcggt caccatgcct tcagtgatca tgtgtggctg	360
gaggattcga tcgggtttgt ttacattca tgccttttga ccccttactt ttcattggaag	420
ataagccacc gtcgacatca tgcgaacacg ggttcgcttg agcacgatga ggtttatgtc	480
ccgaagacaa aggctaaact cgggtgcctcc gcgttttacc tggacaaccc aatcgggtoga	540
accctaaccc tgatgggttaa gctcactctt ggatgggtaca tctacttggc gatcaatgct	600
gcgggaagac cttacgaaaa attcgcaagc cattacgacc ccagaagtga gatgttttcc	660
gataacgaga gggctcttgat actcatgtcc gatatcggac ttttgagctt ctccttcttg	720
ctttacaaag tggccatggt tcaagggttt gcttgggtct tctgcgtcta cggaggtgcg	780
ttgatgggtga tgaacgcttt tctcgtgacg attacgtacc ttcaccatac ccacccttct	840
ttgccccact acgacgactc cgaatggaac tggatgaaag gcgcattcgc gaccgtcgat	900
agggattacg gagtagttct aaacaagggtg ttccacaaca tcaccgacac gcatgtttta	960
caccatttgt tctcgtacat tcctcattat catgccatgg aagccacgaa ggctatccgg	1020
ccggttctcg gggagtttta ccagatcgat aggactccgt ttttcgtggc gttgtggagg	1080
gaatccaaga gctgcttggt cattgagccc gatgaaagcg atgagaagaa caaaggatcc	1140
tactggtaca ggagtaagta ctga	1164

<210> 21
 <211> 1143
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 21	
atgggcgagg gaggtgcat acccgcaagc aaaaccgaag cccaacaaac aaaccatctc	60
tcgagagttc cttacgaaaa accggccttc actgttgggtg acatcaagcg agtcatccct	120
ccccactgtt ttcaacgttc ccttatccgt tccttctctt atgtcgcata tgaccttgcc	180
atagccttcc tgtcgtacca cctcgccacc acctacttcc accgtctctc gccgcccctc	240
tcctacctcg catggtccgc ttactggatc gttcaagggt gtgtgctcac cggggtctgg	300
gtcatagccc acgagtgcgg tcaccatgcg tttagcgacc accaatgggt cgatgacaca	360
gtcggcctca tcctccactc ggccttactc gtcccctact tctcctggaa atgcagccac	420
cgccgccacc acctcaacac cgcgtcactg gaacgcgatg aagtgttcgt ccccaaacc	480
aatcgaaaa tcccgtggta ctctaaatac ctgaacaacc caccgggccc tttgataatc	540
gtgttcacca cgctcgttct cggtggccg ttgtacctgg cctttaacgt ttccggacgg	600
ccctacgacc gttttgcctg ccactacgct cctaacagcc cgatcttcac aaaccgtgaa	660
cgctccaaa tctggatttc cgatgccggg attatcgag tttcgtatct gctttaccgt	720
atggcttttag ccaaaagcgt cgcttgggtc gtttgcatct atggtgtccc gttgctgac	780
gtgaacgggt ttttgggtcat gatcacatac cttcaacaca cccacccttc attgccccac	840

tatgacgatt ccgagtggga ctggctccgg ggggcttttag cgaccgtgga ccgtgactac	900
ggtctcctga acaaggtctt ccataacata accgacacgc acgtggtgca ccatctgttc	960
tcgaccatgc cgcattatca tgccatggag gcaacgaagg cggtcgagcc ggtgcttggg	1020
gggtactatc ggtttgacga cccccgttt tacgtggcca tgtggaggga ggcgaaggag	1080
tgtctctatg tggagaccga tgagaagaaa ggtggcgtgt tttggtacaa gaataagtac	1140
tga	1143

<210> 22
 <211> 1134
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 22	
atgggagcag gtggtcggat gtcggattca tctgaaagca cagatatacct gaaacgtgtc	60
cccattgatc cacccttcac cttaagtgat ctaaagaaag caatcccggc tcattgcttc	120
gagagatctc tcatccgttc atcttactat gttgttcatg atctcgttgt tgcctatgtc	180
ttttactacc ttgccgacac atatatctcct cagcttccta ctccactggc gtacctagcc	240
tggcccattt actgggttttg tcaagctagc atctgcaactg gcttatgggt catcggtcat	300
gaatgtggtc accatgcctt tagtgagcat cagtggattg gtgacattgt tggaatggtc	360
ctccattctg ctctttttac gccttatttc gcctggaaat acagccatcg aaatcaccat	420
gcaaacacga actcactcga taacgatgaa gtttacattc ctaaacgtaa gtccaagatc	480
gcgatttatt caaaacttct caacaacca cctggtcgag tttttacctt ggtttttagg	540
ttgaccctag gatttccttt gtacctctc acaaatattt ctggcaagaa atacggaagg	600
tttgccaacc actttgatcc aatgagtcca attttcaactg agcgtgaacg aattcaggtt	660
ttggtatcgg atcttggtat tcttgccgtt atttacgcaa tcaagcttgc tgtagcagca	720
aaaggagccg cttgggtaat ttccatgtac ggaattccag tcataggcgt acatgttttc	780
tttgttttga tcaattatct acatcacacc catctctctt tgccctatta cgattcaacc	840
gaatggaact ggatccgagg agccttatcg acaatcgaca gggactttgg attcctgaac	900
agggttttcc atgacgttac acacactcac gtattgcac atttgatctc atacattcca	960
cattatcatg ccaaggaggc aagggatgcg atcaagccta ttttgggcga gtactataag	1020
atcgatagga cccaatttt caagctatg tggagggagg ccaaagaatg catctacatt	1080
gaacctgatg aggacagcga gcacaagggt acatactggt accataaaat gtga	1134

<210> 23
 <211> 1083
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 23

gtgcattctc tcattctcaa aacctttctg ctattcatct gatcaatgta ttcagttatg	60
gttcgatgat cgacgattat tgtttgttat ttttaatttta attttttaggt tgatttagct	120
gcattgttgg tcgatgaata gatctgtgga ttacgggtctt ctgcagtttc agtttgattt	180
atttcagtcc gtttttctcc tgtaaatttg tgtatctatc tgtggttgcg gtaattttgt	240
ttccttttaga ttatagaaat gaaaatccat aatttttaggg ctgcttgtct tgtttggatt	300
tgtgttatta ggttttgatc acagtaactt ccgtacgttt aatatgttaa atgctaaaca	360
aaatgattta ttttttatat ttatggcttc tcgggtggtcg gatttgtgtt tttaatctct	420
gaagtttctg tataacaatga tttcgaattt tggcgattag gcacctcttt actttggaag	480
gaatttcaga ttttcttaat ctcatagaga agtgctgatt gggaatttgc ttaaagatat	540
aagcactttt cagttcattg attgtttgat ggacatcaga tgggtttttt gctgatgcca	600
tgatgtctat tgtgttgaat gtatcttcaa taagtgcctt caatatgtat agcaaaactg	660
agctaaggct gtgtttggca aactacctga taagctatat gttgactgat aagctagttt	720
gtgaataaat tatgtttggc aaaaactagc atatgagtat gtaaaatgac taaaaaggg	780
atcttggggg ataatagtta atattgataa ggatagaatt ggagaaggct acaaaaagcc	840
cttgaaatgc tactccaact agtgtttcaa taagctggct tatgggtctat ccaaacatgt	900
actagattat catctagctt atttttgcc aacacagcct aaatgtttga tggtcgatgg	960
ctggcacttg acaatttgac atcattataa ctgaaacaat aatattcacc tttacataac	1020
attcaccttt agccaaaaac tagatgttca cctacgaact gatccatatg gaacattttg	1080
cag	1083

<210> 24
 <211> 3092
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 24

gtgagatcga tcatcttctt tcataaacat ctgattagta ataatcggta tccaagctgt	60
atgtgtgtga atttgtggaa ttttgaattt gaatgtcgtg atttgaatct gttaggattt	120
aggggtgaaa gagtcggttt acttgataga tctgaatttt ttttaagagt tagtagcttc	180
ggatgttgat ttaggtggaa tgcggtctaa gtttttgcg atctgagcac cggttcttct	240
aaatctaaag gttactgatt ataatcgatc ttctttcgat ttctatgaat ttactccttt	300
tttttttctt tggaaaaagg tgctactact ttatttgagc tgagatctgc gctgcttttg	360
attccgattc cttttttgga tcaaatagtt gaaaactgca atgtttatgg tcaaattttt	420
gcttctaatt tttccaggag catgcctaata tatgcttctt attggattgg aattcagaaa	480
taaaattaag tttgaatatt atacaggtat tagattcaaa gaagtggaaat aaaaagcaga	540

ggcttaatag atgctagctt gtagatgaag gacctgtttt aagtagtcat taaaacttgc	600
atgtcccaaa ataagcaaac atttacacta tttgatattt tgatttaaaa aggggaatcca	660
atgttactga atgaagcaaa ccacaatcaa tatcaacaca gatccagctc aaatggaaaa	720
actaaatfff tttctccaag aagaaaccta aacaaaaaga gttaaagttaa caaaaatgga	780
agaaggcttg tatagttcct gtttgttttg ataataatca gtaacctcta attcttacac	840
cataaataat caagatttaa aaaactgggtg ctcagatcta caaaactgaa gccatatact	900
accttaaatc agattgattg ttagttactt aagagttata cttattttctg tgttttgtcc	960
tcagtctgtt tcatatgggtg gacctgtcac atgggcctaa accaaacttt tgtaacttgg	1020
tgaattgatt ttattaagcc aagttgtacc atccttttca gaaagccctc tcattaatgg	1080
catattccca aaagcaaadc cttttgggggt catatgaaat gatcttttct gagcttatca	1140
aaaaagacgc tgaactgtta gccataaatt agtagctttt tgaaaagcta tattaggtag	1200
cgttgcaata acccccggat gttattttctt ttcttccagt tatgccgttt attattttcc	1260
gagtaatcta aagcaagtta ctttaggtca tatttattgc aaacttaccg cccgccgcgc	1320
cattaccaac ggagctttat tatagggtcat attacgttgt cgttttatca actggcttgt	1380
caaacatatc tttggttcta agtggctcca cttgttccta tgattctcca ttttactata	1440
ctagatattt atgatgtga attgggtcaac ataaggttga gtagttgcat aacttttggg	1500
tgctttgaaa gattgcagtc aaaattggag tattggcatg aatagtcctt ttttttcttt	1560
tttggtgaaa gcagtatgtt ttgcattatt gaagtttttt attccaagaa aacgtggctc	1620
ttttttcttt tttggtaaat ttggacctat ttttgaatga ttagcctaatt tttttcaaat	1680
ccatgtgcat tgaaggcact ataaacatga cttcttatgg gttatcatca taagtgttac	1740
ataattggaa aaggtaattg ctttataact acccttataa attttttgtc acaaagtagc	1800
taaaaaacca caagatactt ttcttgctga ttcgcaagct gcgaaacggg cttgcggttc	1860
cacatctctt ggcgttggtc tgttctttta tgcgtagacg caagagacta aaatacccc	1920
aacttgcggt tttttattgg tttttgtgat ggaccactt tttccactgg attggtagat	1980
tttctgagaa ctgcgttata aaagtgcctt gtagcgttta cttgcgtttt gatagccgtt	2040
tttttgtttt ttgtttttct agtgaggcgg ccatttgaga tgataacctt ttttctttat	2100
ttcttttctt tggggcaaga ggtcactttc ccactggctt cactatgggt ttattattat	2160
ttttctaadc gtggatgtct aggtcagatt taacacttga tagccctaa ttctcgtatt	2220
cttcttggtc ctatatttaa attttctttg caaatcaacc atggttctta tgagtttgtg	2280
acacccacc cccctcattc ggcatgggtg caatatgtgt ggattctttt tctgtatttt	2340
ttttttgtaa aacaaacaaa atatatattat gatgatttag gtggtatact gtacttgcac	2400
aaacagtttc gagtttctta gctgcactgt aggagttaca acttacaatt cctttatgg	2460

atctttaatg gacaacatca agtcttacac caaatccata aaaattagtg tagaatttgg	2520
agaaaacaat actccaatgg ataacactga attttgcacc aaaatgtaag gacgcttttg	2580
gaattgggttg tgaaaaagat ttttggaata ctacaaaaat cagttttcta atttacatag	2640
aagttacaaa acaaaatttt ttggaactaa acacgttttc taaattttca tttttcttgg	2700
aaaactgtga aattttccgc tagtataaat gaacagtgtc acaccaaatt tggcgtatga	2760
tttgatttct ccctcggaga tttggtgtaa gatttgggtc cgtgattgga gatggtotta	2820
gggattaagt tctttgtgac gtgtgaacac ttggtccata aaccagccac ctaacaagcc	2880
gttggtgtatc tgattgatta taaaccgttt ttccacaaaa aggaaatcaa tcccttttgc	2940
gtaagcagat tttgtgataa tactgatcac atggctcctgt ctaatttagt cgatcctttt	3000
caatgctagc tggctccttt gcattctttc aatagctaaa catcaattca gcctctttta	3060
atgtcataaa gagtaattca tatcttttgc ag	3092

<210> 25
 <211> 2247
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 25	
gttcgttttt tcttcttagt gaatctcctt caatcaaagc catattttgg atgttgatat	60
gatgatctta tcatgaatca tgtttaattc agtgattaat tccgaaatta gtaatatagg	120
taatagggtt gatgattata atccattccg agattgattt gattgattga tggattgatt	180
gagctgcatt gttaattgat atgaagatct ctggattctg atcttcta atcgttcaattt	240
cgacctgttt tactcgattc gtctacaaat ttgcgtatgt gttttgtttc tggctgtgaa	300
tcaatgcact tgcgtatgaa attgttgat tctgtttaga tttccgtttc ttaataattt	360
atttgatttg aggatgatat attgaataat tgatattagt gcttcatttt gatctgctaa	420
accttgatga ttgtgataat ttatgtattc attctccttt tatttacaat gaaattgtta	480
aaaagggtctt ttgctgttaa tcaaataat gagagatcag gagaaagcaa atttgataaa	540
aaactcatgt atcagaatct atgaagccag tattatcaat gatttgctat gaatttggaa	600
aaagacaatt ccaaggaaag aaatgttttt ttttttttcc ttttagtttc aggatgacta	660
caaaaaatgt taactaagaa tagaaaagtt tacatgtttt ttgttgccat agaaagtatt	720
gaagatagct tgttttgttt ttcttctttg gtaagtgata ataaatgctt ctatgatcaa	780
tcacatatga aatttcccta aatttctttg aagtaaagtc atgaaatgta tgtcctaagt	840
caactggaac agggaaacgaa cggatcgatg ctccggcata tcgagttgta ctctgcgcac	900
gtttgattct ttagacgaat aagacaaacc tttgagtttg aaaataatgt agtttgtgct	960
cataatacag ctgaaagaga tgggtgttga atttagtagc ccataaaca ttttgaattt	1020
tagagctttg aatgctaccc tctagtgaat ttgtattcta gccatcatat ttataatttt	1080

gctgtaaatg aaccatcata cttgttaaaa tgcaagtgtt actaaaaatg taaaagatac	1140
cataatgtgc agatttaatt agaagtctga ttgagtaaca cagaatttaa tggttcttat	1200
atccatgtaa tcgtatgtta ccgttatgct gtgttagcta tactgtgtaa atatgtatag	1260
tttaggagct gtttctgtta ctggttgtct agttcatagt ctagtctagg tatatatattc	1320
gatttcgatt cagagatgaa tagagtttcc tctgaagaaa ccaaactgaa agggtagcct	1380
aaactcacia ccaatttctt gatcagattg atagcagact aggaagcatc atgattcatg	1440
catcaagtac atgaaatcca taatcagaaa caaagatgta aagagtagga tttagtgcct	1500
atttagaatt catatatatg attcatggac tgatgaagca gtaaaagtct aaaaaaggga	1560
tgctaaaatc aacctgaatt tttgtatgag aacttatgag aagatccatc accttgttca	1620
gagatctgaa tctgagctat agttcaatat ttatatccac atttataatg gaacaaacat	1680
agctattgat gtgttatgga agaacaatct ataccatctt ccaagtttta ctaaaatctc	1740
aacaaatcag tcgaattcaa ttgccaataa cttttgaacc ttcatgtaaa gatcaagttg	1800
ttcatcattt tgccttattg taaagaattt attacttaac tcgagccaga cttttgtggc	1860
attgatcatc gtttattggc ttatcttgat tataaactcg atgcttggtg gagattatat	1920
gtctttccgt taacaatcct gtcttttctt tttgttgtct cttacaccgt cttctcaa	1980
gctaaatgga tattccaaag catcagaaac aaatcccata tggttcaatg tctcttctga	2040
aattgctcca ttcttattgc ttagtttgat atagttaaaa aaacctcaat cttgctatgt	2100
tttagtatca tatatttgct gtcatttgca aatttacata aaacttagta tttgttattc	2160
agagaatatc tctctatgcc attagttgat cctagattac agtcttaatt tacagattgc	2220
ataaaatata taactgcat cttacag	2247

<210> 26
 <211> 1195
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 26	
attgattcag gttgaaagca agatgggagg aggaggggtg atgtctgcct ccgagaccaa	60
agctgaagaa aagaagaacc cactcgaccg agtcccttgt gcaaaacctc ctttcaccat	120
cagtgcacatc aagcaagcca ttccttccca ctgtttcaac cgttccctta tccgttcctt	180
ctcttacatt gtctatgacc ttgctatagc cttcgtcctc tactaccttg ccaccaccta	240
catccaccgt ctccaaccc ctttctccta tctagcgtgg ctggcttact ggatcgtcca	300
aggctgcgtg ctcaccggag cttgggtcgt agcccacgaa tgcggccacc atgcctttag	360
cgattatcaa tgggttgacg acaccgtggg cttcatagtc cactcctttt tactcgtccc	420
ctacttctcg tggaaatata gtcatcggcg ccaccactcg aacactgcat cgctcgagcg	480

cgatgaggtc tttgtcccaa agcccagatc aaaactccct tgggtactcga aataacttgaa 540
 caaccgcct ggccgcatca tcagcctgtt cgccactctc actctcggct ggcccttgta 600
 cttgtctttc aacgtctctg gaagacctac aaccgtttcg cctgccacta tgctcccaac 660
 agcccgattt acaaccatcg cgaacgcctc cagatttggc tctctgacgt ggggatcgtg 720
 gccatgtcgt tcatccttta ccgtggtgcg ctggtgaaag gcgtgagctg ggtggtctgt 780
 gtgtatggga taccgttggt gatcgtgaac gggttcctgg tgttgatcac gttccttcag 840
 catacgacc cttcgttgcc tcactacgac gggtcggaat gggactggct gagaggagcg 900
 ttggcgacgg tggaccgaga ctacggtgtg ctgaacaagg tgttcataa catcacggac 960
 acgcacgtgg tgcaccatct gttctcgaca atgccgcatt atcatgcgat ggaggcaacg 1020
 agggcggtga gggggttgct gggggagtat tatcagtttg acgagacccc gttttacgca 1080
 gcgatgtgga gaggggcaaa ggagtgtctg tttgtggagg cagatgaagg gaaaggaggt 1140
 gtgttttggt acaagaataa gtaaagttgt gatgtggtgt gcttagaatc actag 1195

<210> 27
 <211> 380
 <212> Белок
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 27

Met Gly Gly Gly Gly Cys Met Ser Ala Ser Glu Thr Lys Ala Glu Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Pro Leu Asp Arg Val Pro Cys Ala Lys Pro Pro Phe Thr
20 25 30

Ile Ser Asp Ile Lys Gln Ala Ile Pro Ser His Cys Phe Asn Arg Ser
35 40 45

Leu Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Ile Val Tyr Asp Leu Ala Ile Ala Phe
50 55 60

Val Phe Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Tyr Ile His Arg Leu Pro Thr Pro
65 70 75 80

Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Leu Ala Tyr Trp Ile Val Gln Gly Cys Val
85 90 95

Leu Thr Gly Ala Trp Val Val Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Val His Ser
115 120 125

