

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041446

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.25

(21) Номер заявки
201892783

(22) Дата подачи заявки
2017.06.16

(51) Int. Cl. C11B 1/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) ИМБРЕДНАЯ ТРАНСГЕННАЯ ЛИНИЯ КАНОЛЫ NS-B50027-4 И ЕЕ СЕМЕНА

(31) 62/351,250

(32) 2016.06.16

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/037997

(87) WO 2017/218969 2017.12.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НЬЮСИД НЬЮТРИШНЛ
ОСТРЭЛЪЯ ПиТиВай ЛТД (AU)

(72) Изобретатель:
Гао Вэньсянь (US), Девайн Мальколм
(CA), Леонфорте Антонио, Гороро
Нельсон, Бузза Грег (AU), Тан
Шуньсюэ (US)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) US-A1-20150045569
US-A1-20160150747
US-A1-20030110532
US-A1-20100092640

(57) Варианты осуществления согласно настоящему изобретению относятся к инбредной трансгенной линии канолы NS-B50027-4; семенам и маслу, полученным из NS-B50027-4; и потомству, происходящему из NS-B50027-4. В частности, NS-B50027-4 представляет собой чистосортную линию канолы, способную продуцировать по меньшей мере 5% ДНА в своем масле семян.

041446

B1

041446

B1

Родственная заявка

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/351250, поданной 16 июня 2017 г. и включенной полностью в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII через EFS-Web и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Варианты осуществления согласно настоящему изобретению относятся к области разведения канолы и сельскохозяйственной продукции, в частности к инбредному семени и растению инбредной трансгенной линии канолы, обозначенной NS-B50027-4, и производным такого инбредного растения; и способам детекции инбредной трансгенной линии канолы NS-B50027-4.

Предпосылки создания изобретения

Канола является важной масличной культурой во многих регионах мира. Композиция жирных кислот масла канолы богата мононенасыщенными и полиненасыщенными жирными кислотами, включая короткоцепочечные омега-3, но не содержит длинноцепочечные жирные кислоты омега-3. Длинноцепочечные жирные кислоты омега-3 (LC- ω 3) доказали свою пользу для здоровья, но в настоящее время жирные кислоты LC- ω 3 получают главным образом непосредственно из морских водорослей или из морских рыб, питающихся водорослями. Признание диетической важности жирных кислот LC- ω 3, особенно докозагексаеновой кислоты (22:6 n-3; DHA), докозапентаеновой кислоты (22:5 n-3; DPA) и эйкозапентаеновой кислоты (20:5 n-3; EPA) способствовало резкому увеличению спроса на потребляемый рыбий жир. Таким образом, существует потребность в альтернативных прямых источниках жирных кислот LC- ω 3 для потребления человеком. Кроме того, поскольку рыба, выращиваемая на фермах, такая как атлантический лосось, накапливает жирные кислоты пропорционально пищевым жирным кислотам, необходимо поддерживать количество LC-полиненасыщенных жирных кислот (LC-PUFA) в корме для рыб и, в свою очередь, обеспечить присутствие этих жирных кислот в выращиваемой рыбе. Соответственно существует потребность в источниках, богатых LC-PUFA, которые можно использовать в аквакультуре. Например, существует потребность в каноле, которая может продуцировать LC-PUFA, в частности жирную кислоту LC- ω 3, такую как DHA, для применения в аквакультуре, а также для непосредственного потребления человеком. Однако несмотря на достижения в селекции растений и манипуляции с помощью молекулярной генетики не существует коммерческих источников масла канолы, которые достигали бы уровня LC-PUFA, вырабатываемого у диких рыб. Кроме того, культивар канолы (не гибрид F1) должен быть гомогенным, гомозиготным и воспроизводимым, чтобы его можно было применять для надежного производства коммерческой культуры. Таким образом, сохраняется потребность в линии канолы, которую можно выращивать как устойчивую культуру, семена которой обеспечивают коммерчески целесообразные количества жирных кислот ω 3, LC-PUFA и жирных кислот LC- ω 3, таких как DHA.

Сущность изобретения

Варианты осуществления, описанные в настоящем документе, обеспечивают инбредную рекомбинантную линию канолы, обозначенную NS-B50027-4, семена которой содержат выгодные уровни ω 3 и LC- ω 3 жирной кислоты, таким образом обеспечивая возобновляемую наземную систему для производства этих ценных масел. Репрезентативный образец семян инбредной линии канолы NS-B50027-4 депонирован в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур (ATCC®) (Manassas, VA) 9 июня 2016 г., и ему присвоен номер доступа PTA-123186 (см. Приложение А). Также в настоящем документе описаны клетки, ткани, семена и масло инбредной линии канолы NS-B50027-4. Комбинация отбора и разведения с трансгенной манипуляцией обеспечивает изменчивость в видах, где эта изменчивость не существует. Например, профиль жирных кислот линии канолы NS-B50027-4, описанный в настоящем документе, не существует в нативных растениях, таких как *B. napus*; и признаки, описанные в настоящем документе, в частности выгодный признак продукции DHA, были разработаны при значительном техническом вмешательстве человека.

В одном аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается семя канолы (*Brassica napus* L.) линии NS-B50027-4, генетически модифицированной канолы культивара AV Jade, который был подвергнут отбору и разведению в стабильную, однородную линию разведения, которая накапливает в своих семенах высокую долю (массовый процент) жирных кислот ω 3 и LC- ω 3, в частности LC- ω 3 PUFA, такую как DHA, относительно общего содержания жирных кислот. Инбредная линия NS-B50027-4 была разработана для обеспечения растений канолы, которые производят семена, содержащие LC- ω 3 PUFA, в частности DHA, на уровнях, приближающихся к уровням, обнаруживаемым в некоторых маслах дикой рыбы. Пищевое масло, полученное из NS-B50027-4, имеет значительно более высокое содержание DHA, чем другие растения *B. napus*. Новая однородная линия разведения NS-B50027-4 была разработана путем первоначальной генетической трансформации с последующим тщательным отбором и разведением по признаку высокого содержания DHA в стабильной, высокоурожайной, морфологически пригодной линии канолы.

Таким образом, по меньшей мере один вариант осуществления, описанный в настоящем документе, относится к семенам инбредной линии канолы NS-B50027-4; растениям, культивированным из семян инбредной линии канолы NS-B50027-4, и их частям, таким как пыльца, семяпочка или семя; и способам получения семени из растения канолы путем культивирования инбредной линии канолы NS-B50027-4 или путем скрещивания инбредной линии канолы NS-B50027-4 с самой собой или с другой канолой или линией Brassica (такой как *B. juncea*), и получению семени из культивированного потомства. В родственном варианте осуществления предлагается семя канолы или линии Brassica, полученной из NS-B50027-4 путем интрогрессии по меньшей мере одного трансгенного локуса NS-B50027-4.