Phe 130	Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	Phe 135	Ser	Trp	Lys	Tyr	Ser 140	His	Arg	Arg	His
His 145	Ser	Asn	Thr	Ala	Ser 150	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu 155	Val	Phe	Val	Pro	Lys 160
Pro	Arg	Ser	Lys	Leu 165	Pro	Trp	Tyr	Ser	Lys 170	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro 175	Pro
Gly	Arg	Ile	Ile 180	Ser	Leu	Phe	Ala	Thr 185	Leu	Thr	Leu	Gly	Trp 190	Pro	Leu
Tyr	Leu	Ser 195	Phe	Asn	Val	Ser	Gly 200	Arg	Pro	Tyr	Asp 205	Arg	Phe	Ala	Cys
His 210	Tyr	Ala	Pro	Asn	Ser 215	Pro	Ile	Tyr	Asn	His 220	Arg	Glu	Arg	Leu	Gln
Ile 225	Trp	Leu	Ser	Asp 230	Val	Gly	Ile	Val	Ala	Met 235	Ala	Phe	Val	Leu	Tyr 240
Arg	Val	Ala	Leu	Val 245	Lys	Gly	Val	Ser	Trp 250	Val	Val	Cys	Val	Tyr 255	Gly
Ile	Pro	Leu	Leu 260	Ile	Val	Asn	Gly	Phe 265	Leu	Val	Leu	Ile	Thr 270	Phe	Leu
Gln	His 275	Thr	His	Pro	Ser	Leu 280	Pro	His	Tyr	Asp	Gly 285	Ser	Glu	Trp	Asp
Trp 290	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala 295	Thr	Val	Asp	Arg	Asp 300	Tyr	Gly	Val	Leu
Asn 305	Lys	Val	Phe	His 310	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His 315	Val	Val	His	His	Leu 320
Phe	Ser	Thr	Met	Pro 325	His	Tyr	His	Ala	Met 330	Glu	Ala	Thr	Arg	Ala 335	Val
Lys	Gly	Leu	Leu 340	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Gln 345	Phe	Asp	Glu	Thr	Pro 350	Phe	Tyr
Ala	Ala	Met 355	Trp	Arg	Glu	Ala 360	Lys	Glu	Cys	Leu	Phe 365	Val	Glu	Ala	Asp
Glu	Gly 370	Lys	Gly	Gly	Val 375	Phe	Trp	Tyr	Lys	Asn 380	Lys				

<210> 28
<211> 383
<212> Бѣлок
<213> Carthamus tinctorius

<400> 28

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Ser Asn Pro Ser Glu Gly Glu Lys Lys
1 5 10 15

Thr Glu Leu Glu Gly Ile Gln Arg Val Pro Tyr Gln Lys Pro Pro Phe
20 25 30

Thr Val Gly Asp Val Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Asn Arg
35 40 45

Ser Val Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp Leu Thr Ile Ala
50 55 60

Ser Ile Leu Tyr Tyr Ile Ala Thr Thr Phe Ile Pro Leu Leu Pro His
65 70 75 80

Pro Leu Ala Tyr Val Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys
85 90 95

Val Met Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala
100 105 110

Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His
115 120 125

Ser Val Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg
130 135 140

His His Ser Asn Thr Gly Ser Ile Glu His Asp Glu Val Phe Val Pro
145 150 155 160

Lys Leu Lys Ser Gly Val Arg Ser Thr Ala Lys Tyr Leu Asn Asn Pro
165 170 175

Pro Gly Arg Ile Leu Thr Leu Leu Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro
180 185 190

Leu Tyr Leu Met Phe Asn Val Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Arg Phe Ala
195 200 205

Cys His Phe Asp Pro Asn Ser Pro Ile Tyr Ser Asn Arg Glu Arg Ala
210 215 220

Gln Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Phe Ala Val Leu Tyr Gly Leu

225		230		235		240
Tyr	Arg	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr
			245			250
						255
Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Val
			260			265
						270
Leu	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser
		275				280
						285
Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu
		290				295
						300
Leu	Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn
305					310	
						315
						320
Leu	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His
				325		
						330
						335
Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Asp
			340			
						345
						350
Phe	Lys	Ala	Met	Tyr	Arg	Glu
		355				360
						365
Asp	Glu	Glu	Val	Lys	Asp	Gly
		370				375
						380
<210>	29					
<211>	381					
<212>	Белок					
<213>	Carthamus tinctorius					
<400>	29					
Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Met
1				5		
						10
						15
Pro	His	Ala	Phe	Lys	Arg	Val
			20			
						25
						30
Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ala	Val
		35				
						40
						45
Val	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu
						55
						60
Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Ala	Thr
65						70
						75
						80

Thr	Tyr	Val	Ala	Trp	Pro	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe	Gln	Gly	Ala	Tyr	Leu	85	90	95	
Met	Gly	Leu	Trp	Val	Ile	Gly	His	Glu	Cys	Gly	His	His	Gly	Phe	Ser	100	105	110	
Glu	Tyr	Gln	Trp	Leu	Asp	Asp	Thr	Val	Gly	Phe	Ile	Val	His	Ser	Leu	115	120	125	
Ile	Leu	Thr	Pro	Tyr	Phe	Gly	Phe	Lys	Tyr	Ser	His	Arg	Thr	His	His	130	135	140	
Ala	Asn	Thr	Asn	Ser	Ile	Glu	Tyr	Asp	Glu	Val	Trp	Ile	Pro	Lys	Arg	145	150	155	160
Lys	Ser	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ile	Leu	Asn	Asn	Pro	Leu	Gly	Ser	165	170	175	
Phe	Val	Val	Phe	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Tyr	Phe	180	185	190	
Val	Phe	Asn	Leu	Tyr	Gly	Arg	Lys	Tyr	Glu	Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	His	195	200	205	
Phe	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ile	Phe	Asn	Asp	Ser	Glu	Arg	Phe	Gln	Ile	210	215	220	
Phe	Leu	Thr	Asp	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Val	Tyr	Arg	225	230	235	240
Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Thr	Glu	Trp	Val	Ile	Asn	Phe	Tyr	Gly	Met	245	250	255	
Pro	Ile	Leu	Phe	Met	Ser	Gly	Phe	Phe	Ile	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	His	260	265	270	
His	Thr	His	Pro	Ser	Ile	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Thr	Glu	Trp	Asp	Trp	275	280	285	
Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Phe	Gly	Phe	Leu	Asn	290	295	300	
His	Ala	Phe	His	Asp	Val	Thr	Arg	Thr	His	Ala	Val	His	His	Leu	Phe	305	310	315	320
Pro	Thr	Ile	Pro	His	Tyr	His	Thr	Phe	Glu	Ala	Arg	Gln	Ala	Val	Met	325	330	335	

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

Ala Val Trp Arg Glu Thr Lys Asp Cys Ile Phe Ile Glu Pro Glu Glu
355 360 365

Val Asn Gly Glu Lys Lys Gly Ile Tyr Trp Phe Tyr Lys
370 375 380

<210> 30
<211> 380
<212> Белок
<213> Carthamus tinctorius

<400> 30

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

His Ala Phe Lys Arg Val Pro Val Ser Lys Pro Pro Phe Glu Leu Ser
20 25 30

Asp Leu Lys Lys Ala Val Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser Leu Val
35 40 45

Arg Ser Phe Ala Ala Leu Phe Arg Asp Ile Ile Ile Val Ser Ala Leu
50 55 60

Tyr Tyr Leu Ala Ala Thr Val Ile Pro Val Leu Pro Lys Pro Leu Thr
65 70 75 80

Tyr Val Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Phe Phe Gln Gly Ala Tyr Leu Met
85 90 95

Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Gly Phe Ser Glu
100 105 110

Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Val His Ser Leu Ile
115 120 125

Leu Thr Pro Tyr Phe Gly Phe Lys Tyr Ser His Arg Thr His His Ala
130 135 140

Asn Thr Asn Ser Ile Glu Tyr Asp Glu Val Trp Ile Pro Lys Arg Lys
145 150 155 160

Ser Asp Lys Leu Tyr Ser Glu Ile Leu Asn Asn Pro Leu Gly Ser Phe
165 170 175

Val Val Phe Val Phe Lys Ile Val Leu Gly Phe Pro Leu Tyr Phe Val
180 185 190

Phe Asn Leu Tyr Gly Arg Lys Tyr Glu Lys Gly Ile Thr Ser His Phe
195 200 205

Tyr Pro Tyr Ser Pro Ile Phe Asn Asp Ser Glu Arg Phe Gln Ile Phe
210 215 220

Leu Thr Asp Leu Gly Val Phe Gly Thr Leu Tyr Gly Val Tyr Arg Leu
225 230 235 240

Ala Leu Ile Lys Gly Thr Glu Trp Val Ile Asn Phe Tyr Gly Met Pro
245 250 255

Ile Leu Phe Met Ser Gly Phe Phe Ile Leu Leu Thr Tyr Leu His His
260 265 270

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

Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asn Phe Gly Phe Leu Asn His
290 295 300

Ala Phe His Asp Val Thr Arg Thr His Ala Val His His Leu Phe Pro
305 310 315 320

Thr Ile Pro His Tyr His Thr Phe Glu Ala Arg Gln Ala Val Met Pro
325 330 335

Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Lys Tyr Asp Asp Thr Pro Ile Leu Glu Ala
340 345 350

Val Trp Arg Glu Thr Lys Asp Cys Ile Phe Ile Glu Pro Glu Glu Val
355 360 365

Asn Gly Glu Lys Lys Gly Ile Tyr Trp Phe Tyr Lys
370 375 380

<210> 31
<211> 375
<212> Бeлoк
<213> Carthamus tinctorius

<400> 31

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Asn Asp Asp Ala Thr Arg Glu Arg Asp
1 5 10 15

Val	Phe	Lys	His	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Pro	Ser	Phe	Gly	Ile	Ala	Asp	
			20				25						30			
Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Pro	His	Cys	Phe	Lys	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	
			35				40				45					
Ser	Phe	Tyr	Tyr	Arg	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Leu	Ile	Tyr	Ala	Phe	Tyr	
			50				55				60					
Tyr	Ile	Ala	Thr	Lys	Tyr	Ile	Thr	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Tyr	Ser	Phe	
65				70				75				80				
Val	Ala	Trp	Pro	Leu	Tyr	Trp	Ile	Ala	Gln	Gly	Ala	Ile	Cys	Met	Gly	
			85				90				95					
Leu	Trp	Asn	Ile	Val	His	Asp	Cys	Gly	His	His	Cys	Phe	Ser	Asp	Tyr	
			100				105				110					
Gln	Trp	Leu	Asp	Asp	Thr	Ile	Gly	Phe	Ile	Cys	His	Ser	Phe	Leu	Leu	
			115				120				125					
Thr	Pro	Tyr	Phe	Ser	Phe	Lys	Tyr	Ser	His	Arg	Thr	His	His	Ala	Asn	
			130				135				140					
Thr	Ser	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Trp	Val	Pro	Lys	Arg	Lys	His	
145				150				155				160				
Asp	Thr	Trp	Phe	Tyr	Glu	Val	Leu	Ser	Asn	Pro	Val	Gly	Ser	Phe	Ile	
			165				170				175					
Met	Leu	Val	Phe	Arg	Leu	Phe	Phe	Gly	Phe	Pro	Leu	Tyr	Phe	Met	Phe	
			180				185				190					
Asn	Leu	His	Gly	Arg	Ile	Tyr	Lys	Gly	Phe	Pro	Ser	His	Phe	Asn	Pro	
			195				200				205					
Leu	Gly	Pro	Ile	Phe	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Ala	Asn	Ile	Trp	Leu	Ser	
			210				215				220					
Asp	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Val	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ala	
225				230				235				240				
Lys	Glu	Gly	Leu	Gln	Trp	Val	Leu	Phe	Val	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Met	
			245				250				255					
Ala	Met	Ser	Ala	Phe	Phe	Ile	Met	Phe	Thr	Tyr	Leu	His	His	Thr	His	
			260				265				270					

Pro Ser Ile Ala His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly
 275 280 285

Ala Leu Ser Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu Asn Asn Ile Phe
 290 295 300

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

Pro His Tyr Asn Thr Val Glu Ala Thr Gln Tyr Ile Lys Pro Ile Leu
 325 330 335

Gly Glu Tyr Tyr Asn Tyr Asp Tyr Thr Pro Ile Leu Lys Ala Ile Trp
 340 345 350

Arg Asp Thr Lys Glu Cys Leu Phe Ile Glu Glu Asp Pro Glu Lys Lys
 355 360 365

Gly Val Tyr Trp Phe His Lys
 370 375

<210> 32
 <211> 376
 <212> Белок
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 32

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Asn Asp Ala Thr Thr Asp Lys Asp Val
 1 5 10 15

Leu Lys Arg Val Pro Thr Ala Lys Thr Pro Phe Glu Ile Ser Asp Leu
 20 25 30

Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser Leu Thr Thr Ser
 35 40 45

Phe Tyr Tyr Leu Phe Arg Asp Ile Cys Ile Cys Tyr Thr Trp Tyr His
 50 55 60

Leu Gly Ser Asn Tyr Leu Pro Leu Leu Pro Lys Pro Leu Ala Tyr Ile
 65 70 75 80

Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Phe Cys Gln Gly Ser Ser Phe Met Gly Ile
 85 90 95

Trp Ser Ile Gly His Asp Leu Gly His His Ala Phe Ser Glu Tyr Gln
 100 105 110

Trp Leu Asp Asp Ala Leu Gly Phe Val Ile His Ser Ala Phe Leu Thr

	115					120					125				
Pro	Tyr 130	Phe	Ser	Phe	Lys	Tyr 135	Ser	His	Arg	Ser	His 140	His	Ala	His	Thr
Asn 145	Ser	Met	Glu	Tyr	Asp 150	Glu	Val	Trp	Ile	Pro 155	Lys	Arg	Lys	Ala	Asp 160
Thr	Met	Tyr	Ser	Glu 165	Val	Leu	Asn	Asn	Pro 170	Leu	Gly	Asn	Leu	Phe 175	Met
Thr	Val	Val	Arg 180	Leu	Leu	Phe	Ser	Phe 185	Pro	Met	Tyr	Phe	Thr 190	Phe	Asn
Ile	His	Gly 195	Arg	Pro	Tyr	Asn	Gly 200	Phe	Val	Ser	His	Phe 205	Tyr	Pro	Gln
Ser	Pro 210	Met	Phe	Asn	Asp	Ser 215	Glu	Arg	Lys	Leu	Val 220	Trp	Leu	Ser	Asp
Ala 225	Gly	Met	Val	Ala	Ala 230	Phe	Tyr	Gly	Leu	Tyr 235	Lys	Ile	Ala	Gln	Ser 240
Thr	Ser	Ala	Thr	Trp 245	Leu	Phe	Cys	Ile	Tyr 250	Gly	Ala	Pro	Leu	Leu 255	Val
Met	Asn	Ala	His 260	Phe	Ile	Phe	Phe	Thr 265	Phe	Leu	His	His	Ser 270	His	Val
Ser	Leu	Ala 275	His	Tyr	Asp	Ser	Arg 280	Glu	Trp	Asp	Trp	Ile 285	Arg	Gly	Ala
Leu	Ser 290	Thr	Val	Asp	Arg	Asn 295	Tyr	Gly	Ile	Leu	Asn 300	Thr	Val	Phe	His
Asp 305	Val	Thr	Cys	Ala	His 310	Val	Val	His	His	Leu 315	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro 320
His	Tyr	His	Thr	Val 325	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala 330	Val	Lys	Pro	Ile	Leu 335	Gly
Asp	Tyr	Tyr	Lys 340	Tyr	Asp	Asp	Thr	Pro 345	Ile	Leu	Lys	Ala	Phe 350	Trp	Arg
Glu	Thr	Lys 355	Asn	Cys	Ile	Tyr	Val 360	Glu	Pro	Asp	Glu	Gly 365	Ala	Glu	Asp
Ser	Gly	Val	Tyr	Trp	Phe	Arg	Arg								

370

375

<210> 33

<211> 372

<212> Белок

<213> *Carthamus tinctorius*

<400> 33

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Lys Thr Glu Glu Lys Asp Ile Met Lys
 1 5 10 15

His Val Pro Val Ala Lys Pro Pro Phe Gly Ile Ser Asp Leu Lys Lys
 20 25 30

Ala Thr Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser Leu Ile Trp Ser Phe Gly
 35 40 45

Ser Phe Phe Arg Asp Leu Ile Val Ile Tyr Ser Phe Tyr Tyr Leu Ala
 50 55 60

Ser Thr Phe Ile Pro Leu Leu Pro Pro Ala Leu Ser Tyr Val Ala Trp
 65 70 75 80

Pro Leu Tyr Trp Phe Ala Gln Gly Ser Ile Leu Met Gly Phe Trp Ile
 85 90 95

Leu Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Glu Tyr Gln Trp Val
 100 105 110

Asp Asp Ala Val Gly Phe Phe Ile His Ser Val Cys Leu Thr Pro Tyr
 115 120 125

Phe Ser Phe Lys Tyr Ser His Arg Ser His His Ala His Thr Asn Ser
 130 135 140

Ile Glu Tyr Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Arg Lys Ala Asp Thr Phe
 145 150 155 160

Tyr Ser Glu Phe Leu Asn Asn Gly Pro Gly Asn Val Phe Thr Leu Leu
 165 170 175

Leu Arg Thr Thr Leu Gly Leu Pro Leu Tyr Leu Ile Phe Asn Thr Tyr
 180 185 190

Gly Arg Asp Tyr Asn Gly Phe Ala Asn His Phe Leu Pro Gln Ser Gly
 195 200 205

Ile Phe Asn Asp Ser Glu Arg Ala Gln Val Val Leu Ser Asp Val Gly
 210 215 220

Ile Phe Ala Val Leu Tyr Ala Leu Tyr Arg Leu Val Leu Ile Gln Gly
225 230 235 240

Leu Lys Ser Thr Ile Phe Leu Gln Gly Ile Pro Leu Phe Val Met Ser
245 250 255

Gly Phe Phe Ile Phe Leu Thr Tyr Leu Asn His Thr His Pro Ala Ile
260 265 270

Ala His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ser
275 280 285

Thr Ile Asp Arg Asp Phe Gly Ile Leu Asn Arg Val Phe His Asn Ala
290 295 300

Asn His Thr His Gly Ile His His Leu Phe Pro Thr Ile Pro His Tyr
305 310 315 320

His Ala Ile Glu Ala Arg Glu Ala Val Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr
325 330 335

Tyr Met Tyr Asp Asp Thr Pro Ile Leu Lys Ala Met Trp Arg Asp Thr
340 345 350

Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp Asp Glu Lys Lys Gly Val Tyr
355 360 365

Trp Tyr Phe Lys
370

<210> 34
<211> 382
<212> Бeлoк
<213> Carthamus tinctorius

<400> 34

Met Gly Ser Gly Gly Arg Ala Thr Glu Arg Ser Asn Pro Glu Ser Glu
1 5 10 15

Val Val Val Lys Arg Ala Pro Ser Ser Lys Pro Pro Phe Thr Leu Gly
20 25 30

Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Glu Arg Ser Leu Ile
35 40 45

Arg Ser Ser Ser Tyr Leu Phe Leu Asp Leu Phe Leu Ser Ser Leu Phe
50 55 60

Tyr Tyr Val Ala Ala Val Tyr Ile Pro Arg Leu Pro Ile Ser Leu Ser
65 70 75 80

Tyr Val Ala Trp Pro Val Tyr Trp Ile Leu Gln Gly Ser Val Gln Met
85 90 95

Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His Gln Ala Phe Ser Asp
100 105 110

Tyr Pro Trp Phe Asn Asp Thr Ile Gly Tyr Leu Leu His Thr Gly Met
115 120 125

Leu Ala Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His His Ser
130 135 140

Asn Thr Gly Ser Leu Glu Leu Asp Glu Ser Phe Val Pro Lys Lys Lys
145 150 155 160

Ser Ser Leu Asn Ser Val Ala Arg Leu Leu Asn Thr Pro Pro Gly Arg
165 170 175

Leu Phe Arg Leu Thr Ile Leu Cys Thr Val Gly Trp Leu Leu Tyr Ile
180 185 190

Cys Phe Asn Val Ser Gly Arg Lys Tyr Glu Lys Phe Ala Asn His Phe
195 200 205

Asp Pro Lys Ser Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Phe Gln Ile Leu
210 215 220

Leu Thr Asp Ile Gly Leu Leu Val Thr Ser Tyr Gly Leu Tyr Lys Leu
225 230 235 240

Ala Leu Ala Gln Gly Phe Ala Trp Leu Ile Thr Ile Tyr Phe Ala Pro
245 250 255

Leu Val Ile Val Tyr Gly Phe Leu Val Val Ile Thr Trp Leu His His
260 265 270

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

Arg Gly Ala Leu Ser Thr Met Asp Arg Asp Tyr Gly Val Phe Asn Thr
290 295 300

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

Thr Ile Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile Lys Pro
325 330 335

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

Met Trp Arg Glu Ala Thr Glu Cys Phe Phe Val Glu Ala Asp Glu Gly
355 360 365

Glu Gly Lys Ser Lys Gly Val Tyr Trp Phe Asn Asn Lys Met
370 375 380

<210> 35

<211> 387

<212> Бeлoк

<213> *Carthamus tinctorius*

<400> 35

Met Gly Ala Gly Gly Arg Ser Asn Pro Arg Asp Leu Asp Val Lys Lys
1 5 10 15

Phe Asp Thr Val Glu Gly Ile Lys Arg Ala Pro Thr Ser Lys Pro Pro
20 25 30

Phe Thr Leu Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys
35 40 45

Arg Ser Leu Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Val Tyr Asp Leu Thr Ala
50 55 60