По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается семя популяции растений канолы, полученных способом, описанным в настоящем документе, при этом в указанной популяции в среднем 10-100% ее аллелей получено из линии канолы NS-B50027-4. Аналогичным образом настоящие варианты осуществления обеспечивают применение линии канолы NS-B50027-4, сублинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или сублинии, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со второй канолой или растением Brassica, для разведения или культивирования растения для производства семян, масла, муки или белка.

По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается семя растения масличного рапса, такого как растение *Brassica napus*, содержащее в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается растение, такое как растение *B. napus* или *B. juncea*, содержащее в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается клетка растения масличного рапса, такого как растение *B. napus* или *B. juncea*, содержащая в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. В другом варианте осуществления предлагается геномная ДНК растения масличного рапса, такого как растение *B. napus* или *B. juncea*, содержащая по меньшей мере часть генома, например по меньшей мере один трансгенный локус линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант осуществления, кроме того, относится к семенам, клеткам, тканям, культурам тканей, потомству и потомкам растения, содержащего по меньшей мере часть генома NS-B50027-4, выращенного из семени, депонированного в ATCC® под номером доступа PTA-123186. В другом варианте осуществления, кроме того, предлагаются растения, которые могут быть получены (например, путем размножения или разведения) из растения канолы, содержащего по меньшей мере часть генома NS-B50027-4 (такого как растение, выращенное из семени, депонированного в ATCC® под номером доступа PTA-123186).

Эталонное семя инбредной линии NS-B50027-4 согласно настоящим вариантам осуществления было депонировано в ATCC® под номером доступа PTA-123186. По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается семя NS-B50027-4, депонированное под номером доступа PTA-123186, которое вырастает в растение канолу, семя которого при обычном сборе содержит по меньшей мере около 5% ДНА, около 6% ДНА, около 7% ДНА, около 8% ДНА, около 9% ДНА, около 10% ДНА, около 11% ДНА, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около 14% ДНА, около 15% ДНА, 16% ДНА, включая количества между указанными значениями и при указанных значениях, или более ДНА, представленные в массовом проценте (мас.%) от общего содержания жирных кислот в семени.

По меньшей мере в одном варианте осуществления семя, депонированное в ATCC® под номером доступа PTA-123186, представляет собой партию семян, состоящую по меньшей мере приблизительно на 95% из инбредных трансгенных семян, содержащих трансгены элитного события NS-B50027-4, которые вырастают в растение канолу, семена которого содержат по меньшей мере 5% ДНА, около 6% ДНА, около 7% ДНА, около 8% ДНА, около 9% ДНА, около 10% ДНА, около 11% ДНА, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около 14% ДНА, около 15% ДНА, около 16% ДНА, включительно, или более ДНА, в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени.

Семя, депонированное в ATCC® под номером доступа PTA-123186, представляет собой партию семян, состоящую по меньшей мере приблизительно на 95% или более чем на 95% из трансгенных семян, гомозиготных по трансгенной ДНК и содержащих элитное событие NS-B50027-4, которые вырастают в растение канолу, семена которого содержат по меньшей мере около 5% LC-PUFA, около 6% LC-PUFA, около 7% LC-PUFA, около 8% LC-PUFA, около 9% LC-PUFA, около 10% LC-PUFA, около 11% LC-PUFA, около 12% LC-PUFA, около 13% LC-PUFA, около 14% LC-PUFA, около 15% LC-PUFA, около 16% LC-PUFA, около 17% LC-PUFA, около 18% LC-PUFA, около 19% LC-PUFA, около 20% LC-PUFA включительно или более LC-PUFA в виде суммы EPA, DPA и ДНА в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени. Семя или масло семени этой линии может содержать примерно 20-35 мас.% LC-PUFA включительно.

По меньшей мере в одном варианте осуществления предлагается партия семян гибридного семени, полученного путем скрещивания мужской стерильной канолы или линии Brassica со второй линией канолы или Brassica, обе из которых являются гомозиготными по элитному событию NS-B50027-4, при этом гибридное семя содержит по меньшей мере около 5% ДНА, около 6% ДНА, около 7% ДНА, около 8% ДНА, около 9% ДНА, около 10% ДНА, около 11% ДНА, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около

14% DHA, около 15% DHA, около 16% DHA, около 17% DHA, около 18% DHA, около 19% DHA, около 20% DHA включительно или более DHA в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени.

В одном аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается семя или потомство семени, которое можно получить или которое получено из депонированного семени, культивированного и скрещенного по меньшей мере один раз с другой канолой или Brassica (например, интрогрессия другой канолой или растением Brassica с таким же или другим генетическим фоном), при этом семя можно высеять и культивировать, и при этом семя, полученное от такого потомства, может иметь по существу такой же фенотип (признак) масла семян, как у NS-B50027-4. В некоторых вариантах осуществления относительные доли содержания жирных кислот в семени или масле семени такого семени потомства являются сходными с таковыми для NS-B50027-4, но с более высоким выходом, чем NS-B50027-4. В некоторых вариантах осуществления такое семя или масло семени потомства может содержать более высокую долю LC-PUFA, например EPA, DPA или DHA, чем в семени NS-B50027-4. В некоторых вариантах осуществления такое семя потомства может содержать соотношения не-LC-PUFA, например олеиновой, линолевой, пальмитолеиновой, вакценовой или линоленовой кислот, отличающиеся от их содержания в семени или в масле семени NS-B50027-4. В некоторых вариантах осуществления при обычном сборе содержание жирных кислот в семени потомства, происходящем из NS-B50027-4, составляет по меньшей мере 5% DHA, около 6% DHA, около 7% DHA, около 8% DHA, около 9% DHA, около 10 % DHA, около 11% DHA, около 12% DHA, около 13% DHA, около 14% DHA, около 15% DHA, около 16% DHA, около 17% DHA, около 18% DHA, около 19% DHA, около 20 % DHA, около 21% DHA, около 22% DHA, около 23% DHA, около 24% DHA, около 25% DHA, около 26%, около 27% DHA, около 28% DHA, около 29% DHA, около 30% DHA включительно или более DHA, в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени. Например, семя такого потомства может содержать 20-35% DHA включительно в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени. В некоторых вариантах осуществления при обычном сборе содержание жирных кислот в таком семени потомства, происходящем из NS-B50027-4, составляет по меньшей мере около 5% LC-PUFA, около 6% LC-PUFA, около 7% LC-PUFA, около 8% LC -PUFA, около 9% LC-PUFA, около 10% LC-PUFA, около 11% LC-PUFA, около 12% LC-PUFA, около 13% LC-PUFA, около 14% LC-PUFA, около 15% LC -UFA, около 16% LC-PUFA, около 17% LC-PUFA, около 18% LC-PUFA, около 19% LC-PUFA, около 20% LC-PUFA, около 21% LC-PUFA, около 22% LC- PUFA, около 23% LC-PUFA, около 24% LC-PUFA, около 25% LC-PUFA, включительно, или более LC-PUFA, в виде суммы EPA, DPA и DHA в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени. Например, семя такого потомства может содержать около 20-40% LC-PUFA (в мас.% от общего содержания жирных кислот) включительно.