Val Ser Ile Phe Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Tyr Ile Pro Gln Leu Pro
65 70 75 80

Tyr Pro Leu Ala Tyr Val Ala Trp Pro Val Tyr Trp Phe Val Gln Gly
85 90 95

Cys Val Phe Met Gly Leu Trp Leu Ile Ala His Glu Cys Gly His His
100 105 110

Ala Phe Ser Asp His Val Trp Leu Glu Asp Ser Ile Gly Phe Val Leu
115 120 125

His Ser Cys Leu Leu Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Arg
130 135 140

Arg His His Ala Asn Thr Gly Ser Leu Glu His Asp Glu Val Tyr Val
145 150 155 160

Pro Lys Thr Lys Ala Lys Leu Gly Ala Ser Ala Phe Tyr Leu Asp Asn
165 170 175

Pro Ile Gly Arg Thr Leu Thr Leu Met Val Lys Leu Thr Leu Gly Trp
180 185 190

Tyr Ile Tyr Leu Ala Ile Asn Ala Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Lys Phe
195 200 205

Ala Ser His Tyr Asp Pro Arg Ser Glu Met Phe Ser Asp Asn Glu Arg
210 215 220

Val Leu Ile Leu Met Ser Asp Ile Gly Leu Leu Ser Phe Ser Phe Leu
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Val Ala Met Val Gln Gly Phe Ala Trp Val Phe Cys Val
245 250 255

Tyr Gly Gly Ala Leu Met Val Met Asn Ala Phe Leu Val Thr Ile Thr
260 265 270

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

Trp Asn Trp Met Lys Gly Ala Phe Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly
290 295 300

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

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

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

Pro Phe Phe Val Ala Leu Trp Arg Glu Ser Lys Ser Cys Leu Phe Ile
355 360 365

Glu Pro Asp Glu Ser Asp Glu Lys Asn Lys Gly Ile Tyr Trp Tyr Arg
370 375 380

Ser Lys Tyr
385

<210> 36
<211> 380
<212> Бeлoк
<213> Carthamus tinctorius

<400> 36

Met Gly Gly Gly Gly Cys Ile Pro Ala Ser Lys Thr Glu Ala Gln Gln
1 5 10 15

Thr Asn His Leu Ser Arg Val Pro Tyr Glu Lys Pro Ala Phe Thr Val
20 25 30

Gly Asp Ile Lys Arg Val Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu
35 40 45

Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Leu Ala Ile Ala Phe Leu
50 55 60

Ser Tyr His Leu Ala Thr Thr Tyr Phe His Arg Leu Ser Pro Pro Leu
65 70 75 80

Ser Tyr Leu Ala Trp Ser Ala Tyr Trp Ile Val Gln Gly Cys Val Leu
85 90 95

Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser
100 105 110

Asp His Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser Ala
115 120 125

Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Cys Ser His Arg Arg His His
130 135 140

Leu Asn Thr Ala Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys Pro
145 150 155 160

Lys Ser Lys Ile Pro Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro Gly
165 170 175

Arg Leu Ile Ile Val Phe Thr Thr Leu Val Leu Gly Trp Pro Leu Tyr
180 185 190

Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Arg Phe Ala Cys His
195 200 205

Tyr Ala Pro Asn Ser Pro Ile Phe Thr Asn Arg Glu Arg Leu Gln Ile
210 215 220

Trp Ile Ser Asp Ala Gly Ile Ile Ala Val Ser Tyr Leu Leu Tyr Arg
225 230 235 240

Met Ala Leu Ala Lys Ser Val Ala Trp Val Val Cys Ile Tyr Gly Val

	245		250		255										
Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Met	Ile	Thr	Tyr	Leu	Gln
			260					265					270		
His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	Asp	Asp	Ser	Glu	Trp	Asp	Trp
		275					280					285			
Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Leu	Leu	Asn
	290					295					300				
Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His	Val	Val	His	His	Leu	Phe
305					310					315					320
Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Val	Glu
				325					330					335	
Pro	Val	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Phe	Asp	Asp	Thr	Pro	Phe	Tyr	Val
			340					345					350		
Ala	Met	Trp	Arg	Glu	Ala	Lys	Glu	Cys	Leu	Tyr	Val	Glu	Thr	Asp	Glu
		355					360					365			
Lys	Lys	Gly	Gly	Val	Phe	Trp	Tyr	Lys	Asn	Lys	Tyr				
	370					375					380				
<210>	37														
<211>	379														
<212>	Белок														
<213>	Carthamus tinctorius														
<400>	37														
Met	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Met	Ser	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Thr	Asp
1				5					10					15	
Ile	Leu	Lys	Arg	Val	Pro	Ile	Asp	Pro	Pro	Phe	Thr	Leu	Ser	Asp	Leu
			20					25					30		
Lys	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Ser	Leu	Ile	Arg	Ser
		35					40					45			
Ser	Tyr	Tyr	Val	Val	His	Asp	Leu	Val	Val	Ala	Tyr	Val	Phe	Tyr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile	Pro	Gln	Leu	Pro	Thr	Pro	Leu	Ala	Tyr	Leu
65					70					75					80
Ala	Trp	Pro	Ile	Tyr	Trp	Phe	Cys	Gln	Ala	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Leu
			85						90					95	

Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Glu Gln Gln
 100 105 110

Trp Ile Gly Asp Ile Val Gly Ile Val Leu His Ser Ala Leu Phe Thr
 115 120 125

Pro Tyr Phe Ala Trp Lys Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr
 130 135 140

Asn Ser Leu Asp Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Arg Lys Ser Lys
 145 150 155 160

Val Ala Ile Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe
 165 170 175

Thr Leu Val Phe Arg Leu Thr Leu Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Thr
 180 185 190

Asn Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Gly Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro
 195 200 205

Met Ser Pro Ile Phe Thr Glu Arg Glu Arg Ile Gln Val Leu Val Ser
 210 215 220

Asp Leu Gly Ile Leu Ala Val Leu Tyr Ala Ile Lys Leu Ala Val Ala
 225 230 235 240

Ala Lys Gly Ala Ala Trp Val Ile Ala Met Tyr Gly Ile Pro Val Val
 245 250 255

Gly Val His Val Phe Phe Val Leu Ile Thr Tyr Leu His His Thr His
 260 265 270

Leu Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asp Trp Ile Arg Gly
 275 280 285

Ala Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Arg Val Phe
 290 295 300

His Asp Val Thr His Thr His Val Leu His His Leu Ile Ser Tyr Ile
 305 310 315 320

Pro His Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Ile Leu
 325 330 335

Gly Glu Tyr Tyr Lys Ile Asp Arg Thr Pro Ile Phe Lys Ala Met Trp
 340 345 350

Arg Glu Ala Lys Glu Ser Ile Tyr Ile Glu Pro Asp Glu Asn Ser Glu
355 360 365

His Lys Gly Thr Tyr Trp Tyr His Lys Glu Leu
370 375

<210> 38

<211> 244

<212> Белок

<213> Carthamus tinctorius

<400> 38

Met Gly Gly Gly Gly Cys Met Ser Ala Ser Glu Thr Lys Ala Glu Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Pro Leu Asp Arg Val Pro Cys Ala Lys Pro Pro Phe Thr
20 25 30

Ile Ser Asp Ile Lys Gln Ala Ile Pro Ser His Cys Phe Asn Arg Ser
35 40 45

Leu Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Ile Val Tyr Asp Leu Ala Ile Ala Phe
50 55 60

Val Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Thr Tyr Ile His Arg Leu Pro Thr Pro
65 70 75 80

Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Leu Ala Tyr Trp Ile Val Gln Gly Cys Val
85 90 95

Leu Thr Gly Ala Trp Val Val Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Val 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 Ala Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
145 150 155 160

Pro Arg Ser Lys Leu Pro Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro
165 170 175

Gly Arg Ile Ile Ser Leu Phe Ala Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu
180 185 190

Tyr Leu Ser Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Thr Thr Val Ser Pro Ala
195 200 205

Thr Met Leu Pro Thr Ala Arg Phe Thr Thr Ile Ala Asn Ala Ser Arg
210 215 220

Phe Gly Ser Leu Thr Trp Gly Ser Trp Pro Cys Arg Ser Ser Phe Thr
225 230 235 240

Val Leu Arg Trp

<210> 39
<211> 501
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 39
tcaatggggc cggttacatc tcaacgcac aagtccgcga ccactaactc tgtcactgtc 60
gcacgggtgt cagacggtct tgtggggcga gcaatctcaa ctactctgt tgcttctaga 120
cggttatacg ttgaagctgg acatgatcct gcagagatca ttggagacta gagtgcggcc 180
catgatcaag accgacgata agtctacgtg acatgtcttt tcaatatattt ccaccccggt 240
gacggattgc agcatgatcc ttgctgaaat cacaagtggc tacttgctctg cagactaaca 300
atggatgatg ctggattgga aaacaaagcg gcctgacatg ctgctgatc tagaatcctt 360
ttggtctaag aagaattgtg cttgatgggc ttgtattccg ccaaaccctt tctattatat 420
cccatgaaat atgggctgat cgaactggat cgtagagac agctaataatg tcatttgcaa 480
gaaactgccc ttaatcaagt a 501

<210> 40
<211> 672
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 40
gcgctattac gtcagacgtc taggccggtg agactgcccc taggtgggac tatatcttgt 60
aaaacgacgc ccagtcctgc gcgctgaagc tccggcaaca aaggtaaact ggctggagat 120
taaagtgcac tgagccgagg agtccgctat tccgagcctg tttagaagtg actacttaac 180
agaactacat tcggtagtta agagtttctt gaccatgggtg gatactgctg ctactgcttc 240
gctgtttccg gtttcttcta cacaatcgga ctctgggtgt aagaactccg gtaagcatgg 300
aggtgggctg ggaagtgtgg atgtgcgcgg gattaagaca aaatcttctg ggagtttgca 360
agttaagaca catgcgagc ccccgcaaa ggtgaatggt tctagaatag gtgtcatgga 420
tggcctcaag atggatgata attcgtcgtc ggctgccccg aggactttta tcaaccaatt 480

gcctgattgg agcatgcttc ttgctgccat cactgactatt ttcttggctg ctgagaagca	540
atggatgatg ctagagtgga agactaagcg gccggacatg ctttcggaaa tggatccttt	600
tggtttaggg agaattgtgg aggatagttt catatttcgt caaaactttt ctattaggtc	660
gtatgaaata gg	672

<210> 41
 <211> 1671
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 41	
gcacgaggct ggccctcctc cttctctctc tctcttcttt cagcttcctt gcctgctaaa	60
attccactaa acaaatacaa aaggaatcca aattcaacat tcttcccaa tcgcacgcct	120
tagggatata tgctgttctt tggatcatctt tgaacaatta ttataattt ggtgagcacg	180
tctgaaacca ataggtttga ctgataaaca tacgggttaa tctgaatact ttaatcatgg	240
ttgctacggc tgctactgca tcaactgtttc cggtttcttc tccacaacct cactctggga	300
ccaagaaatc tggtaagctt ggaggtgtgc cagatggcgt tgatgtgcgt ggaatcaaga	360
caaatctgt tacttctggc ggtttgcaag ttaaggctgc acaggctcct gcagaggtaa	420
atgggactag agtgccggcc atgatcaaga cagacgataa ttctacgtca catgtccaa	480
gaacctttat caaccagttg ccgatttga gcatgttctt tgctgcaatc accacaatct	540
tcttggctgc agagaaacaa tggatgatgc tggattggaa aaccaagcgg cctgacatgc	600
ttgctgatct ggatcctttt ggtttaggga gaattgtgca ggatgggctt gtattccgtc	660
aaaacttctc tattagatcc tatgaaatag gggctgatcg aactgcgtcg atagagacgc	720
taatgaatca ttgacaggaa actgccctta atcatgtaaa gactgcggga ctcttgggtg	780
atggccttgg ctcaacacct gaaatgtgca agaagaatct attctgggtg gtgacaaaga	840
tgacagtgat ggtagaccgt tatccaactt ggggtgatgt tgttcaagta gatacatggg	900
tagctcgatc tgggaaaaac ggcatgcgcc gtgattggct gcttcgtgat tgcaaacacg	960
gcgaggtcgt aacaagagct tcaagtaatt gggttatgat gaataaagag acaaggaggt	1020
tatcaaaaat tccagatgaa gtccgagctg aaatagaaca gtactttgta gatgcacctc	1080
cggctcgtga tgatgacagc agaaaattgc ctaaaacttga agacaccact gctgactatg	1140
ttcgcaatgg tttaactcca aggtggagtg atctggatgt caaccaacat gttaacaatg	1200
tgaagtatat tggttggatc cttgagagtg ctccacaaca agttgtggag aagtatgagc	1260
ttgctggctt gactctggaa taccgtcgag aatgtaggaa ggatagcgtg ctgagtcgct	1320
gacatcggta ttgggtggca atggatgatg aatagctgat tccgattcca gtgatgttga	1380
ttgccagcat gtgctgctat ttgagagtgg tggatgaagg gaggttgtga aaggaaggac	1440
tgcatggcga ccaaaaaaag ataaggatgg aattagaagc agcattgctg acttctttgc	1500

tggaaatgga aatggaaatg gaagtgccta ataccatggt tcatgttttg cccttttgcc	1560
tcattttcaat gtgtataaaa gaatcatcat cactcatcct atttatgctg gctcttggaa	1620
ataacttgca atgtcctgcc cccacatata tacatatattt tctattttgt a	1671

<210> 42
 <211> 458
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 42	
atggtggata ctgctgctac tgcttcgctg tttccggttt cttctacaca atcggactct	60
ggtgctaaga actccggtaa gcatggaggt gggctgggaa gtgtggatgt gcgcgggatt	120
aagacaaaat cttctgggag ttgcaagtt aagacacatg cgcaggcccc cgcaaagggtg	180
aatggttcta gaataggtgt catggatggc ctcaagatgg atgataattc gtcgtcggct	240
gccccgagga cttttatcaa ccaattgcct gattggagca tgcttcttgc tgccatcacg	300
actattttct tggctgctga gaagcaatgg atgatgctag agtggaagac taagcggcgcg	360
gacatgcttt cggaatgga tccttttggg ttagggagaa ttgtggagga tagtttcata	420
tttcgtcaaa acttttctat taggtcgtat gaaatagg	458

<210> 43
 <211> 1086
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 43	
atggttgcta cggctgctac tgcactactg tttccggttt cttctccaca acctactct	60
gggaccaaga aatctggtaa gcttgaggt gtgccagatg gcgttgatgt gcgtggaatc	120
aagacaaaat ctgttacttc tggcggtttg caagttaagg ctgcacaggc tcctgcagag	180
gtaaattggga ctagagtgcg gcccatgatc aagacagacg ataattctac gtcacatgtc	240
ccaagaacct ttatcaacca gttgccgat tggagcatgc ttcttgctgc aatcaccaca	300
atcttcttgg ctgcagagaa acaatggatg atgctggatt ggaaaaccaa gcggcctgac	360
atgcttgctg atctggatcc ttttggttta gggagaattg tgcaggatgg gcttgtattc	420
cgtcaaaact tctctattag atcctatgaa ataggggctg atcgaactgc gtcgatagag	480
acgctaata atcatttgca ggaaactgcc cttaatcatg taaagactgc gggactcttg	540
ggtgatggct ttggctcaac acctgaaatg tgcaagaaga atctattctg ggtggtgaca	600
aagatgcagg tgatggtaga ccgttatcca acttggggtg atgttggtca agtagataca	660
tgggtagctc gatctgggaa aaacggcatg cgccgtgatt ggctgcttcg tgattgcaaa	720
acaggcgagg tcgtaacaag agcttcaagt aattgggtta tgatgaataa agagacaagg	780
aggttatcaa aaattccaga tgaagtccga gctgaaatag aacagtactt tgtagatgca	840

cctccggtcg tggatgatga cagcagaaaa ttgcctaaac ttgaagacac cactgctgac	900
tatgttcgca atggtttaac tccaaggtgg agtgatctgg atgtcaacca acatgttaac	960
aatgtgaagt atattggttg gacacctgag agtgctccac aacaagttgt ggagaagtat	1020
gagcttgctg gcttgactct ggaataccgt cgagaatgta ggaaggatag cgtgctgagt	1080
cgctga	1086

<210> 44
 <211> 152
 <212> Белок
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 44

Met Val Asp Thr Ala Ala Thr Ala Ser Leu Phe Pro Val Ser Ser Thr
1 5 10 15

Gln Ser Asp Ser Gly Ala Lys Asn Ser Gly Lys His Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Gly Ser Val Asp Val Arg Gly Ile Lys Thr Lys Ser Ser Gly Ser Leu
35 40 45

Gln Val Lys Thr His Ala Gln Ala Pro Ala Lys Val Asn Gly Ser Arg
50 55 60

Ile Gly Val Met Asp Gly Leu Lys Met Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala
65 70 75 80

Ala Pro Arg Thr Phe Ile Asn Gln Leu Pro Asp Trp Ser Met Leu Leu
85 90 95

Ala Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala Glu Lys Gln Trp Met Met
100 105 110

Leu Glu Trp Lys Thr Lys Arg Pro Asp Met Leu Ser Glu Met Asp Pro
115 120 125

Phe Gly Leu Gly Arg Ile Val Glu Asp Ser Phe Ile Phe Arg Gln Asn
130 135 140

Phe Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile
145 150

<210> 45
 <211> 361
 <212> Белок
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 45

Met Val Ala Thr Ala Ala Thr Ala Ser Leu Phe Pro Val Ser Ser Pro
1 5 10 15

Gln Pro His Ser Gly Thr Lys Lys Ser Gly Lys Leu Gly Gly Val Pro
20 25 30

Asp Gly Val Asp Val Arg Gly Ile Lys Thr Lys Ser Val Thr Ser Gly
35 40 45

Gly Leu Gln Val Lys Ala Ala Gln Ala Pro Ala Glu Val Asn Gly Thr
50 55 60

Arg Val Arg Pro Met Ile Lys Thr Asp Asp Asn Ser Thr Ser His Val
65 70 75 80

Pro Arg Thr Phe Ile Asn Gln Leu Pro Asp Trp Ser Met Leu Leu Ala
85 90 95

Ala Ile Thr Thr Ile Phe Leu Ala Ala Glu Lys Gln Trp Met Met Leu
100 105 110

Asp Trp Lys Thr Lys Arg Pro Asp Met Leu Ala Asp Leu Asp Pro Phe
115 120 125

Gly Leu Gly Arg Ile Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Gln Asn Phe
130 135 140

Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu
145 150 155 160

Thr Leu Met Asn His Leu Gln Glu Thr Ala Leu Asn His Val Lys Thr
165 170 175

Ala Gly Leu Leu Gly Asp Gly Phe Gly Ser Thr Pro Glu Met Cys Lys
180 185 190

Lys Asn Leu Phe Trp Val Val Thr Lys Met Gln Val Met Val Asp Arg
195 200 205

Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Val Val Gln Val Asp Thr Trp Val Ala Arg
210 215 220

Ser Gly Lys Asn Gly Met Arg Arg Asp Trp Leu Leu Arg Asp Cys Lys
225 230 235 240

Thr Gly Glu Val Val Thr Arg Ala Ser Ser Asn Trp Val Met Met Asn
245 250 255

Lys Glu Thr Arg Arg Leu Ser Lys Ile Pro Asp Glu Val Arg Ala Glu
260 265 270

Ile Glu Gln Tyr Phe Val Asp Ala Pro Pro Val Val Asp Asp Asp Ser
275 280 285

Arg Lys Leu Pro Lys Leu Glu Asp Thr Thr Ala Asp Tyr Val Arg Asn
290 295 300

Gly Leu Thr Pro Arg Trp Ser Asp Leu Asp Val Asn Gln His Val Asn
305 310 315 320

Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser Ala Pro Gln Gln Val
325 330 335

Val Glu Lys Tyr Glu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu
340 345 350