По меньшей мере в одном варианте осуществления семя NS-B50027-4 содержит существенно больше $\omega 3$ ALA, чем обычные сорта канолы. Например, при обычном сборе содержание жирных кислот в семени NS-B50027-4 или его потомства составляет по меньшей мере около 15% ALA, около 15% ALA, около 17% ALA, около 18% ALA, около 19% ALA, около 20% ALA, около 21% ALA, около 22% ALA, около 23% ALA, около 24% ALA, около 25% ALA, около 26% ALA, включительно, или более ALA в мас.% от общего содержания жирных кислот в семени.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается масло с выгодными уровнями жирной кислоты $\omega 3$ и жирной кислоты LC- $\omega 3$, при этом состав жирных кислот содержит более высокое отношение жирных кислот $\omega 3:\omega 6$ по сравнению с обычным коммерческим маслом канолы. Например, в одном варианте осуществления масло семени из NS-B50027-4 имеет отношение EPA/DPA/DHA($\omega 3$):LA($\omega 6$) около 1,25. Для сравнения масло семени из AV Jade (которое не содержит EPA/DPA/DHA) имеет отношение $\omega 3:\omega 6$, равное около 0,5. Кроме того, масло из родительской линии AV Jade не содержит DHA, поэтому не имеет отношения DHA:LA; в то время как иллюстративное масло из NS-B50027-4 имеет отношение DHA:LA, равное около 1,05; по сравнению с маслом из выращенного на ферме лосося, которое имеет отношение DHA:LA около 0,908. Соотношения жирных кислот $\omega 3$ из NS-B50027-4 являются особенно предпочтительными в отношении пальмитиновой кислоты. В частности, масло из родительской линии AV Jade не содержит DHA и поэтому не имеет отношения DHA:пальмитат; в противоположность этому, образцовое масло из NS-B50027-4 имеет отношение DHA:пальмитат, равное около 2,12; для сравнения масло из выращенного на ферме лосося имеет отношение DHA:пальмитат, равное около 0,59, и масло из дикого лосося имеет отношение DHA:пальмитат, равное около 1,02. По меньшей мере в одном варианте осуществления отношение жирных кислот $\omega 3:\omega 6$ в масле семян NS-B50027-4 составляет около 3-7 включительно, например отношение жирных кислот $\omega 3:\omega 6$ составляет около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5 или около 7. Потомство, гибрид, растения, полученные путем интрогрессивной гибридизации и другие такие растения, происходящие из NS-B50027-4, имеют сходные или выгодные соотношения $\omega 3:\omega 6$.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления масло, липид, $\omega 3$ -FA, LC-PUFA или DHA из семени инбредной линии NS-B50027-4 или потомства, происходящего от него, используют в качестве пищевого продукта или в пищевом продукте (продукт питания или пищевой материал, включая напитки) или в качестве биологически активных пищевых добавок (добавок к пищевым продуктам) для людей или животных. По меньшей мере в одном варианте осуществления масло, липид, $\omega 3$ -FA, LC-PUFA или DHA

из семени события NS-B50027-4 используют для дополнения пищи или пищевых добавок для применения в аквакультуре. По меньшей мере в одном варианте осуществления масло, липид, ω 3-FA, LC-PUFA или DHA из семени инбредной линии NS-B50027-4 используют в качестве фармацевтической композиции или в фармацевтической композиции. В других вариантах осуществления такое масло, липид, ω 3-FA, LC-PUFA, ω 3 LC-PUFA или DHA получают из линий, выведенных из NS-B50027-4.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления муку или белок, полученный из муки семени, полученной из семени инбредной линии NS-B50027-4 или потомства, полученного из него, используют в качестве пищевого продукта (продукт питания или пищевой материал) или в качестве пищевых добавок (добавок к пище) для людей или животных. По меньшей мере в одном варианте осуществления муку, произведенную из семени NS-B50027-4 или потомства, полученного из него, используют в качестве добавки к корму или кормовых добавок для использования в аквакультуре. По меньшей мере в одном варианте осуществления белок, произведенный из семени NS-B50027-4 или потомства, полученного из него, используют для дополнения корма или кормовых добавок для использования в аквакультуре.

В одном аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается способ увеличения LC-PUFA в растении путем обеспечения (например, путем генетической трансформации или разведения) растения множественными копиями генетических конструкций, экспрессирующих некоторые "front end" ферменты пути биосинтеза LC-PUFA. Например, хотя не все из ферментов Δ 6-десатураз, Δ 5-десатураз, Δ 5-элонгаз и ω 3/ Δ 15-десатураз могут рассматриваться исключительно как "front end" десатуразы или элонгазы, в конкретных вариантах осуществления эти гены собраны в искусственный локус, усиливающий продукцию LC-PUFA, например EPA, DPA или DHA, в трансгенном растении, которое экспрессирует другие гены, необходимые для синтеза LC-PUFA. В конкретных вариантах осуществления искусственный локус, содержащий некоторые "front end" гены, включает по меньшей мере одну из Δ 6-десатуразы, происходящей из *Micromonas pusilla*, Δ 5-элонгазы, происходящей из *Pyramimonas cordata*, Δ 5-десатуразы, происходящей из *Pavlova salina*, или Δ 15/ ω 3-десатуразы, происходящей из *Pichia pastoris*. В конкретных вариантах осуществления искусственный локус, содержащий некоторые "front end" гены пути биосинтеза LC-PUFA, содержит Δ 6-десатуразу, происходящую из *Micromonas pusilla*, Δ 5-элонгазу, происходящую из *Pyramimonas cordata*, Δ 5-десатуразу, происходящую из *Pavlova salina*, и Δ 15/ ω 3, происходящую из *Pichia pastoris*. В конкретном варианте осуществления эта трансгенная вставка их четырех генов сегрегирована из NS-B50027-4 (например, путем ауткроссинга хромосомы A02) и введена в линию растения-реципиента с использованием стандартных методов разведения растений.

В одном из аспектов описанных вариантов осуществления предлагается новая линия разведения канолы, обозначенная NS-B50027-4, и растение масличного рапса, такое как *Brassica napus* L. или *B. juncea*, содержащее в своем ядерном геноме элитное событие NS-B50027-4. Растения канолы, содержащие генетическое событие линии NS-B50027-4, способны к специфичной для семени продукции жирных кислот, которые содержат больше LC-PUFA, чем жирные кислоты, продуцируемые у обычных растений канолы. Растения канолы инбредной линии NS-B50027-4 демонстрируют другие агрономические продуктивные признаки, которые по существу эквивалентны нетрансгенным изогенным линиям растения канолы; но такие признаки отличаются от других линий, чтобы обеспечить независимую линию или культивар, обозначенный NS-B50027-4. Репрезентативный образец семени инбредной линии канолы NS-B50027-4 депонирован в ATCC® и получил номер доступа PTA-123186.

По меньшей мере один вариант осуществления относится к трансгенным семенам канолы, растениям или частям растений, их тканям или клеткам, имеющим стабильно интегрированную в геном по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии, содержащую шестнадцать гетерологичных генов, при этом трансгены оптимизированы по кодонам для экспрессии растения и кодируют Δ 4-десатуразу, происходящую из *Pavlova salina*, Δ 5-десатуразу, происходящую из *Pavlova salina*, Δ 5-элонгазу, происходящую из *Pyramimonas cordata*, Δ 6-десатуразу, происходящую из *Micromonas pusilla*, Δ 6-элонгазу, происходящую из *Pyramimonas cordata*, Δ 12-десатуразу, происходящую из *Lachancea kluyveri*, Δ 15/ ω 3-десатуразу, происходящую из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один участок прикрепления к матриксу (MAR), происходящий из *Nicotiana tabacum*, и селектируемый маркерный ген; и по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии, содержащую четыре гетерологичных гена, при этом трансгены оптимизированы по кодонам для экспрессии растения и кодируют трансгены Δ 6-десатуразу, происходящую из *Micromonas pusilla*, Δ 5-элонгазу, происходящую из *Pyramimonas cordata*, Δ 5-десатуразу, происходящую из *Pavlova salina*, Δ 15/ ω 3-десатуразу, происходящую из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один MAR, происходящий из *Nicotiana tabacum*. Инбредная трансгенная линия NS-B50027-4 иллюстрирует этот вариант осуществления, и репрезентативный образец семян с этими гетерологичными генами депонирован в ATCC® под номером доступа PTA-123186.

Кроме того, в одном аспекте настоящих вариантов осуществления предлагаются способы идентификации трансгенного растения, или его клеток или тканей, содержащих трансгенный признак (элитное событие) инбредной линии канолы NS-B50027-4, при этом указанный способ основан на идентификации присутствия характерных молекул ДНК, которые имеют определенные нуклеотидные последовательности или кодируют конкретные аминокислоты. Например, такие характерные молекулы ДНК содержат

последовательности длиной по меньшей мере 15 п.о. (пар оснований), по меньшей мере 20 п.о., по меньшей мере 30 п.о. включительно, которые содержат сайт встраивания или присоединения события, т.е. фрагмент встроенной чужеродной ДНК, содержащей гены синтеза жирной кислоты LC- ω 3, и фрагмент генома канолы (5'- или 3'-фланкирующие области для каждой вставки), состыкованные друг с другом, что дает возможность специфической идентификации NS-B50027-4. В качестве другого примера этого аспекта, в способе идентификации NS-B50027-4 может быть использован набор праймеров для идентификации ряда трансгенов и фланкирующих областей. Варианты осуществления также относятся к растениям, идентифицированным способами, описанными в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предлагаются композиции, полезные в анализах PCR с конкурентными аллелями (в которых два аллель-специфических прямых праймера распознают SNP), в анализах методом цифровой капельной PCR (ddPCR), анализах методом количественной PCR (qPCR), паралог-специфических анализах и в анализах для тестирования случайного присутствия (AP). Конкретные варианты осуществления праймеров, полезных для проведения анализов KASP для детекции генетических признаков NS-B50027-4, особенно полезных в исследованиях интрогрессии и развитии гибридов, включают праймеры, представленные в SEQ ID NO: 1-90, или их комплементы. По меньшей мере некоторые из этих праймеров или их комплементов могут быть включены в набор для идентификации NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4, или других растений или растительных материалов, содержащих по меньшей мере частичный геном NS-B50027-4.

В родственном аспекте предлагается геномная ДНК, полученная или происходящая из растений, содержащих по меньшей мере часть геномной ДНК линии NS-B50027-4, в частности, области генома, включающие трансгены или их области соединения. Такая геномная ДНК может быть использована, например, в качестве референсного контрольного материала в описанных в настоящем документе идентификационных анализах.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схема, на которой показаны ферменты, введенные в трансгенные растения для обеспечения пути биосинтеза для синтеза ДНА.

На фиг. 2 показан график выхода зерна, построенный в зависимости от прогнозируемого уровня ДНА, в кг/га, по восьми участкам культивирования. ♦ обозначает ДНА, кг/га; — обозначает прямую линию ДНА кг/га; $y=29,296x+2,8315$; $R^2=0,8567$.

На фиг. 3 показан график выхода зерна в зависимости от прогнозируемого уровня LC-PUFA (EPA, DPA и ДНА) в кг/га по восьми участкам. ♦ обозначает LC-PUFA в кг/га; — обозначает прямую линию LC-PUFA в кг/га; $y=34,043x+3,4049$; $R^2=0,8636$.

На фиг. 4 показана блок-схема, которая описывает возможную обработку и потоки продуктов из собранного семени трансгенной канолы, которое содержит жирные кислоты ω 3. Прямоугольники с закругленными краями обозначают продукты или фракции процесса; овалы обозначают стадии обработки; прямоугольники с острыми углами обозначают возможное применение продукта.

Подробное описание

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, реагентами и т.д., описанными в настоящем документе, и, следовательно, может варьировать. Приведенная в настоящем документе терминология используется исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не ограничивает объем настоящего изобретения, который задается исключительно формулой изобретения.

Содержание всех обозначенных патентов и других публикаций включено в текст настоящего документа путем ссылок с целью описания и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением, но не должны давать определения терминов, несовместимых с теми, которые представлены в настоящем документе. Эти публикации приведены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этой связи не должно истолковываться как признание того, что авторы изобретения не имеют права датировать задним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения или по каким-либо другим причинам. Все утверждения, касающиеся даты представления или содержания этих документов, основываются на информации, доступной для заявителей и не содержат признания истинности дат или содержания этих документов.

Используемые в настоящем документе и в формуле изобретения формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественное число, если в контексте явно не указано иное. Во всем этом описании, если не указано иное, "содержать", "содержит" и "содержащий" используются включительно, а не исключительно, так что указанное целое число или группа целых чисел может включать одно или несколько других неуказанных целых чисел или групп целых чисел. Термин "или" является включительным, если не изменен, например, словом "оба". Таким образом, если контекст не указывает иное, слово "или" означает любой один член определенного списка, а также включает в себя любую комбинацию членов данного списка.