Cys Arg Lys Asp Ser Val Leu Ser Arg
355 360

<210> 46
<211> 1545
<212> ДНК
<213> Carthamus tinctorius

<400> 46
cgggggatcca acaacaaaca gattctatcc ttggattgac agaattggag gaagggggtt 60
acttattatc gtaaacccta ctgaatctct ctacaggggt ttgctgaatt tgctcctttt 120
cttctccttc caatggcttg cagactcgca gattctagtt tccttttgaa ggggtcccaa 180
caaaagccat tgcattggga tagatttggg tcaactctatc cagcaggcac atcttttttg 240
aagtgggata ttctacctaa atgtagaacc aaacatcaaa catatgtagt tcctttgaga 300
aggactaaaa tagtacaagc agtgactagt tctgttacag caccattacc atcagacagt 360
gcagaagaga ggaaagaatt atgtgaaagt tacgggtttcc ggcaaattgg agaaccactc 420
ccggacaata tcaccttgaa gaacattatc gatactcttc ccaaaactgt gtttgagatt 480
gataacgtga aagcattgaa gtcgggtattg atatctgcaa cttcatatgc tttggggcct 540
ttcatgattg ccaaattctc atggtatctt cttccattgg cttgggcatg gacaggaact 600
gcagttacag ggttctttgt aataggtcat gattgtgcac acaaactctt ctcaaagaac 660
aaactgggtg aagatattgt tggaactttg gccttcctgc cattgatata cccttatgag 720
ccatggcggt tcaagcatga tcgacatcat gcaaaaacaa acatggttga tgaagataca 780
gcttggcacc ctgtaatgga aacacatttc aaggagaacc caattttcca gaaggcaatc 840

atattcggat atggctctat tcgccccatc atgtctatat cgcactgggtt aatctggcat	900
ttcaatttga ataaattcag accgaatgaa attggaagag taaagatcag tcttgcttgt	960
gtttttgcat tcatggcaat tggatggccg ttaattgtct acaaggccgg gatagttgga	1020
tggataaagt tttggttaat gccatgggtt ggctatcatt tttggatgag cactttcaca	1080
atggttcacc acacagcacc tcacgtacct ttcaaatttt cggacgagtg gaatgcagct	1140
aaggcacaac ttagtggcac cgtgcactgt gattatcctc gctggataga gatcctttgt	1200
catgatatca acgttcatat cccccaccat gtctcctcaa agattccaag ttacaacttg	1260
cgtgcagctc ataaatctct tcaagagaat tggggaaaat atatgaatga ggcctcatgg	1320
aactggcgct taatgaagac gatcttgacg atttgccatg tctacgacaa agagcgtaat	1380
tacatctcgt ttgaagagat tgctcccgag atatcccagc ccaatcgcat tacttagaag	1440
ggtaatgcc gactatgctt aactcaatca tttgtttttt tattttacata tttcattaat	1500
tgtaaatgct atatattttc ctttatatac aaaaaagtt acacc	1545

<210> 47
 <211> 1305
 <212> ДНК
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 47	
atggcttgca gactcgaga ttctagtttc cttttgaagg gtccccaaca aaagccattg	60
catgggtata gatttgggtc actctatcca gcaggcacat cttttttgaa gtgggatatt	120
ctacctaaat gtagaaccaa acatcaaaca tatgtagttc ctttgagaag gactaaaata	180
gtacaagcag tgactagttc tgttacagca ccattaccat cagacagtgc agaagagagg	240
aaagaattat gtgaaagtta cggtttccgg caaattggag aaccactccc ggacaatatc	300
accttgaaga acattatcga tactcttccc aaaactgtgt ttgagattga taacgtgaaa	360
gcattgaagt cggatttgat atctgcaact tcatatgctt tggggctttt catgattgcc	420
aaatctccat ggtatcttct tccattggct tgggcatgga caggaactgc agttacaggg	480
ttctttgtaa taggtcatga ttgtgcacac aaatcttctt caaagaacaa actggtggaa	540
gatattgttg gaactttggc cttcctgcc a ttgatatacc cttatgagcc atggcgtttc	600
aagcatgata gacatcatgc aaaaacaaac atgttggatg aagatacagc ttggcacccct	660
gtaatggaaa cacatttcaa ggagaacca attttccaga aggcaatcat attcggatat	720
ggtcctattc gccccatcat gtctatatcg cactgggttaa tctggcattt caatttgaat	780
aaattcagac cgaatgaaat tggaagagta aagatcagtc ttgcttgtgt ttttgcattc	840
atggcaattg gatggccgtt aattgtctac aaggccggga tagttggatg gataaagttt	900
tggttaatgc catggttggg ctatcatttt tggatgagca ctttcacaat ggttcaccac	960
acagcacctc acgtaccttt caaattttcg gacgagtgga atgcagctaa ggcacaactt	1020

agtggcaccg tgcactgtga ttatcctcgc tggatagaga tcctttgtca tgatatcaac	1080
gttcatatcc cccaccatgt ctccctcaaag attccaagtt acaacttgcg tgcagctcat	1140
aaatctcttc aagagaattg gggaaaatat atgaatgagg cctcatggaa ctggcgctta	1200
atgaagacga tcttgacgat ttgccatgtc tacgacaaag agcgtaatta catctcgttt	1260
gaagagattg ctcccagat atcccagccc aatcgcatta cttag	1305

<210> 48
 <211> 434
 <212> Бeлoк
 <213> Carthamus tinctorius

<400> 48

Met	Ala	Cys	Arg	Leu	Ala	Asp	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Gly	Pro	Gln
1				5					10					15	

Gln	Lys	Pro	Leu	His	Gly	Tyr	Arg	Phe	Gly	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gly
			20					25					30		

Thr	Ser	Phe	Leu	Lys	Trp	Asp	Ile	Leu	Pro	Lys	Cys	Arg	Thr	Lys	His
		35					40					45			

Gln	Thr	Tyr	Val	Val	Pro	Leu	Arg	Arg	Thr	Lys	Ile	Val	Gln	Ala	Val
	50					55					60				

Thr	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Glu	Glu	Arg
65					70					75					80

Lys	Glu	Leu	Cys	Glu	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Gln	Ile	Gly	Glu	Pro	Leu
				85					90					95	

Pro	Asp	Asn	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Lys	Thr
			100					105					110		

Val	Phe	Glu	Ile	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Ile	Ser
		115					120					125			

Ala	Thr	Ser	Tyr	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Met	Ile	Ala	Lys	Ser	Pro	Trp
	130					135					140				

Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Trp	Ala	Trp	Thr	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Gly
145					150					155					160

Phe	Phe	Val	Ile	Gly	His	Asp	Cys	Ala	His	Lys	Ser	Phe	Ser	Lys	Asn
				165					170					175	

Lys Leu Val Glu Asp Ile Val Gly Thr Leu Ala Phe Leu Pro Leu Ile

[illegible]

<210> 49
<211> 756
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Векторная конструкция для РНК-интерференции

<400> 49

taccaatggc tgcacgacac tgtcggcctt atcctacatt ctgttcttct tgttccttac	60
ttctcgtgga aatacagcca ccgccgccac cactccaaca ccggctcgat tgagcacgac	120
gaggctcttcg tcccgaaaact caaatccggg gtccgggtcca ccgcaaaata cctaacaac	180
ccccccggcc ggatcttgac ccttcttgtc accctcacc cgggctggcc gttgtacctc	240
atgttcaacg tctccggccg ctactacgac cgctttgcct gccatcttga cccaaacagc	300
cccatctact cgaaccgtga acgtgccag atcttcatct ccgacgccgg gatcttcgcc	360
gtcctctacg ggctctaccg gctcgcggcg gtcaaagggc tcgtgtgggt cctgaccgtc	420
tatgccggac cgttgctcgt ggtcaacggg tttcttgctc tgatcacgtt cctccagcac	480
accacccgt cgttgccga ctacgactca accgagtggg actggctccg tggggccctg	540
gccaccatcg accgtgacta cgggatttta aacaagggtg tccacaacat caccgacacc	600
cacgtgacc accatctgtt ttcgacgat ccgcattatc acgcgatgga ggccacgaag	660
gcgataattc cgatcctcgg ggattattat cagttcgatg ggacgtcagt ttttaaggcg	720
atgtataggg agacgaagga gtgcatttat gtggat	756

<210> 50
<211> 300
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Векторная конструкция для РНК-интерференции

<400> 50

ctttatcaac cagttgccgg attggagcat gcttcttgct gcaatcacca caatcttctt	60
ggctgcagag aaacaatgga tgatgctgga ttggaaaacc aagcggcctg acatgcttgc	120
tgatctggat ctttttggtt tagggagaat tgtgcaggat gggcttgat tccgtcaaaa	180
cttctctatt agatcctatg aaataggggc tgatcgaact gcgtcgatag agacgcta	240
gaatcatttg caggaaactg cccttaatca tgtaaagact gcgggactct tgggtgatgg	300

<210> 51
<211> 290
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Векторная конструкция для РНК-интерференции

<400> 51

ccaaaactgt gtttgagatt gataacgtga aagcattgaa gtcggtattg atatctgcaa	60
cttcatatgc tttggggctt ttcatgattg ccaaattctcc atgggtatctt cttccattgg	120
cttgggcatg gacaggaact gcagttacag ggttctttgt aatagggtcat gattgtgcac	180
acaaatcttt ctcaaagaac aaactgggtg aagatattgt tggaactttg gccttcctgc	240
cattgatata cccttatgag ccattggcgtt tcaagcatga tcgacatcat	290

<210> 52

<211> 1200

<212> ДНК

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 52

tatgtagaac taaagactaa gggacagaga gttcgtctaa acaggtgaat ctagtcgttg	60
ttatctaata aacaattcag ccccaaatgc agaacacaca tagagctctc tattgattca	120
aattacgatc tgatactgat aacgtctaga tttttagggg taaagcaatc aatcacctga	180
cgattcaagg tggttggatc atgacgattc cagaaaacat caagcaagct ctcaaagcta	240
cactcttttg gatcatactg aactctaaca acctcggtat gtcccgtagt gccagtacag	300
acatcctcgt aactcggatt gtgcacgatg ccattggctat acccaacctc ggtcttggtc	360
acaccaggaa ctctctggta agctagctcc actccccaga aacaaccgcc gccaaattgc	420
gcgaattgct gacctgaaga cggaacatca tcgtcgggtc cttgggcatg tgcggcggaa	480
gatgggtcag cttgggcttg aggacgagac ccgaatccga gtctgttgaa aagggtgttc	540
attggggatt tgtatacgga gattggctgt cgagagggtt gagggaaagg acaaatgggt	600
ttggctctgg agaaagagag tgcggcttta gagagagaat tgagagggtt agagagagat	660
gcggcggcga tgagcggagg agagacgacg aggacctgca ttatcaaagc agtgacgtgg	720
tgaaatttg aacttttaag aggcagatag atttattatt tgtatccatt ttcttcattg	780
ttctagaatg tcgcggaaca aatttttaaaa ctaaattcta aatttttcta attttggtgc	840
caatagtgga tatgtgggcc gtatagaagg aatctattga aggcccaaac ccatactgac	900
gagcccaaag gttcgttttg cgttttatgt ttcgggtcga tgccaacgcc acattctgag	960
ctaggcaaaa aacaaacgtg tctttgaata gactcctctc gttaacacat gcagcggctg	1020
catggtgacg ccattaacac gtggcctaca attgcatgat gtctccattg acacgtgact	1080
tctcgtctcc tttcttaata tatctaaca acactcctac ctcttccaaa atatatacac	1140
atctttttga tcaatctctc attcaaaatc tcattctctc tagtaaaca gaacaaaaa	1200

<210> 53

<211> 2033

<212> ДНК
<213> Linum usitatissimum

<400> 53
ctcaagcata cggacaaggg taaataacat agtcaccaga acataataaa caaaaagtgc 60
agaagcaaga ctaaaaaaat tagctatgga cattcagggt catattggaa acatcattat 120
cctagtcttg tgaccatcct tcctcctgct ctagttgaga ggccttgga ctaacgagag 180
gtcagttggg atagcagatc cttatcctgg actagccttt ctggtgtttc agagtcttcg 240
tgccgccgtc tacatctatc tccattaggt ctgaagatga ctcttcacac caacgacgtt 300
taaggtctct atcctactcc tagcttgcaa tacctggctt gcaataacctg gagcatcgtg 360
cacgatgatt ggatactgtg gaggaggagt gtttgctgat ttagagctcc cggttgggtg 420
atttgacttc gatttcagtt taggcttggt gaaatttttc aggttccatt gtgaagcctt 480
tagagcttga gcttccttcc atgttaatgc cttgatcgaa tactcctaga gaaaaggga 540
gtcgatctct gagtattgaa atcgaagtgc acattttttt tcaacgtgtc caatcaatcc 600
acaaacaaag cagaagacag gtaatctttc atacttatac tgacaagtaa tagtcttacc 660
gtcatgcata ataacgtctc gttccttcaa gaggggtttt ccgacatcca taacgaccgg 720
aagcctcatg aaagcattag ggaagaactt ttggttcttc ttgtcatggc ctttataggt 780
gtcagccgag ctgcgaatt cccgtccgac tggctccgca aaatattcga acggcaagtt 840
atggacttgc aaccataact ccacggtatt gagcaggacc tattgtgaag actcatctca 900
tgagacttca gaatgtggtt gtcagcaaac caatgaccga aatccatcac atgacggacg 960
tccagtgggt gagcgaaacg aaacaggaag cgcctatctt tcagagtcgt gagctccaca 1020
ccggattccg gcaactacgt gttgggcagg cttcgccgta ttagagatat gttgaggcag 1080
accatctgt gccactcgta caattacgag agttgttttt tttgtgattt tcctagtttc 1140
tcgttgatgg tgagctcata ttctacatcg tatggtctct caacgtcgtt tcctgtcatc 1200
tgatatcccg tcatttgcac ccacgtgcgc cgctcccggt gccaaagccc taggtgtcat 1260
gcacgcaaaa ttggtggtgg tgccgggctgc cctgtgcttc ttaccgatgg gtggagggtg 1320
agtttggggg tctccgcggc gatggtagtg ggttgacggt ttggtgtggg ttgacggcat 1380
tgatcaattt acttcttgct tcaaattctt tggcagaaaa caattcatta gattagaact 1440
ggaaaccaga gtgatgagac ggattaagtc agattccaac agagttacat ctcttaagaa 1500
ataatgtaac ccctttagac tttatatatt tgcaattaaa aaaataattt aacttttaga 1560
ctttatatat agttttaata actaagttta accactctat tatttatatc gaaactattt 1620
gtatgtctcc cctctaaata aacttggtat tgtgtttaca gaacctataa tcaaataatc 1680
aatactcaac tgaagtttgt gcagttaatt gaagggatta acggccaaaa tgcactagta 1740
ttatcaaccg aatagattca cactagatgg ccatttccat caatatcatc gccgttcttc 1800

ttctgtccac atatcccctc tgaaacttga gagacacctg cacttcattg tccttattac	1860
gtgttacaaa atgaaaccca tgcattccatg caaactgaag aatggcgcaa gaacccttcc	1920
cctccatttc ttatgtggcg accatccatt tcaccatctc ccgctataaa acacccccat	1980
cacttcacct agaacatcat cactacttgc ttatccatcc aaaagatacc cac	2033

<210> 54
 <211> 253
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Сигнал полиаденилирования Nos

<400> 54	
gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg	60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc	120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct	240
atgttactag atc	253

<210> 55
 <211> 708
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Сигнал полиаденилирования Ocs

<400> 55	
ctgctttaat gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tttttgcttt caattctgtt	60
gtgcacgttg taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcggttc	120
attctaataga atatatcacc cgttactatc gtattttttat gaataatatt ctccgttcaa	180
tttactgatt gtaccctact acttatatgt acaatattaa aatgaaaaca atatattgtg	240
ctgaataggt ttatagcgac atctatgata gagcgccaca ataacaaaca attgcgtttt	300
attattacaa atccaatttt aaaaaaagcg gcagaaccgg tcaaacctaa aagactgatt	360
acataaatct tattcaaatt tcaaaaggcc ccaggggcta gtatctacga cacaccgagc	420
ggcgaactaa taacgttcac tgaagggaac tccggttccc cgccggcgcg catgggtgag	480
attccttgaa gttgagtatt ggccgtccgc tctaccgaaa gttacgggca ccattcaacc	540
cgggtccagca cggcgcccg gtaaccgact tgctgccccg agaattatgc agcatttttt	600
tggtgtatgt gggcccaaaa tgaagtgcag gtcaaacctt gacagtgcg acaaatcggt	660
gggcgggtcc agggcgaatt ttgcgacaac atgtcgaggc tcagcagg	708

<210> 56

<211>	50	
<212>	ДНК	
<213>	Carthamus tinctorius	
<400>	56	
	tgtctttcaa cgtctccgga agaccctatg accgtttcgc ctgccactac	50
<210>	57	
<211>	49	
<212>	ДНК	
<213>	Carthamus tinctorius	
<400>	57	
	tgtctttcaa cgtctctgga agacctacaa ccgtttcgc tgccactat	49
<210>	58	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	58	
	cttcagcag taccaatggc tcgac	25
<210>	59	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	59	
	ggtttcatcg tccactcctt ga	22
<210>	60	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	60	
	cttcagcag taccaatggc tcgac	25
<210>	61	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	61	
	ggtttcatcg tccactcctt ga	22

<210>	62	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	62	
	atgacaccat tggcttcacg tgcca	25
<210>	63	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	63	
	ctttctgctc actccatact tc	22
<210>	64	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	64	
	agcgaatac agtggcttga cgaag	25
<210>	65	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	65	
	actccgcttt cctcactccg tac	23
<210>	66	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	66	
	catgaatgtg gtcacatgac cttag	26
<210>	67	
<211>	22	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	67	
	cttcttcatc cattcggttt gc	22
<210>	68	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	68	
	cgtggttgaa tgacaccatt ggttac	26
<210>	69	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	69	
	accttctaca caccggtatg cct	23
<210>	70	
<211>	27	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	70	
	catggaagat aagccaccgt cgacatc	27
<210>	71	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	71	
	aacacgggtt cgcttgagca cga	23
<210>	72	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 72	
tgcatacccg caagcaaaac cg	22
<210> 73	
<211> 22	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид	
<400> 73	
ccatctctcg agagttcctt ac	22
<210> 74	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид	
<400> 74	
atgtgggtcac catgccttta gtgag	25
<210> 75	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид	
<400> 75	
tggaatggtc ctccattccg ctc	23
<210> 76	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид	
<400> 76	
асстаасгас агтсатгаас ааг	23
<210> 77	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> олигонуклеотид	
<400> 77	
gtgaggaaag cggagtggac аас	23

<210>	78	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	78	
	tgaaagcaag atgggaggag g	21
<210>	79	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	79	
	tcacaacttt acttattctt gt	22
<210>	80	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	80	
	attgaacaat gggtagcaggc	20
<210>	81	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	81	
	catcatcttc aaatcttatt c	21
<210>	82	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	82	
	aatcagcagc agcacaagc	19
<210>	83	
<211>	23	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	83	
	сааасатасс ассааатгсг асг	23
<210>	84	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	84	
	сгсггтаасс агсстсаааа сггг	24
<210>	85	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	85	
	гсгггггггггг сааатагггг гг	22
<210>	86	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	86	
	атсасгггаа гстсааагса тсг	23
<210>	87	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	87	
	гггггггггг таааатсгг г	21
<210>	88	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 88
tgaagacggtt aagatgggag ctg 23

<210> 89
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 89
gtaggttatg taacaatcgt g 21

<210> 90
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 90
cagatccaac acttcassac sag 23

<210> 91
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 91
agatctaaaag aatttcctatg gtg 23

<210> 92
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 92
ctgctctcta cgaастааа ttcac 25

<210> 93
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 93
tctatctaат gagtatcaag гаас 24

<210>	94	
<211>	26	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	94	
	ctgaattcac acccacagat agctag	26
<210>	95	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	95	
	acatcccttc ttagctttaa cta	23
<210>	96	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	96	
	acttcgcsct ctgttatctg g	21
<210>	97	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	97	
	ccatacacat acatcctaca cgat	24
<210>	98	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	98	
	actcacaata acttcatctc tctc	24
<210>	99	
<211>	23	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	99	
	ctactagcca tacaatgtct tcs	23
<210>	100	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	100	
	gagattttca gagagcaagc gctt	24
<210>	101	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	101	
	ctttggtctc ggaggsagac ata	23
<210>	102	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	102	
	caaaaaggagt ttcagaaagc ctcc	24
<210>	103	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	103	
	actcgttgga tgccttcgag ttc	23
<210>	104	
<211>	19	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 104 aatcagcagc agcacaagc	19
<210> 105 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 105 aaggcggtga caattatgat atc	23
<210> 106 <211> 24 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 106 ctcagtaacc agcstcaaaa cttg	24
<210> 107 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 107 aaggcggaga cgattatgat atc	23
<210> 108 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 108 atcacagga gtcxaaagca tct	23
<210> 109 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 109 atcatctctt cggtaggtta tg	22

<210>	110	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	110	
	cagatccaac acttcassac sag	23
<210>	111	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	111	
	ctaaagaatt tccatggtgt tac	23
<210>	112	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	112	
	acttcgcsct ctgttatctg g	21
<210>	113	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	113	
	gagagacggt ggaagtaggt g	21
<210>	114	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	114	
	ctcacaataa cttcatctct ctc	23
<210>	115	
<211>	24	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	115	
	aaagacatag gsaасаасга gatc	24
<210>	116	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	116	
	gtgtatgtct gcstccgaga	20
<210>	117	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	117	
	gsaaggtagt agaggасгаа g	21
<210>	118	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	118	
	gcstccaaaг attcattсag gtc	23
<210>	119	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	119	
	саagatggat gсgatggтаа gg	22
<210>	120	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 120 acgtggcggt ctcaggtt	18
<210> 121 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 121 aggcgtgac aattatgata tc	22
<210> 122 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 122 aaggcaggcc gtgatgccga t	21
<210> 123 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 123 agtatttgat caatccgctg g	21
<210> 124 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 124 caatacggta gaggccasac ag	22
<210> 125 <211> 22 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 125 atcatctctt cggtaggtta tg	22