Все величины являются приблизительными, так как существует некоторое колебание в композиции

жирных кислот из-за условий окружающей среды. Величины, как правило, выражаются в массовых процентах от общего содержания жирных кислот или массовых процентах от всего семени. Соответственно, кроме случаев рабочих примеров или случаев, когда указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином "примерно", если не указано иное; "примерно" относится, как правило, к отклонению на $\pm 1\%$ от указанного значения, но может допускать отклонение на ± 5 или $\pm 10\%$ от указанного значения, принятого в соответствующем контексте специалистом в данной области.

Технологии рекомбинантной ДНК могут быть применены в соответствии со стандартными протоколами, известными в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: Lab. Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, NY (1989); Ausubel et al., *Current Protocols Molec. Biol.* (1994 and updates); *DNA Cloning: Practical Approach*, vols. 1-4 (Glover & Hames, Eds., IRL Press 1995, 1996), Croy, *Plant Molec. Biol. Labfax* (BIOS Sci. Pub. Ltd. & Blackwell Sci. Pub., UK, 1993); WO 2015089587.

Заголовки приведены только для удобства и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, как они обычно понимаются специалистом в данной области. Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предполагает ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения. Для более легкого понимания настоящего изобретения сначала будут определены некоторые термины. Дополнительные определения изложены далее по всему подробному описанию.

Определения.

"Линия" представляет собой группу растений, которые проявляют очень незначительное общее различие между особями, к которым относится это обозначение. Также "линия" относится к гомогенной группе растений, несущих по существу одинаковый генетический материал, которые проявляют незначительное генетическое различие или его отсутствие между особями по меньшей мере по одному признаку. "Сорт" или "культвар" могут использоваться взаимозаменяемо с "линией", но, как правило, первые два термина относятся к линии, которая является пригодной для коммерческого производства. В данной заявке "генетически наследуемый", как используют, например, во фразе "генетически наследуемый от родительских линий", означает, что рассматриваемый признак полностью или частично обусловлен свойствами генетического состава рассматриваемого растения.

Используемый в настоящем документе термин "Brassica" относится к растениям семейства Brassicaceae. Растение Brassica может принадлежать к одному из видов *Brassica napus*, *B. rapa* (или *campestris*) или *B. juncea*. В качестве альтернативы растение может принадлежать к видам, полученным в результате скрещивания этих видов Brassica, таким как *B. napo campestris*, или в результате искусственного скрещивания одного из этих видов Brassica с другими видами Cruciferaeae. Термин "плоидность" используется для определения, является ли число хромосом, демонстрируемых культиваром, диплоидным или тетраплоидным. Поскольку *Brassica napus* является аллотетраплоидом (амфидиплоидом), полученным путем скрещивания и удержания обоих геномов *Brassica rapa* (ранее *B. campestris*) и *B. oleracea*, растение *Brassica napus*, содержащее трансгенное событие NS-B50027-4, можно использовать с помощью различных или общепринятых способов разведения для введения события NS-B50027-4 и, таким образом, "признака" продукции жирных кислот LC- $\omega 3$ или увеличения экспрессии жирных кислот LC- $\omega 3$, как описано в настоящем документе, в другие члены рода Brassica. Соответственно примеры членов рода Brassica, полезных для осуществления на практике настоящих вариантов осуществления, включают, но без ограничения, *B. juncea*, *B. napobrassica*, *B. oleracea*, *B. carinata*, *B. napus*, *B. rapa* и *B. campestris*, а также любые другие растения, принадлежащие роду Brassica, которые допускают разведение между видами Brassica.

Обычно "масличное растение" относится к любому из видов *B. napus*, *B. rapa* (или *campestris*) или *B. juncea*.

Растение *Brassica napus* обычно известно как рапсовое семя или масличный рапс, и определенные культивары могут называться канолой. Используемый в настоящем документе термин "канола" или "растение канола" относится к растению Brassica, которое можно использовать для производства масла канолы (т.е. масло, отвечающее определенному требованию качества, предусматривающему содержание эруковой кислоты менее 2%) и включает сорта *B. napus*, *B. napobrassica*, *B. rapa*, *B. juncea* и *B. campestris*. Растения канолы являются амфидиплоидами (также называемыми аллотетраплоидами), которые относятся к межвидовому гибриду, имеющему полный диплоидный набор хромосом от каждой родительской формы, обычно обозначаемый геномом ААСС.

Как правило, термины "канола" и "растение канола" относятся к *Brassica napus*, но включают все сорта растений, которые можно скрещивать с канолой. Термины "канола" и "растение канола" также включают части растений. "Масло канолы" должно содержать менее 2% эруковой кислоты ($\Delta 13$ -22:1) и менее 30 мкмоль глюкозинолатов/г высушенного на воздухе, не содержащего масла, твердого семени канолы (т.е. муки). См., например, *Codex Alimentarius: Fats, Oils & Related Products*, vol. 8 (2nd ed., Food & Agriculture Org. United Nations, Rome, Italy, 2001).

"Часть растения" включает растительные клетки, органы растения, протопласты растения, культуру ткани растительной клетки, из которой можно регенерировать растения, каллюсы растений, растительные массы и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семяпочки, семена, семечки, листья, цветки, ветви, плод, стебли, корни, концы корней, пыльники, семядоли, гипокотили, первичные корешки, отдельные клетки, гаметы, клеточные культуры, культуры тканей и т.п. Семядоля представляет собой тип листка семени; маленький листок, содержащийся на зародыше растения. Семядоля содержит ткани для хранения питательных веществ семени. Зародыш представляет собой небольшое растение, содержащееся в зрелом семени. "Растительные клетки" также включают нерегенерируемые растительные клетки. Потомство, производные, варианты и мутанты регенерированных растений также включены в объем настоящих вариантов осуществления, при условии, что эти части содержат по меньшей мере некоторые молекулы нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4, обычно один или два из двух локусов элитного события NS-B50027-4. Настоящие варианты осуществления также относятся к применению трансгенов элитного события NS-B50027-4 в культуре клеток и культуре ткани растений. Варианты осуществления включают растения и части растений из линии элитного события NS-B50027-4, а также другие растения, полученные с помощью описанных способов, которые добавляют к генетической структуре NS-B50027-4, или потомство, которое содержит по меньшей мере один из двух трансгенных локусов NS-B50027-4.

"Аллель" является альтернативной формой гена, которая относится к одному признаку или характеристике. В диплоидной клетке или организме два аллеля данного гена занимают соответствующие локусы на паре гомологичных хромосом.

"Локус" наделяет одним или несколькими признаками, такими как, например, модифицированный метаболизм жирных кислот, модифицированный метаболизм фитиновой кислоты, модифицированный метаболизм углеводов, мужская стерильность, устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к болезням или модифицированный метаболизм белков. Признак может быть, например, обусловлен встречающимся в природе геном, введенным в геном линии путем возвратного скрещивания, природной или индуцированной мутации, или трансгеном, введенным посредством методов генетической трансформации. Локус может содержать один или несколько аллелей, интегрированных в одну хромосомную локализацию. "Локус количественного признака" (QTL) относится к участку ДНК (локусу), который коррелирует с вариабельностью фенотипа (количественный признак). QTL часто связан или содержит гены, которые контролируют этот фенотип. QTL картируются путем идентификации того, какие молекулярные маркеры (такие как SNP или AFLP) коррелируют с наблюдаемым признаком.

"Процентная идентичность" относится к сравнению гомозиготных аллелей двух сортов канолы или Brassica. Процент идентичности определяется путем сравнения статистически значимого числа гомозиготных аллелей двух развитых сортов. Например, процентная идентичность, равная 90%, между NS-B50027-4 и второй Brassica означает, что две Brassica имеют одинаковые аллели в 90% их локусов. Что касается определенной молекулы ДНК или белка, процентная (%) идентичность, минимальная процентная (%) идентичность идентифицированной последовательности (SEQ ID NO) означает нуклеотидную последовательность, которая является по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 76%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,1%, по меньшей мере на 99,2%, по меньшей мере на 99,3%, по меньшей мере на 99,4%, по меньшей мере на 99,5%, по меньшей мере на 99,6%, по меньшей мере на 99,7%, по меньшей мере на 99,8% или по меньшей мере на 99,9% включительно идентичной соответствующей представленной последовательности, обозначенной SEQ ID NO.

Вырожденность генетического кода допускает возможность большего диапазона процентной (%) идентичности для полинуклеотидных последовательностей, чем может быть обычно приемлемо для белков, из-за множества нуклеотидных комбинаций, которые могут кодировать данный белок. Кроме того, аминокислотная замена создает возможность для многих несущественных изменений в первичной аминокислотной структуре белка, например аминокислотные замены, которые не нарушают ферментативную функцию. Кроме того, полинуклеотиды могут обладать при сравнении с природными молекулами одной или несколькими мутациями, которые представляют собой делеции, вставки или замены нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды, которые имеют мутации по сравнению с эталонной последовательностью, могут быть либо встречающимися в природе (т.е. выделенными из природного источника), либо синтетическими (например, путем выполнения сайт-направленного мутагенеза или перетасовки ДНК).

Как правило, "событием" называют искусственный генетический локус, который в результате генетической манипуляции несет чужеродную ДНК содержащую представляющий интерес ген или гены (трансген(ы)). Типичные аллельные состояния события представляют собой наличие или отсутствие чужеродной ДНК. Событие может быть охарактеризовано фенотипически экспрессией одного или нескольких трансгенов. На генетическом уровне событие является частью генетической структуры растения. На молекулярном уровне событие может быть охарактеризовано рестрикционной картой,

5'-(апстрим) или 3'-(даунстрим) фланкирующими последовательностями трансгена(ов) или молекулярной конфигурацией трансгена(ов). Как правило, трансформация клеток растения или частей растения с помощью трансформирующей ДНК приводит к огромному количеству событий, каждое из которых является уникальным.

Термин "ген" относится к молекуле ДНК, как правило, содержащей несколько оперативно связанных участков ДНК, таких как промотор и 5'-нетранслируемая область (5'UTR или 5'-некодирующие последовательности), которые вместе образуют промоторную область; кодирующая область (которая может кодировать или может не кодировать белок); и 3'-нетранслируемая область (3'UTR или 3'-некодирующие последовательности), содержащая сайт полиаденилирования. Обычно в растительных клетках 5'UTR, кодирующая область и 3'UTR транскрибируются в молекулу РНК, которая в случае белок-кодирующего гена транслируется в белок. Таким образом, "кодирующая последовательность" относится к последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, обеспечивающей кодоны, которые транслируют (через матричную информационную РНК, рибосомный и связанный аппарат трансляции) определенную последовательность аминокислот. Ген может включать дополнительные участки ДНК, такие как, например, интроны. "Генотип" относится к генетической конституции клетки или организма. "Генетический локус", как правило, представляет собой положение заданного гена или набора генов в геноме растения.

Термин "трансген" относится к представляющему интерес гену, который был введен в геном растения. Соответственно "трансгенное растение" содержит по меньшей мере один трансген в геноме всех своих клеток. Трансгены согласно настоящим вариантам осуществления содержат по меньшей мере одну копию следующих ферментов, экспрессируемых в ходе биосинтеза LC-PUFA в линии NS-B50027-4: $\Delta 4$ -десатураза, происходящая из морской микроводоросли *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -десатураза, происходящая из *P. salina*, $\Delta 5$ -элонгаза, происходящая из микроводоросли *Rhizomonas cordata*, $\Delta 6$ -десатураза, происходящая из микроводоросли *Micromonas pusilla*, $\Delta 6$ -элонгаза, происходящая из *P. cordata*, $\Delta 12$ -десатураза из дрожжей *Lachancea kluyveri* и $\Delta 15/\omega 3$ -десатураза, происходящая из дрожжей *Pichia pastoris*. Альтернативно или дополнительно трансгены согласно настоящим вариантам осуществления содержат $\Delta 5$ -десатуразу, происходящую из *P. salina*, $\Delta 5$ -элонгазу, происходящую из *P. cordata*, $\Delta 6$ -десатуразу, происходящую из *M. pusilla*, и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу, происходящую из *P. pastoris*. Трансгены NS-B50027-4 расположены бинарным образом в кассетах экспрессии, которые включают соответствующие регуляторные области. Трансгены NS-B50027-4, описанные выше, являются искусственными в том смысле, что они были сконструированы с использованием стратегии оптимизации кодонов и, таким образом, трансгены иначе не существуют в природе. Трансгенная кассета экспрессии включала по меньшей мере один участок прикрепления к матриксу (MAR) из *Nicotiana tabacum*. Трансгенная кассета также включала селективируемый маркерный ген. См., например, WO 2013/185184; US 2015/0166928; PCT/US2017/___, поданная 16 июня 2017 г., в которой испрашивается приоритет предварительной заявки США 62/351246.

Термин "чужеродный" или "гетерологичный", когда речь идет о гене или молекуле ДНК в отношении видов растений, означает, что ген или молекула ДНК, или ее часть (например, конкретный участок) в природе не обнаруживается в этих видах растений или в природе не обнаруживается в этом генетическом локусе в этих видах растений. Термин "чужеродная ДНК" также относится к молекуле ДНК, которая будет или была введена в геном растения в результате трансформации. В контексте данного раскрытия трансген, трансгенная кассета или трансгенная кассета экспрессии содержит по меньшей мере одну чужеродную или гетерологичную ДНК.

Термин "химерный", когда речь идет о гене или молекуле ДНК, используется для обозначения того, что ген или молекула ДНК содержит по меньшей мере два функционально значимых участка ДНК (таких как промотор, 5'UTR, кодирующая область, 3'UTR, интрон), которые в природе не связаны друг с другом и происходят из разных источников, таким образом, что по меньшей мере один участок ДНК является чужеродным другому участку ДНК в химерной молекуле ДНК.