<210>	126	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	126	
	gacatgtgct cacgtggtgc at	22
<210>	127	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	127	
	gttgctaata tccacacsct a	21
<210>	128	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	128	
	cgaatcacac ccacgggatc	20
<210>	129	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	129	
	ctaaagaatt tccatggtgt tac	23
<210>	130	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	130	
	gagcaacgga gagaagtaac c	21
<210>	131	
<211>	22	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	131	
	gagggatgat agaaagaggt cc	22
<210>	132	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	132	
	catgtgtggc tggaggattc ga	22
<210>	133	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	133	
	gcaccgagtt tagcctttgt ct	22
<210>	134	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	134	
	ссаасаааса аассатстст сg	22
<210>	135	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	135	
	gagagacggt ggaagtaggt g	21
<210>	136	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 136
ccattgatcc acccttcacc tta 23

<210> 137
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 137
aaagacatag gsaacaasga gatc 24

<210> 138
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 138
ctgaactgca attatctagg 20

<210> 139
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 139
ggtattggta ttggatgggc g 21

<210> 140
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 140
ataaggctgt gttcacgggt tt 22

<210> 141
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 141
gctcagttgg ggatacaagg at 22

<210>	142	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	142	
	agttatgggtt cgatgatcga cg	22
<210>	143	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	143	
	ttgctataca tattgaaggc act	23
<210>	144	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	144	
	ctgaactgca attatctagg	20
<210>	145	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	145	
	ggtattggta ttggatgggc g	21
<210>	146	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	146	
	gtgtatgtct gcstccgaga	20
<210>	147	
<211>	21	
<212>	ДНК	

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	147	
	gsaaggtagt agaggасгаа g	21
<210>	148	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	148	
	agagatcatt ggagactага gtg	23
<210>	149	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	149	
	сccatсааgс асаattcttc ttag	24
<210>	150	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	150	
	сtасасаатс ggactctggт gct	23
<210>	151	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	
<400>	151	
	gccatccatg асacctattc та	22
<210>	152	
<211>	22	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	олигонуклеотид	

<400> 152 cctcactctg ggaccaagaa at	22
<210> 153 <211> 23 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 153 ttcttgggac atgtgacgta gaa	23
<210> 154 <211> 24 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 154 cattgaagtc ggtattgata tctg	24
<210> 155 <211> 24 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 155 cattgaagtc ggtattgata tctg	24
<210> 156 <211> 24 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 156 gttccaasaа tatcttccac cagt	24
<210> 157 <211> 30 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> олигонуклеотид	
<400> 157 cctgcaggta ccaatggctc gacgacactg	30

<210> 158
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> олигонуклеотид

<400> 158
cggcgcgcct tcacctcctc atctttatcc

30

<210> 159
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 159
His Glu Cys Gly His
1 5

<210> 160
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 160
His Asp Cys Gly His
1 5

<210> 161
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 161
His Asp Leu Gly His
1 5

<210> 162
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 162

His Arg Arg His His
1 5

<210> 163
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 163

His Arg Thr His His
1 5

<210> 164
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 164

His Arg Ser His His
1 5

<210> 165
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 165

His Arg Asn His His
1 5

<210> 166
<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 166

His Val Val His His
1 5

<210> 167
<211> 5
<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 167

His Val Thr His His
1 5

<210> 168

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 168

His Ala Val His His
1 5

<210> 169

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мотивы фермента CtFAD2

<400> 169

His Val Leu His His
1 5

<210> 170

<211> 1083

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Интроны в CtFAD-2-1-SU дикого типа

<400> 170

gtgcattctc tcattctcaa aacctttctg statcatct gatcaatgta ttcagttatg	60
gttcgatgat cgacgattat tgtttggtat tttaatttta atttttaggt tgatttagct	120
gcattgttgg tcgatgaata gatctgtgga ttacgggtctt ctgcagtttc agtttgattt	180
atttcagtcc gtttttctcc tgtaaatttg tgtatctatc tgtgttgcac gtaattttgt	240
ttcctttaga ttatagaaat gaaaatccat aattttaggg ctgcttgtct tgtttggtatt	300
tgtgttatta ggttttgatc acagtaactt ccgtacgttt aatatgttaa atgctaataa	360
aaatgattta ttttttatat ttatggcttc tcgggtggtcg gatttggtgt tttaattcct	420
gaagtttctg tataacaatga tttcgaattt tggcgattag gcattctctt actttggaag	480

gaatttcaga ttttcttaat ctcatagaga agtgctgatt gggaatttgc ttaaagatat	540
aagcactttt cagttcattg attgtttgat ggacatcaga tgggtttttt gctgatgcca	600
tgatgtctat tgtgttgaat gtatcttcaa taagtgcctt caatatgtat agcaaaactg	660
agctaaggct gtgtttggca aactacctga taagctatat gttgactgat aagctagttt	720
gtgaataaat tatgtttggc aaaaactagc atatgagtat gtaaaatgac taaaaaggg	780
atcttggggg ataatagtta atattgataa ggatagaatt ggagaaggct acaaaaagcc	840
cttgaaatgc tactccaact agtgtttcaa taagctggct tatgggtctat ccaaacatgt	900
actagattat catctagctt atttttgcc aacacagcct aaatgtttga tggctgatgg	960
ctggcacttg acaatttgac atcattataa ctgaaacaat aatattcacc ttacataac	1020
attcaccttt agccaaaaac tagatgttca cctacgaact gatccatatg gaacattttg	1080
cag	1083

<210> 171
 <211> 1144
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> интрон в CtFAD2 CtFAD2-1-ol

<400> 171	
gtgcattctc tcaaccttcc tgcttttcgt ctgatcaatg ttaatgtatt cagttatcgt	60
ttcgatgatt tcctattaaa tgtcgacgat tatcgtttgt tttttttat tttaggtaga	120
tttagctgca ttgttggttg atgaatagat ctgtagatta cggtcctctg cgctttcagt	180
ttttgattca tttcactccg ttttcttctg taaatttgtg tatctatctg tgctgcatgt	240
aattttgttt ctttagatt atagaaatga aaatccataa ttttagggct gcttctcttg	300
tttggaattg tgttattagg ttttaattac agtaacttcc gtacgtttaa tatgtcaaat	360
gctaaacaaa atgatttggt ttttatattt atggcttctc ggtggtcgga tttgtgtttt	420
taattcctga agtttctgta tacaatgatt tcgaattttg gcgattaggc atctctttac	480
tttggaagga tttctagatt ttctttgccg gattccttaa tcttatatag aaatgatgat	540
atcattgaca aatggcaatt gcttaaagat acaagcattt ttcagttcat tgaatgtttg	600
atggacatca aaatggattt tttgctgatg tctactgtgt tgaatgtacc ttcaataagg	660
ctgtgttcac gggtttggca tgctagctga tagctgataa gctagcttat gaataaatta	720
tgtttggtaa aaactagctt atgagtatgt aaaatgacaa aaaaggtacc tcggagtgtg	780
ataattaata ttaataaggg tataattgga agagcctact aaaagctcct agaacgctac	840
tccaactaac gtttcaataa gcttaactta tgggtccatcc aaacatgtac tagcttataa	900
gcgagcttat ttttgccaaa cacagccaaa gtactttcat ggttgatata cttgtatccc	960

caactgagct aaatgggtccg atggtcgacg agttgacatc attataatta tatatTTTTg	1020
aatccttaag gctaacgttt ccttagtttt tatttatgtt gtgatggtgg cattacataa	1080
tattcacctt tagctaaaaa ctagatgttc acctacgaac tgatccatat ggaacatttt	1140
gcag	1144

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липид, экстрагированный из масличного семени, при этом липид включает триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении липида составляет TAG,

iii) приблизительно 90% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 3,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота, и

v) липид характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,037, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,063.

2. Липид по пункту 1, который имеет одну или более или все из следующих особенностей,

a) приблизительно 90% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,3% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет пальмитиновая кислота,

c) приблизительно 0,1% - приблизительно 3%, или приблизительно 2% - приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют полиненасыщенные жирные

кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет линолевая кислота,

e) менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,5% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет α -линоленовая кислота (ALA),

f) приблизительно 0,5% - приблизительно 1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляет 18:1 Δ 11,

g) ODP для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,033 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01,

h) значение PLO для содержащего в виде жирных кислот липида составляет приблизительно 0,020 - приблизительно 0,063, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,055, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,050, или приблизительно 0,050 - приблизительно 0,055, или приблизительно 0,063, или приблизительно 0,055, или приблизительно 0,050, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020,

i) приблизительно 90% - приблизительно 96%, или приблизительно 92% - приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты,

j) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,02,

k) липид находится в форме очищенного масла, и

1) липид является негидрогенизированным.

3. Липид по пункту 2, причем PUFA является линолевая кислота.

4. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-3, причем α -линоленовая кислота является необнаруживаемой в жирнокислотном составе липида.

5. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-4, причем приблизительно 55% – приблизительно 80%, или приблизительно 60% – приблизительно 80%, или приблизительно 70% – приблизительно 80%, или по крайней мере приблизительно 60%, или по крайней мере приблизительно 70%, или приблизительно 60%, или приблизительно 70%, или приблизительно 80% от содержания TAG в липиде составляет триолеин.

6. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-5, причем менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 2%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 5% от содержания олеиновой кислоты в липиде находится в форме диацилглицеринов (DAG).

7. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-6, который находится в форме масла, причем по крайней мере 90%, или по крайней мере 95%, по крайней мере приблизительно 98%, или приблизительно 95% – приблизительно 98% в весовом отношении масла составляет липид.

8. Липид по пункту 7, причем масличным семенем является нефотосинтезирующее масличное семя, предпочтительно семя сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клещевины обыкновенной.

9. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-8, который, кроме того, включает один или более стеролов.

10. Липид по пункту 9, который находится в форме масла, и который включает менее чем приблизительно 5 мг стеролов/г масла, или приблизительно 1,5 мг стеролов/г масла – приблизительно 5 мг стеролов/г масла.

11. Липид по пункту 10, который включает одно или более или все из

а) приблизительно 1,5% – приблизительно 4,5%, или

приблизительно 2,3% - приблизительно 4,5% от общего содержания стеролов составляет эргост-7-ен-3 β -ол,

b) приблизительно 0,5% - приблизительно 3%, или приблизительно 1,5% - приблизительно 3% от общего содержания стеролов составляет тритерпеновый спирт,

c) приблизительно 8,9% - приблизительно 20% от общего содержания стеролов составляет Δ 7-стигмастерол/стигмаст-7-ен-3 β -ол, и

d) приблизительно 1,7% - приблизительно 6,1% от общего содержания стеролов составляет Δ 7-авенастерол.

12. Липид в соответствии с любым из пунктов 1-11, который имеет объем, составляющий по крайней мере 1 литр, и/или вес, составляющий по крайней мере 1 кг, и/или который экстрагирован из масличного семени, полученного от выращенных в поле растений.

13. Композиция, включающая первый компонент, который является липидом в соответствии с любым из пунктов 1-12, и второй компонент, предпочтительно в случаях, когда композиция получена посредством смешивания липида со вторым компонентом.

14. Композиция по пункту 13, причем вторым компонентом является не являющееся липидом вещество, такое как фермент, небелковый катализатор или химическое вещество, или один или более ингредиентов пищи.

15. Способ получения масла, включающий

i) получение масличного семени, которое включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует масличное семя, которое включает, масло, причем содержащим в виде масла масличного семени является липид, определенный в любом из пунктов 1-12, и

ii) экстрагирование масла из масличного семени для того, чтобы получить масло.

16. Способ по пункту 15, причем масличное семя включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена Δ 12-десатуразы (FAD2) в развивающемся масличном

семени по сравнению с соответствующим масличным семенем, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени.

17. Способ получения масла, включающий

i) получение семени сафлора, содержащее в виде масла которого включает, и/или которое способно породить растение, которое образует масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

a) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

b) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности семени составляет TAG,

c) приблизительно 75% – приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

d) менее чем приблизительно 5,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота, и

e) содержащее в виде масла семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,17, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,26, и

ii) экстрагирование масла из семени сафлора для того, чтобы получить масло,

причем семя сафлора включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся семени сафлора по сравнению с соответствующим семенем сафлора, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией

полинуклеотида в развивающемся семени сафлора.

18. Способ по пункту 16 или 17, причем масличное семя или семя сафлора включает второй экзогенный полинуклеотид, который кодирует вторую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пальмитоил-АСР-тиоэстеразы (FATB) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует второй экзогенный полинуклеотид, и причем второй экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

19. Способ в соответствии с любым из пунктов 16-18, причем масличное семя или семя сафлора включает третий экзогенный полинуклеотид, который кодирует третью вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пластидной десатуразы ω6 жирных кислот (FAD6) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует третий экзогенный полинуклеотид, и причем третий экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

20. Способ в соответствии с любым из пунктов 17-19, причем

1) ген FAD2 представляет собой один или более из гена CtFAD2-1, гена CtFAD2-2 и гена CtFAD2-10, и/или

2) ген FATB представляет собой ген CtFATB-3, и/или

3) ген FAD6 представляет собой ген CtFAD6.

21. Способ в соответствии с любым из пунктов 17-20, причем содержащее в виде масла семя сафлора имеет одну или более или все из следующих особенностей,

а) приблизительно 80% – приблизительно 94%, или приблизительно 85% – приблизительно 94%, или приблизительно 90% – приблизительно 94%, или приблизительно 91% – приблизительно 94%, или приблизительно 91% – приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении

от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота,

c) приблизительно 0,1% – приблизительно 15%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 10%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 7,5%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 5%, или приблизительно 0,1% – приблизительно 3%, или приблизительно 2% – приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляют полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет линолевая кислота (LA),

e) приблизительно 80% – приблизительно 96%, или приблизительно 90% – приблизительно 96%, или приблизительно 92% – приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты,

f) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющим менее чем приблизительно 0,05, или менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 – приблизительно 0,05, или приблизительно 0,005 – приблизительно 0,02,

g) ODP для содержимого в виде масла семени составляет

приблизительно 0,17 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,15 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,1 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,075 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,050 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01, и

h) значение PLO для содержащего в виде масла семени составляет приблизительно 0,20 - приблизительно 0,026, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,2, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,15, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,1, или приблизительно 0,020 и приблизительно 0,075, или приблизительно 0,050 и приблизительно 0,055, или составляет приблизительно 0,05, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020.

22. Способ в соответствии с любым из пунктов 17-21, причем маслом является липид, который, кроме того, характеризуется одной или более особенностями, описанных в пунктах 3-7 или 9-11.

23. Способ в соответствии с любым из пунктов 16-22, причем стадия экстракции масла включает раздавливание масличного семени или семени сафлора.

24. Способ в соответствии с любым из пунктов 16-23, который, кроме того, включает стадию очистки масла, экстрагированного из масличного семени или семени сафлора, причем стадия очистки включает одно или более или все из группы, состоящей из: рафинирования гидратацией, дезодорации, обесцвечивания, сушки и/или фракционирования экстрагированного масла, и/или удаления по крайней мере некоторых, предпочтительно по существу всех, восков и/или восковых эфиров из экстрагированного масла.

25. Масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует масличное семя, содержащее в виде масла которого включает, триацилглицерины (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности масличного семени составляет TAG,

iii) приблизительно 90% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла масличного семени составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 3,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла масличного семени составляет пальмитиновая кислота, и

v) содержимое в виде масла масличного семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,037, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,063.

26. Масличное семя по пункту 25, которым является нефотосинтезирующее масличное семя, предпочтительно семя сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клещевины обыкновенной.

27. Масличное семя по пункту 25 или пункту 26, которое включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся масличном семени по сравнению с соответствующим масличным семенем, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем первый экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени.

28. Семя сафлора, содержимое в виде масла которого включает, и/или которое способно порождать растение, которое образует семя, содержимое в виде масла которого включает, триацилглицерина (TAG), которые состоят из жирных кислот, этерифицированных до глицерина, и причем

i) жирные кислоты включают пальмитиновую кислоту и олеиновую кислоту,

ii) по крайней мере 95% в весовом отношении от масличности

семени составляет TAG,

iii) приблизительно 75% - приблизительно 95% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

iv) менее чем приблизительно 5,1% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота, и

v) содержимое в виде масла семени характеризуется долей десатурации олеиновой кислоты (ODP), составляющей менее чем приблизительно 0,17, и/или значением отношения пальмитиновая кислота + линолевая кислота/олеиновую кислоту (PLO), составляющим менее чем приблизительно 0,26, и

причем семя сафлора включает первый экзогенный полинуклеотид, который кодирует первую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена $\Delta 12$ -десатуразы (FAD2) в развивающемся семени сафлора по сравнению с соответствующим семенем сафлора, в котором отсутствует экзогенный полинуклеотид, и причем первый экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся семени сафлора.

29. Семя сафлора по пункту 28, причем содержимое в виде масла семени имеет одну или более из следующих особенностей,

a) приблизительно 80% - приблизительно 94%, или приблизительно 85% - приблизительно 94%, или приблизительно 90% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 94%, или приблизительно 91% - приблизительно 92%, или приблизительно 92%, или приблизительно 93% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет олеиновая кислота,

b) менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,75%, или менее чем приблизительно 2,5%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,75%, или приблизительно 2,5% в весовом отношении от общего содержания

жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет пальмитиновая кислота,

с) приблизительно 0,1% - приблизительно 15%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 10%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 7,5%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 5%, или приблизительно 0,1% - приблизительно 3%, или приблизительно 2% - приблизительно 3%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляют полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA),

d) менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2,5%, или менее чем приблизительно 2,25%, или приблизительно 3%, или приблизительно 2,5%, или приблизительно 2,25% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в содержимом в виде масла семени составляет линолевая кислота (LA),

e) приблизительно 80% - приблизительно 96%, или приблизительно 90% - приблизительно 96%, или приблизительно 92% - приблизительно 96%, или приблизительно 93%, или приблизительно 94% в весовом отношении от общего содержания жирных кислот в липиде составляют мононенасыщенные жирные кислоты,

f) липид характеризуется долей олеиновой кислоты в мононенасыщенности (OMP), составляющей менее чем приблизительно 0,05, или менее чем приблизительно 0,02, или менее чем приблизительно 0,015, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,05, или приблизительно 0,005 - приблизительно 0,02,

g) ODP для содержимого в виде масла семени составляет приблизительно 0,17 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,15 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,1 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,075 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,050 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,01, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,016, или приблизительно 0,033 - приблизительно 0,023, или составляет приблизительно 0,03, или

приблизительно 0,02, или приблизительно 0,01, и

h) значение PLO для содержимого в виде масла семени составляет приблизительно 0,20 - приблизительно 0,026, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,2, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,15, или приблизительно 0,020 - приблизительно 0,1, или приблизительно 0,020 и приблизительно 0,075, или приблизительно 0,050 и приблизительно 0,055, или составляет приблизительно 0,05, или приблизительно 0,040, или приблизительно 0,030, или приблизительно 0,020.

30. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-29, причем содержащим в виде масла семени является липид, который, кроме того, характеризуется одной или более из особенностей, описанных в пунктах 3-7 или 9-11.

31. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-30, которое включает второй экзогенный полинуклеотид, который кодирует вторую вызывающую генный сайленсинг РНК, которая способна уменьшить экспрессию гена пальмитоил-АСР-тиоэстеразы (FATB) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует второй экзогенный полинуклеотид, и причем второй экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

32. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-31, которое включает третий экзогенный полинуклеотид, который способен уменьшить экспрессию гена пластидной десатуразы ω6 жирных кислот (FAD6) в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует третий экзогенный полинуклеотид, и причем третий экзогенный полинуклеотид функционально связан с промотором, который управляет экспрессией полинуклеотида в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

33. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым

из пунктов 27-32, причем первая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию более чем одного эндогенного гена, кодирующего FAD2, в развивающемся масличном семени или семени сафлора, и/или причем вторая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию более чем одного эндогенного гена, кодирующего FATB, в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

34. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-33, причем первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида ковалентно соединены в одной молекуле ДНК, необязательно с помощью связывающих последовательностей ДНК между первым, вторым и/или третьим экзогенными полинуклеотидами.