Термины "плазмида" или "вектор" относятся к внехромосомному элементу, часто несущему гены, которые не являются частью центрального метаболизма клетки, и обычно имеющему форму кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, интегрируемыми в геном последовательностями, фаговыми или нуклеотидными последовательностями, линейными или кольцевыми, одно- или двухцепочечных ДНК или РНК, выделенными из любого источника, в которых ряд нуклеотидов были соединены или рекомбинированы в уникальную конструкцию, способную вводить в клетку, например, экспрессионную кассету. В отношении трансгенных растений, такие плазмиды или векторы могут содержать участки Т-ДНК, которые облегчают введение трансгена(ов) в геном растения.

"Экспрессионная кассета" относится к генетической конструкции, содержащей трансген и имеющей элементы дополнительно к чужеродному гену, которые обеспечивают возможность экспрессии этого гена в чужеродном хозяине (например, 5'-промоторная (необязательно с энхансером) нетранслируемая область ("UTR") ДНК, ДНК, кодирующая выбранный генный продукт, и соответствующая 3'-UTR ДНК); и может относиться к кассете до и после вставки в геном растения. Другими словами, трансгенная встав-

ка содержит экспрессионную кассету. Соответственно "вставка ДНК" относится к гетерологичной ДНК, введенной в растительный материал посредством процесса трансформации, и включает ДНК (которая отличается от исходной/дикого типа/нативной) ДНК, используемой для такой трансформации, как описано в настоящем документе. Вставка ДНК обычно представляет собой трансгенную экспрессионную кассету.

"Трансформирующая ДНК" относится к рекомбинантной молекуле ДНК, используемой для трансформации, например экспрессионному вектору. Трансформирующая ДНК обычно содержит по меньшей мере один "представляющий интерес ген" (например, химерный ген), который способен наделять трансформированное растение одной или несколькими специфическими характеристиками.

"Трансформация" относится к переносу молекулы нуклеиновой кислоты в организм хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой, например, плазмиду, которая реплицируется автономно, или она может интегрироваться в геном организма-хозяина. Организмы-хозяева, содержащие фрагменты трансформированной нуклеиновой кислоты, называются как "трансгенные" или "рекомбинантные", или "трансформированные" организмы.

Термин "рекомбинантная молекула ДНК" используется для иллюстрации и, таким образом, может включать выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая может представлять собой ДНК и которая может быть получена с помощью рекомбинантных или других методов, таких как синтез синтетической ДНК или PCR. PCR (полимеразная цепная реакция) представляет собой реакцию, в которой идентичные копии целевого полинуклеотида получают с использованием праймеров, состоящих из "апстрим" и "даунстрим" праймера, и катализатора полимеризации, такого как ДНК-полимераза, и обычно термически стабильного фермента полимеразы. Способы PCR известны в данной области. См., например, PCR (McPherson & Moller, eds., BIOS Sci. Publ. Ltd., Oxford, 2000). PCR может быть выполнена на геномной ДНК или кДНК.

"Пригодные регуляторные элементы" или "пригодные регуляторные последовательности" относятся к полинуклеотидам, предшествующим (например, 5'UTR), расположенным внутри или следующим (3'UTR) за кодирующей областью, которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК, или трансляцию ассоциированной кодирующей области. Регуляторные элементы могут включать промоторы, энхансерные элементы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности узнавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффектора и структуру стебель-петля.

"Промотор" относится к элементу ДНК, способному контролировать экспрессию кодирующей области или функциональной РНК. В общем кодирующая область расположена со стороны 3'-конца от промоторного элемента. Промоторы могут быть выделены целиком из нативного гена или могут быть составлены из разных элементов, выделенных из разных промоторов, встречающихся в природе, или даже включать синтетические сегменты ДНК. Специалистам в данной области понятно, что разные промоторы могут направлять экспрессию гена в разных тканях или типах клеток или на разных стадиях развития, или в ответ на разные окружающие или физиологические условия. Промоторы, вызывающие экспрессию гена в большинстве типов клеток, в большинстве случаев обычно называются "конститутивными промоторами". Принято считать, что, поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных элементов не были полностью определены, фрагменты ДНК разной длины могут обладать идентичной промоторной активностью.

Термины "3'-некодирующие последовательности" и "терминатор транскрипции" или "3'-нетранслируемый участок (UTR)" относятся к элементам ДНК, расположенным справа (3') от кодирующей области молекулы ДНК. Они включают последовательности распознавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию гена. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием на добавление хвостов полиадениловой кислоты к 3'-концу прекурсора мРНК. 3'-область может влиять на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей области.

"Оперативно связанный" относится к ассоциации элементов нуклеиновой кислоты в одной молекуле нуклеиновой кислоты или ее фрагменте таким образом, что один из них влияет на функцию другого. Например, промотор оперативно связан с кодирующей областью, если он способен влиять на экспрессию этой кодирующей области (т.е. кодирующая область находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие области могут быть оперативно связаны с регуляторными элементами в смысловой или антисмысловой ориентации.

"Мутагенез" представляет собой процесс, в котором к растительному материалу применяют средство, такое как этилметилсульфонат, о котором известно, что оно вызывает мутации в генетическом материале с целью получения новой генетической вариативности в видах и, как правило, ее осуществляют, имея в виду конкретный признак. См. Swanson et al., 7 Plant Cell Rep. 83 (1988). Другие способы включают генерирование мутантов в направлении замены конкретных нуклеотидов или аминокислот (замещения, делеции или добавления). Такие способы проведения замен последовательности нуклеиновой кислоты включены в термин "мутагенез". Мутагенез может быть полезен в экспериментах по "нокауту" для

нарушения генной экспрессии.

"Праймеры" представляют собой относительно короткие полинуклеотиды или олигонуклеотиды, которые комплементарны части амплифицируемого полинуклеотида, например, с помощью полимеразной цепной реакции. Как правило, длина праймера может составлять не более 50 нуклеотидов, например менее чем приблизительно 30 нуклеотидов или менее чем приблизительно 24 нуклеотида.

Используемый в настоящем документе термин "экспрессия" относится к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (мРНК), образующейся из нуклеиновых кислот согласно изобретению. Экспрессия может также относиться к трансляции мРНК в полипептид.

Ссылка на клетку включает растительную клетку независимо от того, является ли она выделенной, содержится в культуре ткани или введена в растение или часть растения, если не указано иное или не ясно из контекста.

"Регенерация" включает отбор из селекционируемого растения или сорта клеток, способных к регенерации (например, семян, микроспор, семяночек, пыльцы, вегетативных частей). Эти клетки необязательно можно подвергать генетической трансформации или мутагенезу, после чего растение развивается из клеток с использованием методов регенерации, опыления или выращивания, основанных на типе генетически модифицированных клеток. Применимые методы регенерации известны специалистам в данной области; см., например, Armstrong & Green, 165 Planta 322 (1985); Close & Ludeman, 52 Planta Sci. 81 (1987).