35. Масличное семя или семя сафлора по пункту 34, причем первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида находятся под контролем одного промотора, так что, когда первый экзогенный полинуклеотид и второй экзогенный полинуклеотид и/или третий экзогенный полинуклеотид транскрибируются в развивающемся масличном семени или семени сафлора, первая вызывающая генный сайленсинг РНК и вторая вызывающая генный сайленсинг РНК и/или третья вызывающая генный сайленсинг РНК ковалентно связаны в виде частей одного РНК-транскрипта.

36. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-35, которое включает одну транспортную (перенесенную) ДНК, интегрированную в геном масличного семени или семени сафлора, и причем одна транспортная ДНК включает первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида и третьего экзогенного полинуклеотида.

37. Масличное семя или семя сафлора по пункту 36, которое является гомозиготным по транспортной ДНК.

38. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-37, причем каждую из первой вызывающей генный

сайленсинг РНК, второй вызывающей генный сайленсинг РНК и третьей вызывающей генный сайленсинг РНК независимо выбирают из группы, состоящей из антисмыслового полинуклеотида, смыслового полинуклеотида, каталитического полинуклеотида, микроРНК и двухцепочечной РНК.

39. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-38, причем любой один или более, предпочтительно все, из промоторов являются специфическими для семени и предпочтительно преимущественно экспрессируются в зародыше развивающегося масличного семени или семени сафлора.

40. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-39, которое включает одну или более мутаций в одном или более генов FAD2, причем мутация(и) уменьшает активность одного или более генов FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора по сравнению с соответствующим масличным семенем или семенем сафлора, в котором отсутствует мутация(и).

41. Масличное семя или семя сафлора по пункту 40, которое включает, по сравнению с геном FAD2 дикого типа в соответствующем масличном семени или семени сафлора, мутацию в гене FAD2, которая представляет собой делецию, вставку, инверсию, сдвиг рамки считывания, стоп-кодон преждевременной трансляции или одну или более неконсервативных аминокислотных замен.

42. Масличное семя или семя сафлора по пункту 40 или пункту 41, причем мутацией является нуль-мутация в гене FAD2.

43. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 40-42, причем по крайней мере одна из мутаций находится в гене FAD2, который кодирует большую степень активности FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора, в котором отсутствует мутация(и), чем любой другой ген FAD2 в развивающемся масличном семени или семени сафлора.

44. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 40-43, которым является семя сафлора, причем геном FAD2 является ген CtFAD2-1.

45. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым

из пунктов 40-44, которым является семя сафлора, включающее аллель ol гена CtFAD2-1 или аллель ol1 гена CtFAD2-1, или оба аллеля.

46. Масличное семя или семя сафлора по пункту 45, причем аллель ol или аллель ol1 гена CtFAD2-1 присутствует в гомозиготном состоянии.

47. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-46, причем белок FAD2 является необнаруживаемым в семени.

48. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-47, которым является семя сафлора, и причем первая вызывающая генный сайленсинг РНК уменьшает экспрессию обоих генов CtFAD2-1 и CtFAD2-2.

49. Масличное семя или семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 27-48, которым является семя сафлора, и причем

1) геном FAD2 является один или более из гена CtFAD2-1, гена CtFAD2-2 и гена CtFAD2-10, и/или

2) геном FATB является ген CtFATB-3, и/или

3) геном FAD6 является ген CtFAD6.

50. Масличное растение или растение сафлор, способное образовывать семя в соответствии с любым из пунктов 25-49.

51. Растение по пункту 50, которое является трансгенным и гомозиготным по каждому экзогенному полинуклеотиду и/или включает первый экзогенный полинуклеотид и один из двух или оба из второго экзогенного полинуклеотида или третьего экзогенного полинуклеотида.

52. В значительной степени очищенный и/или рекомбинатный полипептид, который включает аминокислоты с последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 27-37, 44, 45 или 48, его биологически активный фрагмент или аминокислотная последовательность, идентичная на по крайней мере 40% любой одной или более из SEQ ID NO: 27-37, 44, 45 или 48.

53. Полипептид по пункту 52, которым является модифицирующий жирные кислоты фермент, предпочтительно олеат-

$\Delta 12$ -десатураза, $\Delta 12$ -ацетиленаз, пальмитолеат- $\Delta 12$ -десатураза или пальмитоил--АСР-тиоэстераза (FATB).

54. Выделенный и/или экзогенный полинуклеотид, включающий одно или более из

i) нуклеотидов, имеющих последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46 или 47,

ii) нуклеотидов, имеющих последовательность, кодирующую полипептид по пункту 52 или пункту 53,

iii) нуклеотидов, которые гибридизуются с последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46 или 47, и

iv) нуклеотидов, имеющих такую последовательность, что после экспрессии в семени масличного растения уменьшается экспрессия гена, кодирующего по крайней мере один полипептид по пункту 52 или пункту 53.

55. Полинуклеотид элемента iv) пункта 54, который выбирают из антисмыслового полинуклеотида, смыслового полинуклеотида, каталитического полинуклеотида, микроРНК, молекулы двухцепочечной РНК (дцРНК) и ее подвергнутого процессингу РНК-продукта.

56. Полинуклеотид по пункту 55, которым является молекула дцРНК или ее подвергнутый процессингу РНК-продукт, включающий по крайней мере 19 следующих друг за другом нуклеотидов, которые идентичны на по крайней мере 95% комплементу любой одной или более из SEQ ID NO: 1-25, 40-43, 46, 47 или 49-51 (в случаях, когда тимин (Т) заменяется урацилом (U)).

57. Полинуклеотид по пункту 55 или пункту 56, причем молекула дцРНК является предшественником микроРНК, и/или причем ее подвергнутым процессингу РНК-продуктом является микроРНК.

58. Полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 55-57, который транскрибируется в развивающемся масличном семени или семени сафлора под контролем одного промотора, причем молекула дцРНК включает комплементарные смысловую и антисмысловую последовательности, которые способны гибридизоваться друг с другом, связанные с помощью одноцепочечного участка РНК.

59. Полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 55-58, который, в случае присутствия в развивающемся семени сафлора,

i) уменьшает экспрессию эндогенного гена, кодирующего олеат- Δ 12-десатуразу (FAD2), в развивающемся семени, при этом FAD2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой одной или более из SEQ ID NO: 27, 28 или 36;

ii) уменьшает экспрессию эндогенного гена, кодирующего пальмитоил-АСР-тиоэстеразу (FATB), в развивающемся семени, при этом FATB имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; и/или

iii) уменьшает экспрессию гена, кодирующего десатуразу ω 6 жирных кислот (FAD6), в развивающемся семени, при этом FAD6 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48.

60. Химерный вектор, включающий полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 55-59, функционально связанный с промотором.

61. Вектор по пункту 60, причем промотор является функционирующим в масличном семени или является специфическим для семени промотором, предпочтительно является преимущественно экспрессируемым в зародыше развивающегося масличного семени.

62. Рекомбинантная клетка, включающая экзогенный полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 54-59 и/или вектор по пункту 60 или пункту 61.

63. Клетка по пункту 62, которой клетка растения, предпочтительно клетка семени растения.

64. Клетка по пункту 63, причем клеткой растения является клетка масличного растения.

65. Клетка по пункту 64, причем клеткой растения является клетка нефотосинтезирующего семени, предпочтительно клетка семени сафлора, подсолнечника, хлопчатника или клешевины обыкновенной.

66. Трансгенный не являющийся человеком организм, включающий один или более полинуклеотидов в соответствии с любым из пунктов 54-59, вектор по пункту 60 или пункту 61 и

клетку в соответствии с любым из пунктов 62-65.

67. Трансгенный не являющийся человеком организм по пункту 66, которым является растение.

68. Трансгенный не являющийся человеком организм по пункту 67, которым является масличное растение.

69. Способ создания клетки в соответствии с любым из пунктов 62-65, включающий стадию введения полинуклеотида в соответствии с любым из пунктов 54-59 и/или вектора по пункту 60 или пункту 61 в клетку.

70. Применение полинуклеотида в соответствии с любым из пунктов 54-59 и/или вектора по пункту 60 или пункту 61 для создания рекомбинантной клетки.

71. Способ создания трансгенного масличного растения, которое образует семя в соответствии с любым из пунктов 27-49, или его семени, при этом способ включает

i) введение по крайней мере одного полинуклеотида в соответствии с любым из пунктов 54 (элемент iv) - 59 и/или по крайней мере одного вектора по пункту 60 или пункту 61 в клетку масличного растения,

ii) регенерацию трансгенного растения из клетки, и

iii) необязательно, получение одного или более растений-потомков трансгенного растения или его семени,

тем самым создавая трансгенное масличное растение или его семя.

72. Способ по пункту 71, причем семенем является семя сафлора в соответствии с любым из пунктов 28-49.

73. Способ по пункту 71 или пункту 72, причем одно или более растений-потомков или его семя включает

i) первый экзогенный полинуклеотид, и/или

ii) второй экзогенный полинуклеотид, и/или

iii) третий экзогенный полинуклеотид,

предпочтительно все три экзогенных полинуклеотида.

74. Способ в соответствии с любым из пунктов 71-73, причем одно или более растений-потомков или его семя включает одну или более мутаций, определенных в любом из пунктов 40-46.

75. Способ создания масличного растения, включающий

i) скрещивание первого родительского масличного растения, которое включает первый полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 54 (элемент iv) - 59 или первый вектор по пункту 60 или пункту 61, со вторым родительским масличным растением, которое включает второй полинуклеотид в соответствии с любым из пунктов 54 (элемент iv) - 59 или второй вектор по пункту 60 или пункту 61,

ii) скрининг растений-потомков, образующихся в результате скрещивания, на присутствие обоих полинуклеотидов или обоих векторов; и

iii) отбор растения-потомка, включающего как (a) первый полинуклеотид или первый вектор, так и (b) второй полинуклеотид или второй вектор, и, кроме того, характеризующегося увеличенной долей олеиновой кислотой и уменьшенной долей пальмитиновой кислоты в составе масла из семени растения.

76. Способ генотипирования растения сафлора, включающий детектирование молекулы нуклеиновой кислоты растения, причем молекула нуклеиновой кислоты сцеплена с, и/или включает по крайней мере часть, одним (одного) или более генов CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10 растения сафлора.

77. Способ по пункту 76, причем способ включает определение уровня экспрессии и/или последовательности одного или более из генов CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10 растения.

78. Способ по пункту 76 или пункту 77, который включает:

i) гибридизацию второй молекулы нуклеиновой кислоты с указанной молекулой нуклеиновой кислоты растения,

ii) необязательно, гибридизацию по крайней мере одной другой молекулы нуклеиновой кислоты с указанной молекулой нуклеиновой кислоты растения; и

iii) детектирование продукта указанной стадии (й) гибридизации или отсутствие продукта в результате указанной стадии (й) гибридизации.

79. Способ по пункту 78, причем вторая молекула нуклеиновой кислоты используется в качестве праймера для обратной транскрипции или репликации по крайней мере части молекулы нуклеиновой кислоты растения.

80. Способ в соответствии с любым из пунктов 76-79, причем нуклеиновую кислоту детектируют, используя метод, выбираемый из группы, состоящей из анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов, амплификации микросателлитных локусов, секвенирования нуклеиновой кислоты и/или амплификации нуклеиновой кислоты.

81. Способ в соответствии с любым из пунктов 76-80, причем способ детектирует отсутствие или присутствие аллеля гена CtFAD2-1, предпочтительно аллеля ol.

82. Способ отбора растения сафлора из популяции растений сафлора, включающий:

i) генотипирование указанной популяции растений, используя способ в соответствии с любым из пунктов 76-81, причем указанная популяция растений была получена в результате скрещивания между двумя растениями, по крайней мере одно из которых включает аллель гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10, который наделяет развивающееся семя указанного растения уменьшенным уровнем активности $\Delta 12$ -десатуразы, по сравнению с соответствующим семенем растения сафлора, в котором отсутствует указанный аллель, и

ii) отбор растения сафлора на основе присутствия или отсутствия указанного аллеля.

83. Способ введения аллеля гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10 в растение сафлор, в котором отсутствует этот аллель, при этом способ включает;

i) скрещивание первого родительского растения сафлора со вторым родительским растением сафлором, причем второе растение включает указанный аллель гена CtFAD2-1, CtFAD2-2 или CtFAD2-10, и

ii) возвратное скрещивание потомка, полученного в результате скрещивания стадии i), с растениями с тем же генотипом, что и первое родительское растение, достаточное число раз для получения растения с преобладанием генотипа первого растения, но включающего указанный аллель,

причем аллель наделяет развивающееся семя указанного растения уменьшенным уровнем активности $\Delta 12$ -десатуразы, по сравнению с соответствующим семенем растения сафлора, в котором отсутствует указанный аллель, и причем растения-потомков генотипируют на присутствие или отсутствие указанного аллеля, используя способ в соответствии с любым из пунктов 76-81.

84. Трансгенное растение, или растения - его потомки, или его семя, созданное, используя способ в соответствии с любым из пунктов 71-83.

85. Способ производства семени, включающий

а) выращивание растения в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, предпочтительно в поле в виде части популяции по крайней мере 1000 таких растений и

б) сбор урожая семян.

86. Масло, полученное или получаемое с помощью одного или более способов в соответствии с любым из пунктов 15-24, из масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, из растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки в соответствии с любым из пунктов 62-65 и/или из не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66.

87. Композиция, включающая одно или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, полипептида по пункту 52 или пункту 53, полинуклеотида в соответствии с любым из пунктов 54-59, вектора по пункту 60 или пункту 61, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65 или масла по пункту 86 и один или более приемлемых носителей.

88. Применение одного или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, композиции по пункту 13, 14 или 87, способа в соответствии с любым из пунктов 15-24, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из

пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86 для производства промышленного продукта.

89. Способ производства промышленного продукта, включающий стадии:

i) получения одного или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86,

ii) необязательно, физической обработки одного или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66, или масла по пункту 86, стадии i),

ii) превращения по крайней мере некоторой части липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, или липида в одном или более из композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или части растения в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66, или масла по пункту 86, или подвергнутого физической обработке продукта стадии ii) в промышленный продукт посредством использования нагревания, химического или ферментативного способа, или любой их комбинации, в отношении липида, и

iii) получения промышленного продукта,

тем самым осуществляя производство промышленного продукта.

90. Способ производства топлива, включающий

i) осуществление реакции одного или более из липида в

соответствии с любым из пунктов 1-12, или липида в одном или более из композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или части растения в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86 со спиртом, необязательно в присутствии катализатора, для образования алкиловых эфиров, и

ii) необязательно, смешивание алкиловых эфиров с топливом на нефтяной основе.

91. Способ по пункту 90, причем алкиловыми эфирами являются метиловые эфиры.

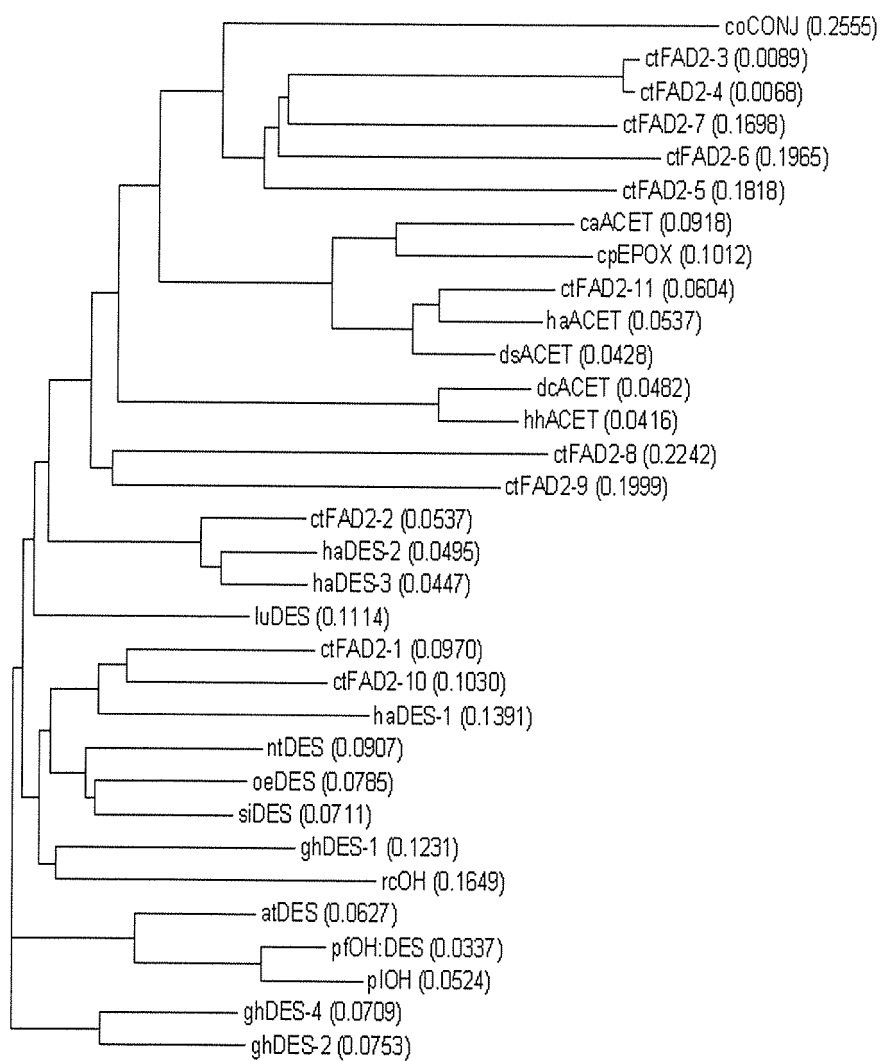
92. Способ производства продукта питания, включающий смешивание одного или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86 с по крайней мере одним другим пищевым ингредиентом.

93. Продукты питания, косметические средства или химические продукты, включающие одно или более из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12, композиции по пункту 13, 14 или 87, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49, растения или его части в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86.

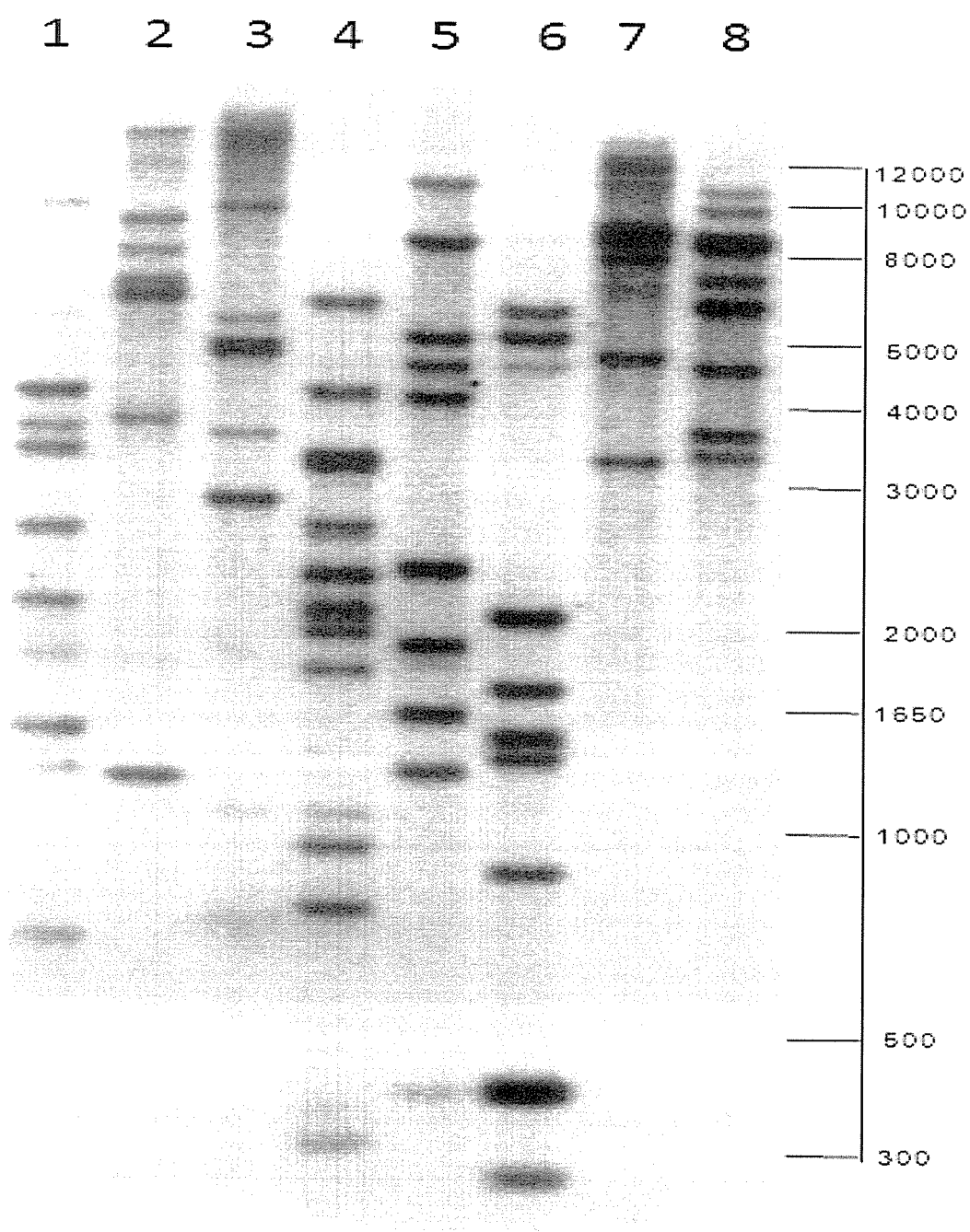
94. Продукт, полученный из одного или более, или используя одно или более, из липида в соответствии с любым из пунктов 1-12 или липида в одном или более из композиции по пункту 13, 14 или 87, способа по любому из пунктов 15-24, масличного семени или семени сафлора в соответствии с любым из пунктов 25-49,

растения или части растения в соответствии с любым из пунктов 50, 51, 67, 68 или 84, клетки-хозяина в соответствии с любым из пунктов 62-65, не являющегося человеком трансгенного организма или его части по пункту 66 или масла по пункту 86.

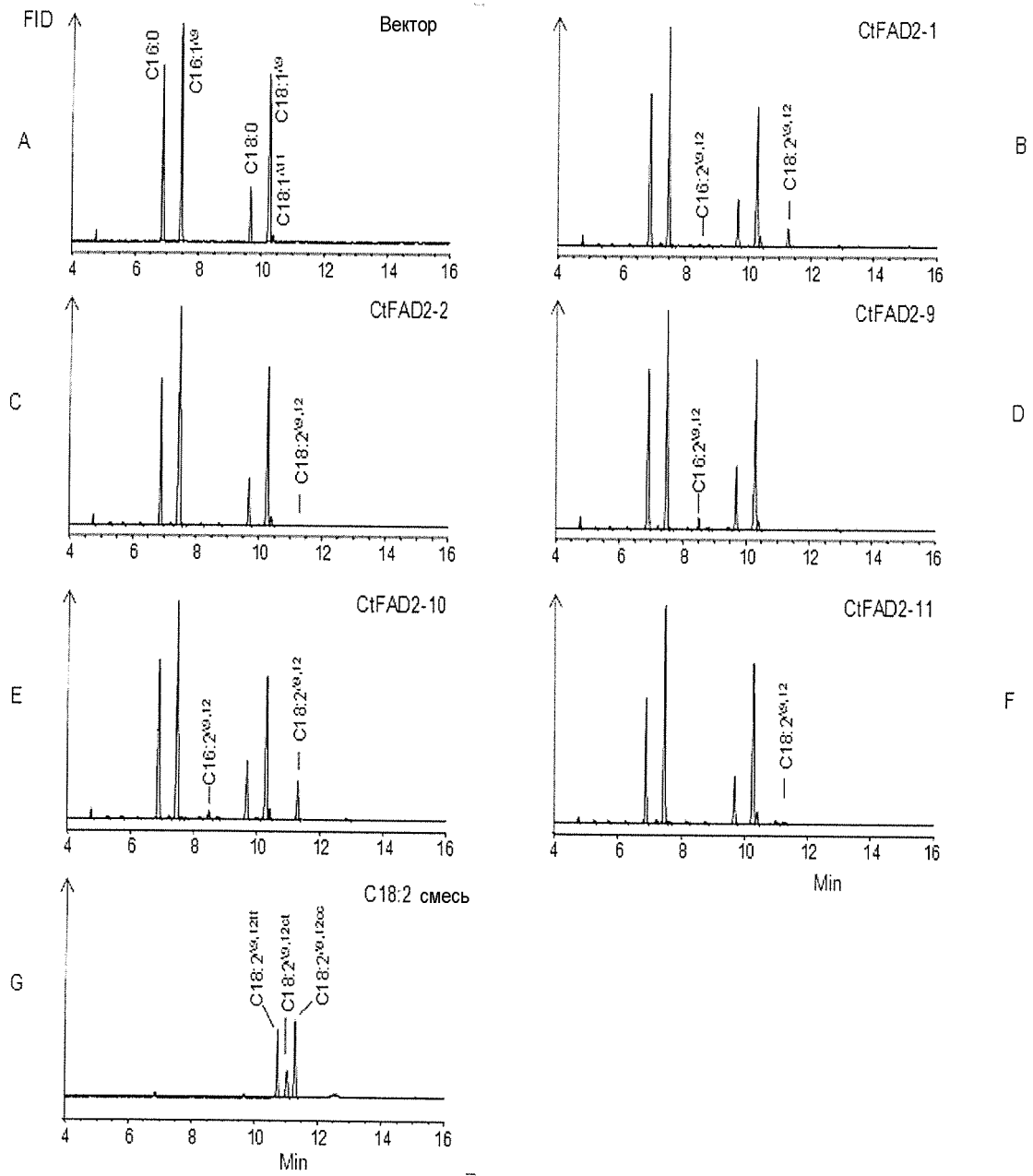
По доверенности



Фиг. 1

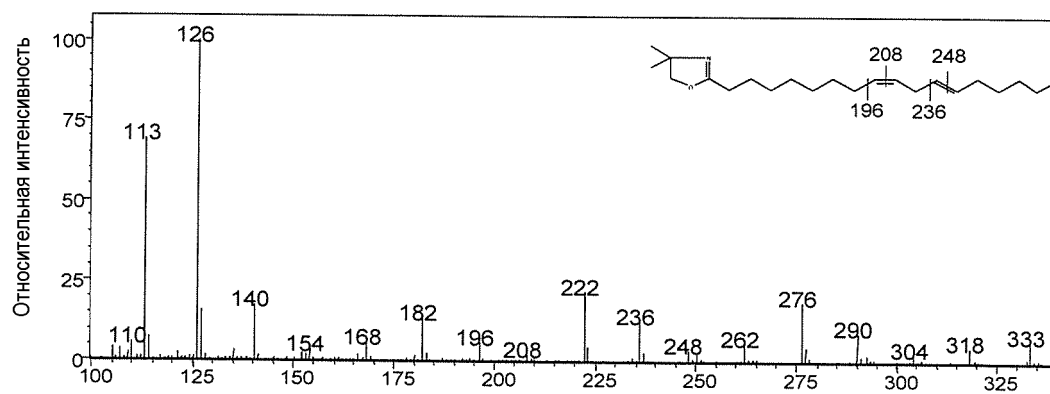


Фиг. 2

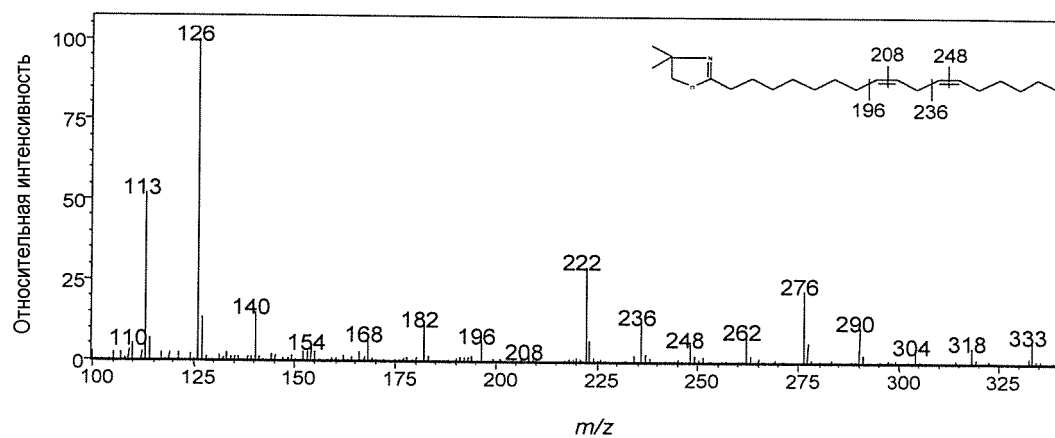


Фиг. 3

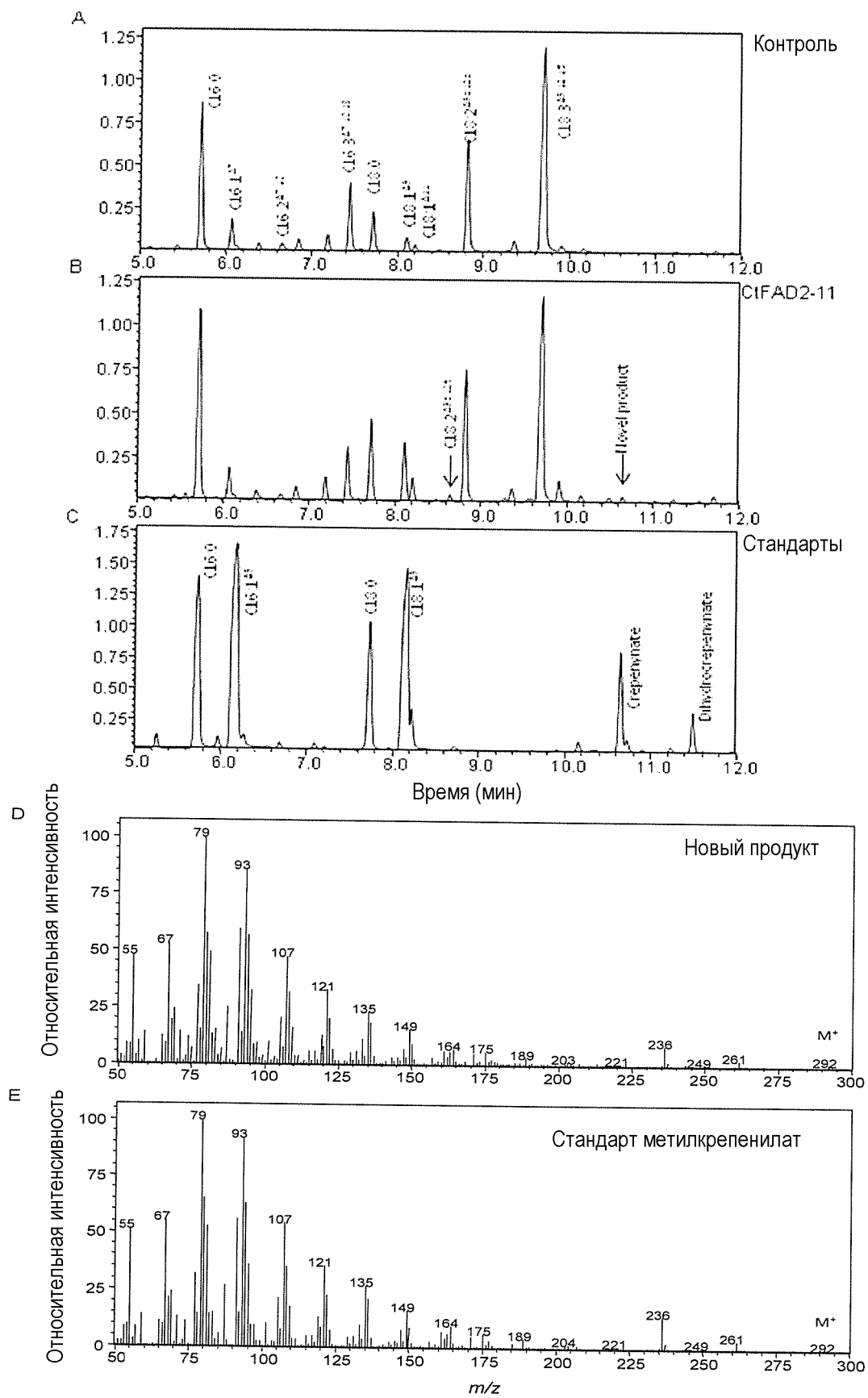
H



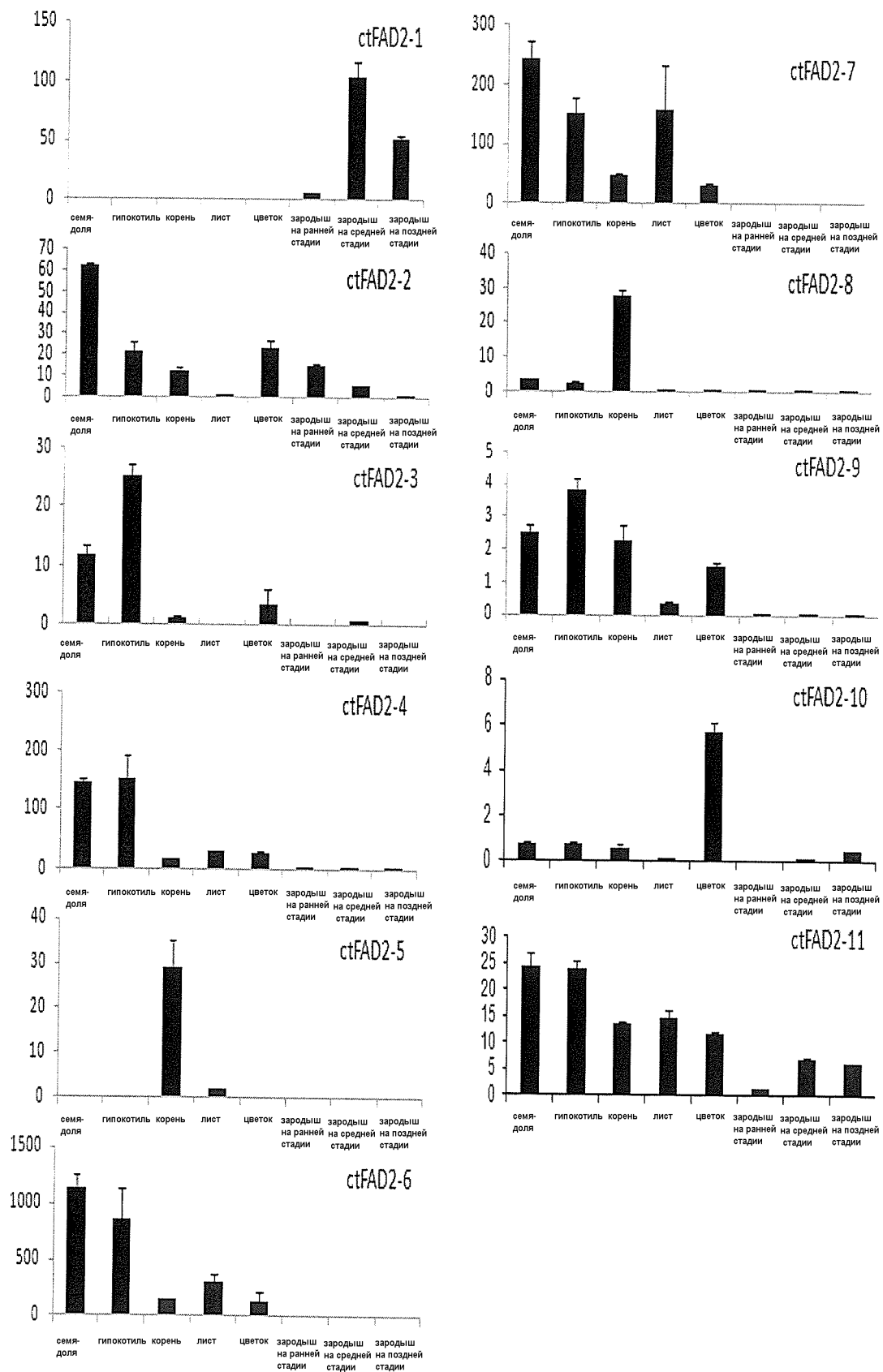
I



Фиг. 3 (продолжение)



Фиг. 4



Фиг. 5

		601		650
SU (дикий тип)	(601)	TGTCTTTCAACGTCTCCGGAAGACCCCTATGACCGTTTCGCCTGCCACTAC		
S-317	(601)	TGTCTTTCAACGTCTCTGGAAGACC-TACAACCGTTTCGCCTGCCACTAT		
CW99-OL	(601)	TGTCTTTCAACGTCTCTGGAAGACC-TACAACCGTTTCGCCTGCCACTAT		
LeSaf496	(595)	TGTCTTTCAACGTCTCTGGAAGACC-TACAACCGTTTCGCCTGCCACTAT		

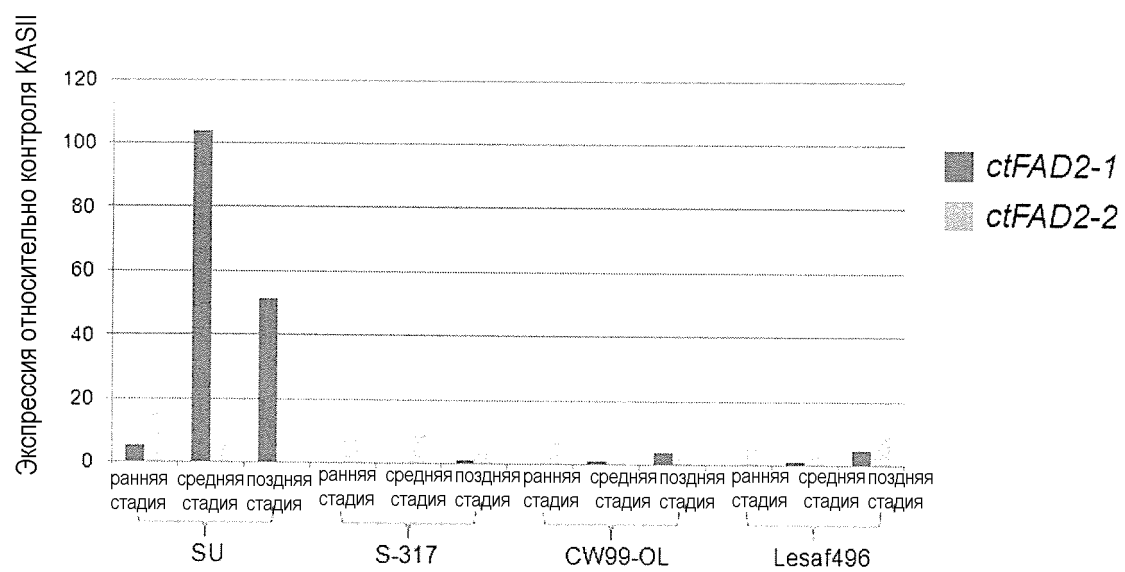
Фиг. 6

		1		50
Ct FAD2-1-SU	(1)	GTGCATTCTCTCATTCTCAAAACCTTTCTGCTATTCATCTGATCAATGT-		
Ct FAD2-1-ol	(1)	GTGCATTCTCTCA-----ACCTTCCTGCTTTTCGTCGATCAATGTT		
		51	HL-смысловой праймер	100
Ct FAD2-1-SU	(50)	-----ATTCA <u>GTTATGGTT-CGATGAT</u> -----CGACGATTA		
Ct FAD2-1-ol	(43)	AATGTATTCAATTATCGTTTCGATGATTTCTATTAAATCTCGACGATTA		
		101		150
Ct FAD2-1-SU	(80)	TTGTTTGTATTTTAATTTTAAATTTTAGCTTGATTAGCTGCATTGTTG		
Ct FAD2-1-ol	(93)	TCGTTTGTATT----TTTTA--TTTAGGTAGATTTAGCTGCATTGTTG		
		151		200
Ct FAD2-1-SU	(130)	GTCGATGAATAGATCTGTGGATTACGGCTTCTGTCAGTTTCAGTTT--GA		
Ct FAD2-1-ol	(137)	GTTGATGAATAGATCTGTAGATTACGGCTCTCTGCGCTTTCAGTTTTTGA		
		201		250
Ct FAD2-1-SU	(178)	TTTATTTCAGTCCGTTTTCTCCTGTAAATTTGTGTATCTATCTGTGTG		
Ct FAD2-1-ol	(187)	TTCATTTCACTCCGTTTT-CTTCTGTAAATTTGTGTATCTATCTGTGTG		
		251		300
Ct FAD2-1-SU	(228)	CATGTAATTTTGTTCCTTTAGATTATAGAAATGAAATCCATAATTTTA		
Ct FAD2-1-ol	(236)	CATGTAATTTTGTTCCTTTAGATTATAGAAATGAAATCCATAATTTTA		
		301		350
Ct FAD2-1-SU	(278)	GGGCTGCTTGTCTTGTTCGATTTCGTGTTATTAGGTTTGATCACAGTAA		
Ct FAD2-1-ol	(286)	GGGCTGCTTCTCTTGTTCGATTTCGTGTTATTAGGTTTAAATTACAGTAA		
		351		400
Ct FAD2-1-SU	(328)	CTCCGTACGTTTAAATATGTAAATGCTAAACAAAATGATTATTTTTTA		
Ct FAD2-1-ol	(336)	CTCCGTACGTTTAAATATGTCAAATGCTAAACAAAATGATTGTTTTTTA		
		401		450
Ct FAD2-1-SU	(378)	TATTTATGGCTTCTCGGTGGTCGGATTTCGTGTTTTTAATTCCTGAAGTTT		
Ct FAD2-1-ol	(386)	TATTTATGGCTTCTCGGTGGTCGGATTTCGTGTTTTTAATTCCTGAAGTTT		
		451		500
Ct FAD2-1-SU	(428)	CTGTATACAATGATTTCGAATTTTGCCGATTAGGCATCTCTTACTTTGG		
Ct FAD2-1-ol	(436)	CTGTATACAATGATTTCGAATTTTGCCGATTAGGCATCTCTTACTTTGG		
		501		550
Ct FAD2-1-SU	(478)	AAGGAATTCAGATTTTCTT-----AATCTCATAGAGAAGTG		
Ct FAD2-1-ol	(486)	AAGGATTTCTAGATTTTCTTTGCCGATTCTTAATCTTATATAGAAATG		
		551		600
Ct FAD2-1-SU	(515)	CTGAT-----TG-----GGAATTTGCTTAAAGATATAAGCACTTTTCAG		
Ct FAD2-1-ol	(536)	ATGATATCATTGACAAATGGCAATTGCTTAAAGATACAAGCATTTTTCAG		
		601		650
Ct FAD2-1-SU	(554)	TTCAATTGATTGTTTGATGGACATCAGA-TGGTTTTTTGCTGATGCCATG		
Ct FAD2-1-ol	(586)	TTCAATTGAATGTTTGATGGACATCAAAATGGATTTTTGCTGATG-----		
		651	HL-антисмысловой праймер	700
Ct FAD2-1-SU	(603)	ATGTCTATGTGTGCAATGTATCTTCAAT <u>AGTGCCTTCAATATGTATAG</u>		

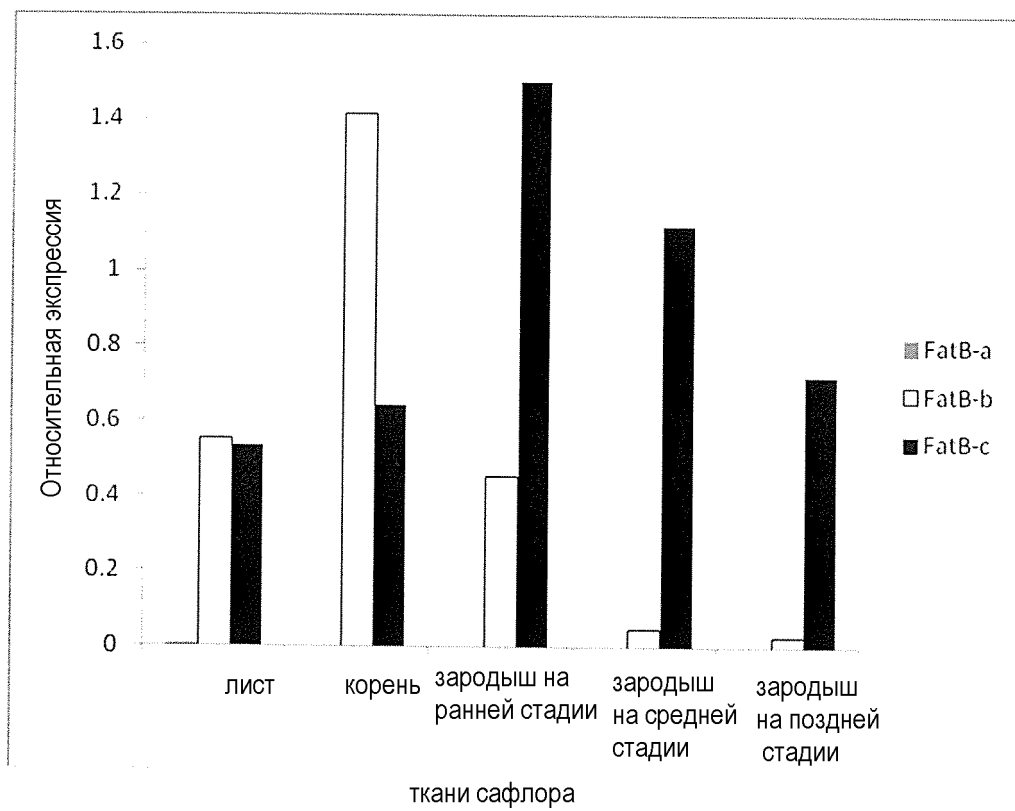
Фиг. 7

CtFAD2-1-ol	(631)	---TCTACTGTGTTGAATGTACCTTCATTTAGC-----	
			701
CtFAD2-1-SU	(653)	CAAACTGAGCTAAGGCTGTGTTTGCCAAACTACCTGATAAGCTATATGT	750
CtFAD2-1-ol	(661)	-----CTGTGTTTCAGC---GGTTTGGCATGCTAGCTGATAG-----	
		→ НО-смысловый праймер	
			751
CtFAD2-1-SU	(703)	TGACTGATAAGCTAGTTTGTGAATAAAATTATGTTTGGCAAAACTAGCAT	800
CtFAD2-1-ol	(694)	---CTGATAAGCTAGCTTATGAATAAAATTATGTTTGGTAAAACTAGCTT	
			801
CtFAD2-1-SU	(753)	ATGACTATGTAAATGACTAAAAAGGCTATCTTGGGGTATAAAGTAAAT	850
CtFAD2-1-ol	(741)	ATGACTATGTAAATGACAAAAAGG- TACCTCGCAGTGTAATAATTAAT	
			851
CtFAD2-1-SU	(803)	ATTGATAAGGATAGAATTGGAGAAGGCTACAAAAAGCCCTTGAAATGCTA	900
CtFAD2-1-ol	(790)	ATTAAATAAGGGTATAATTGGAAAGAGCC TACTAAAAGCTCTAGAAGCTA	
			901
CtFAD2-1-SU	(853)	CTCCAAGTACTGTTTCAATAAGCTGG-CTTATGGTCATCCAAACATGTA	950
CtFAD2-1-ol	(840)	CTCCAAGTAAAGTTTCAATAAGCTTAACTTATGGTCATCCAAACATGTA	
			951
CtFAD2-1-SU	(902)	CTAGATTAATCATCTAGCTTATTTTGGCAAACACAGCCTAAATG-TTTGA	1000
CtFAD2-1-ol	(890)	CTAGCTTATAAGCCAGCTTATTTTGGCAAACACAGCCAAAGTACTTTCA	
			1001
CtFAD2-1-SU	(951)	TGGTCGATGGC-----TGGCAC-----TTGAC	1050
CtFAD2-1-ol	(940)	TGGTTGATTTCTCTGTTTCCCAACTGAGCTAAAATGGTCCGATGGTCGAC	
		← НО-антисмысловый праймер	
			1051
CtFAD2-1-SU	(973)	AATTTGACATCATTTATAACT-----GAAACAATAA-----	1100
CtFAD2-1-ol	(990)	GAGTTGACATCATTTATAATTATATATTTTGAATCCTTAAGGCTAACGTT	
			1101
CtFAD2-1-SU	(1003)	-----TATTCACCTT-----TACATAACATTCACCT	1150
CtFAD2-1-ol	(1040)	TCCTTAGTTTTTATTTATGTTGTGATGGTGGCATTACATAATATTCACCT	
			1151
CtFAD2-1-SU	(1029)	TTAGCCAAAACTAGATGTTACCTACGAACTGATCCATATGGAACATTT	1200
CtFAD2-1-ol	(1090)	TTAGCTAAAACTAGATGTTACCTACGAACTGATCCATATGGAACATTT	
			1201
CtFAD2-1-SU	(1079)	TGCAG	
CtFAD2-1-ol	(1140)	TGCAG	

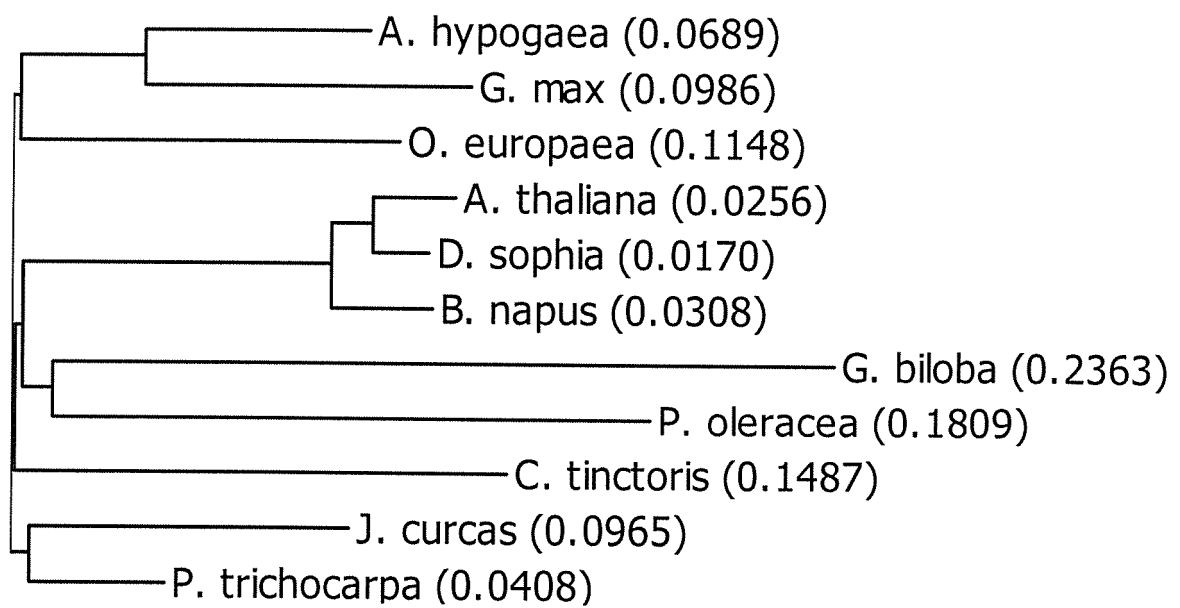
Фиг. 7 (продолжение)



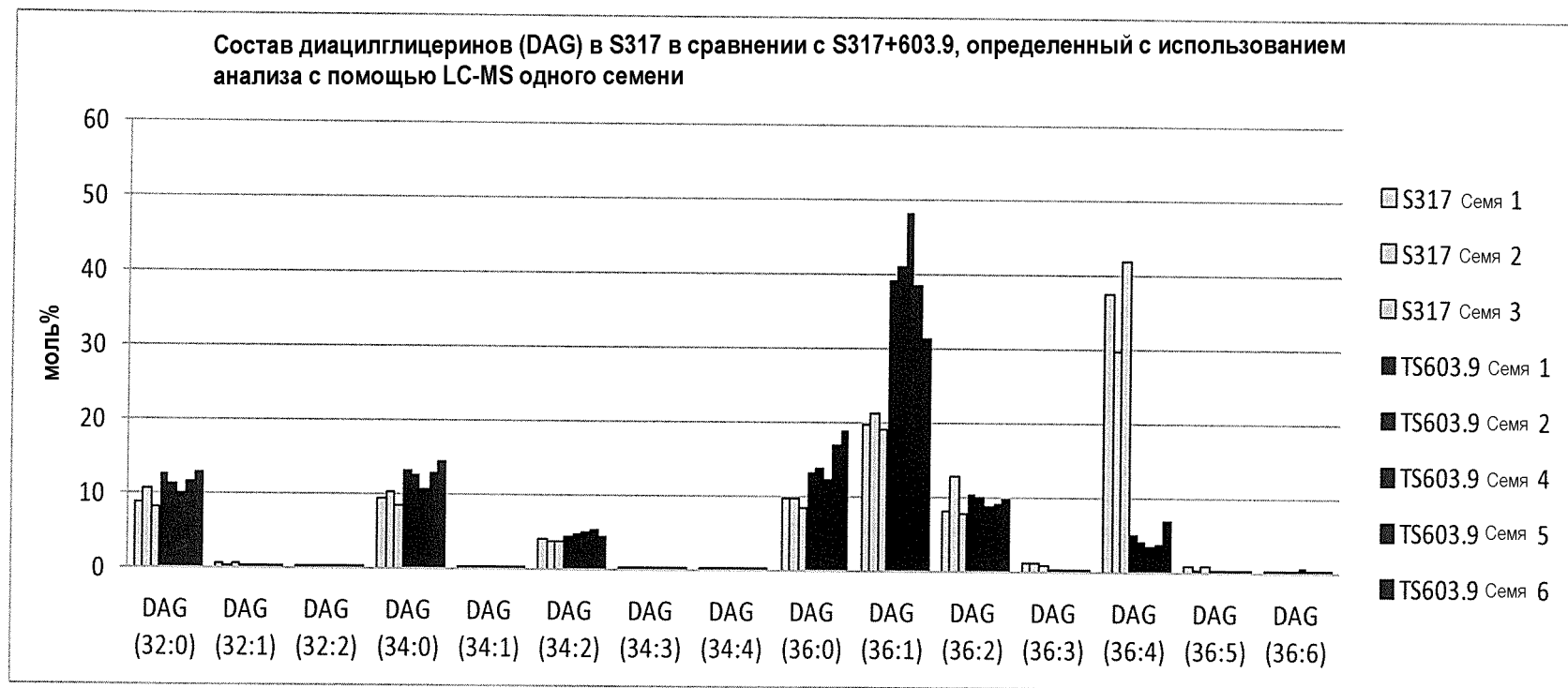
Фиг. 8



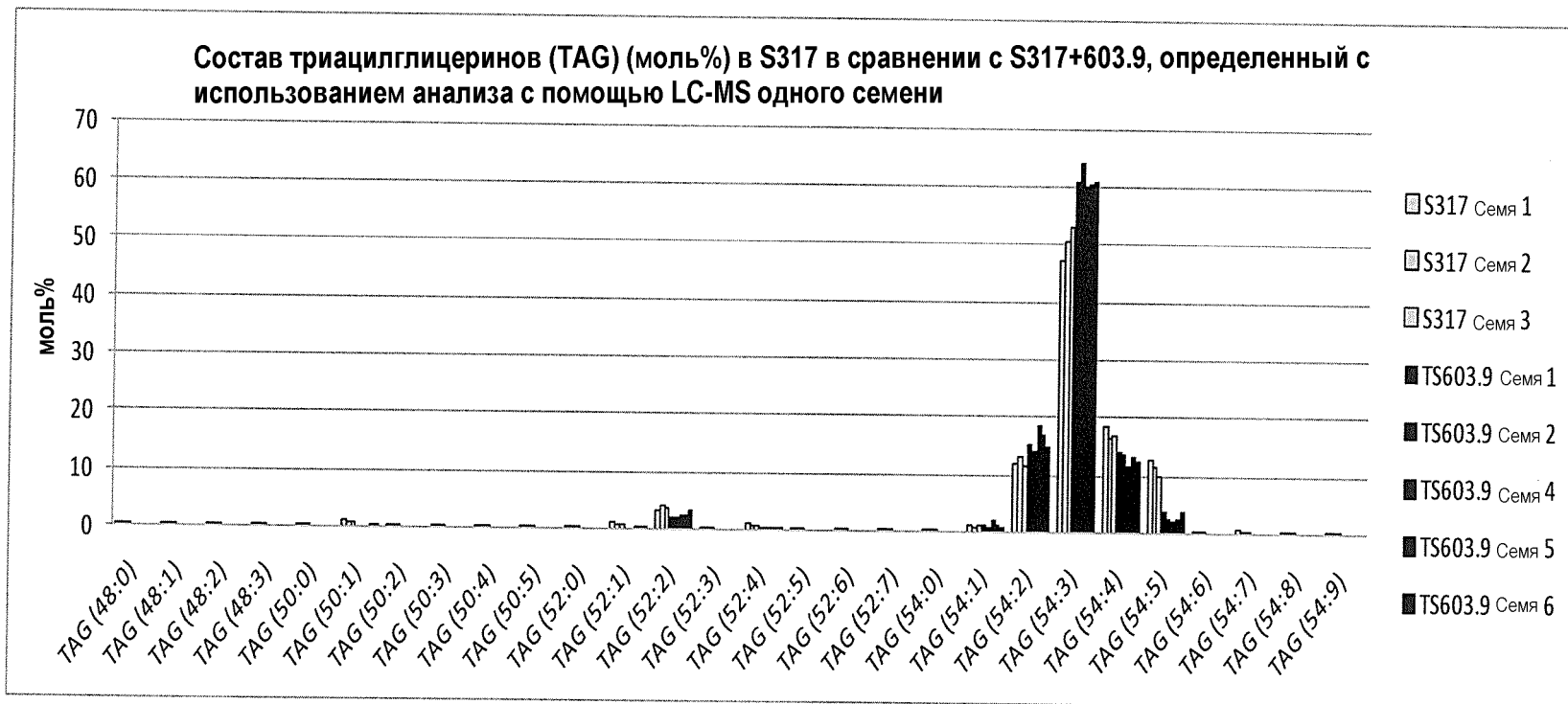
Фиг. 9



Фиг. 10



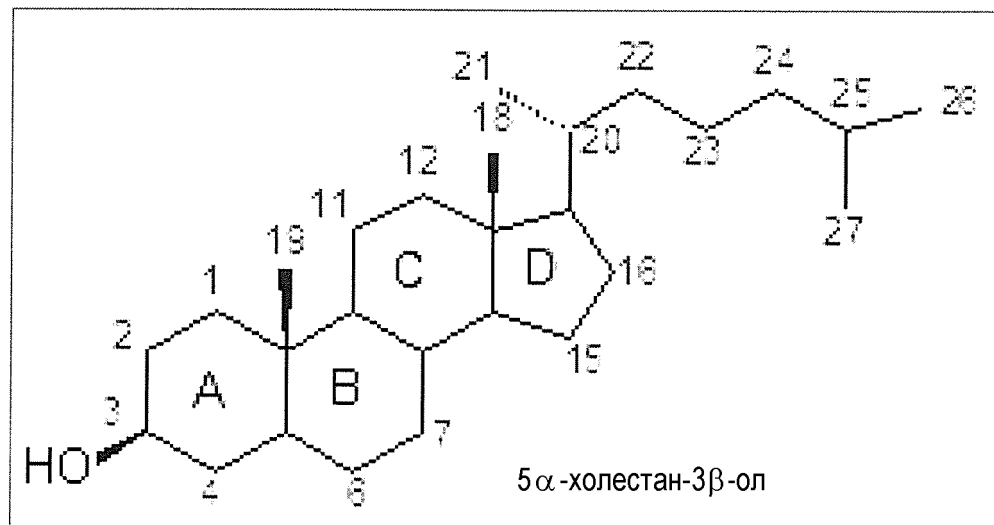
Фиг. 12



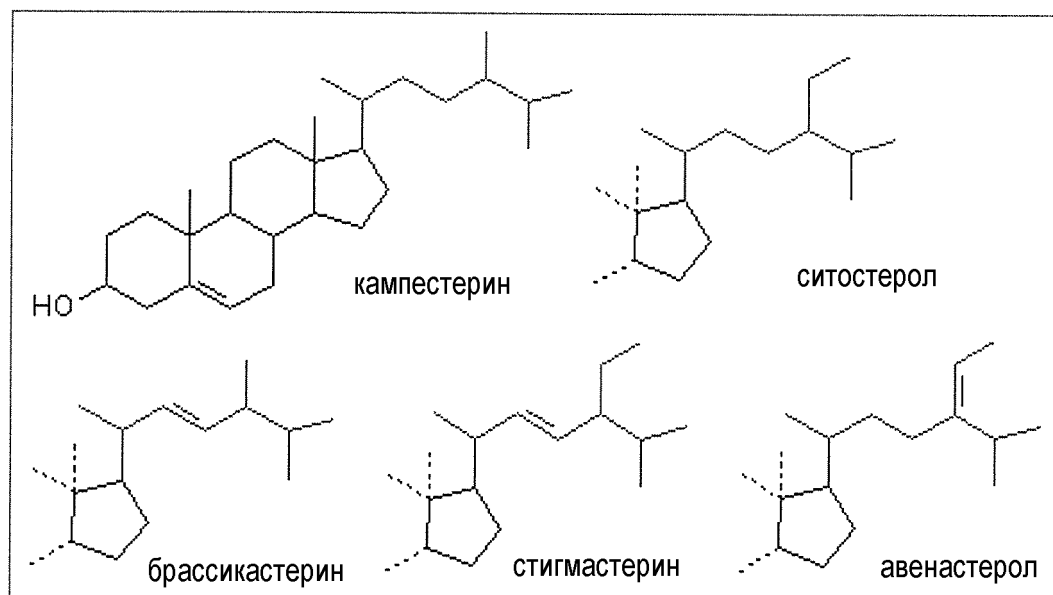
Фиг. 13



A)



B)



Фиг. 14