"Потомство" означает всех потомков, включая потомков и производные растения или растений, и включает первое, второе, третье и последующие поколения, и может образовываться посредством самоопыления или скрещивания с растениями с теми же или другими генотипами, и может быть модифицировано рядом подходящих способов генетической инженерии. Культиген обычно относится к растениям, которые были преднамеренно изменены и отобраны человеком. "T0" относится к первому поколению трансформированного растительного материала, "T1" относится к семенам, полученным от растений T0, семена T1 дают рост растениям, которые производят семена T2 и т.д., до последующего потомства T_x.

"Разведение" включает все способы развития или размножения растений и включает как внутри- и межвидовые, так и внутри- и межлинейные скрещивания, а также все подходящие методы традиционного разведения и искусственного разведения. Желаемые признаки (например, признак DHA NS-B50027-4) могут быть перенесены на другие линии, культивары или культигены канолы или *B. napus*; или посредством традиционных способов разведения, а также могут быть перенесены на другие виды Brassica, такие как *B. juncea* и *B. para*, путем межвидового скрещивания. Общеизвестные способы разведения и способы межвидового скрещивания, а также другие способы переноса генетического материала между растениями хорошо известны в данной области.

"Возвратное скрещивание" представляет собой процесс, при котором селекционер многократно скрещивает гибридное потомство с родительской линией. Например, скрещивание первого поколения гибридов F1 с одним из родительских генотипов гибрида F1 является возвратным скрещиванием. Возвратное скрещивание может быть использовано для введения представляющего интерес признака от родителя-донора (трансгенного родителя) в рекуррентного родителя (элитная линия, подлежащая модификации): родителя-донора скрещивают с рекуррентным родителем; потомство этого скрещивания затем обратно скрещивают с рекуррентным родителем; потомство этих скрещиваний отбирают по интересующему признаку и затем обратно скрещивают с рекуррентным родителем; этот процесс повторяют с таким количеством обратных скрещиваний, которое необходимо для создания линии, в которой рекуррентный родитель является гомозиготным по признаку, переданному от родителя-донора. Возвратное скрещивание также можно сочетать с самоопылением, что может быть предпочтительным при введении рецессивных генов.

"Интрогрессия" представляет собой стабильное включение генов из одного генного пула в другой. "Интрогрессивная гибридизация" относится к включению (обычно путем гибридизации и возвратного скрещивания) аллелей из одного объекта в генный пул второго, отличающегося объекта. Линии с интрогрессиями позволяют изучать локусы количественных признаков, а также обеспечивают средства для включения новых признаков, т.е. признаков NS-B50027-4, в другую канолу или Brassica, такую как *B. napus* или *B. juncea*. Представляющие интерес реципиентные линии включают свободноопыляемые (OP) линии, устойчивые к гербицидам, такие как устойчивые к триазину (TT); Roundup Ready® (RR); пакетированным TT и RR; OP линии, устойчивые к имидазолинону (IMI); или линии восстановителя IMI (Rf); линии с высоким процентным содержанием масла в семенах; оптимальный фон для линий DHA; или линии, выбранные для региональной адаптации. Такие линии могут быть разработаны как гибриды или элитные события. Поскольку существующие изогенные линии канолы демонстрируют потенциальное содержание масла в семенах 45%, интрогрессия локусов NS-B50027-4 может генерировать масло семян, содержащее 20% DHA в общем выходе в таких пакетированных событиях. Дополнительные пакеты событий разведения могут быть выбраны для продукции EPA или DPA. Действительно гены NS-B50027-4 (один или оба локуса) могут быть пакетированы другими трансгенными Brassica, которые содержат по меньшей мере одну вставку из семи или восьми генов (т.е. семь ферментов и необязательно маркер), путем трансформации с помощью того же самого вектора или подобного вектора, используемо-

го для генерирования NS-B50027-4, что приводит, например, к получению растения с тремя локусами, обеспечивающего продукцию LC-PUFA. В качестве альтернативы, как описано далее в настоящем документе, локусы A02 и A05 могут быть сегрегированы из NS-B50027-4, и локус A02 может быть пакетирован в другие линии, продуцирующие LC-PUFA (например, линию с одной вставкой для продукции EPA, DPA или DHA), для увеличения продукции LC-PUFA.

"Устойчивость к болезням", как правило, означает способность растения ограничивать активности определенного вредителя, такого как насекомое, грибок, вирус или бактерия. "Толерантность к болезням" относится к способности растений переносить нарушение, вызванное конкретным вредителем (таким как насекомое, грибок, вирус или бактерия), или неблагоприятное состояние окружающей среды, но все же функционировать и продуцировать несмотря на это нарушение.

"Композиция жирных кислот" или "состав жирных кислот" обычно относится к массовому процентному содержанию различных жирных кислот, присутствующих в эндогенно образованном масле зрелых, цельных, частично высушенных семян. Обычной для данной отрасли практикой является представление композиции жирных кислот в виде процента от площади (нормализация по площади), а не в абсолютных массовых процентах, но первое приблизительно соответствует второму. Абсолютные результаты могут быть рассчитаны с использованием индивидуальных эталонных стандартов известной концентрации и внутреннего стандарта для расчета результатов на основе мг/кг. Также можно использовать поправочные коэффициенты для расчета массы жирных кислот без использования индивидуальных стандартов жирных кислот, хотя внутренний стандарт все равно может потребоваться. Обычно состав жирных кислот определяют путем измельчения семян и экстракции жирных кислот в виде сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME), которые могут быть анализированы на состав жирных кислот различными методами с получением данных в виде процента от площади или данных, из которых может быть извлечен процент от площади. Иллюстративные аналитические подходы включают газовую хроматографию (GC), GC-масс-спектрометрию (GC-MS), жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (LC-MS), ядерный магнитный резонанс (NMR) или отражательную спектроскопию. Общий липид может быть разделен с помощью методов, известных в данной области для очистки фракций, например, таких как фракция TAG. Другие способы характеристики композиций жирных кислот известны специалистам в данной области. См., например, *Canola: Chem., Production, Processing & Utilization* (Daun et al., eds., AOCS Press, Urbana, IL, 2011) (Daun et al., 2011); US 2015/0166928; US 20160002566.

Аналогично "содержание масла" представляет собой типичное массовое процентное содержание масла, присутствующего в зрелых, цельных, частично высушенных семенах (обычно содержащих около 6 или 7% влаги). Процент масла, также называемый как содержание масла, рассчитывается как масса масла, деленная на массу семени при стандартизированном содержании влаги. Содержание масла может являться характеристикой разных сортов растений. Оно может быть определено с использованием различных аналитических методов, таких как ядерный магнитный резонанс (NMR), отражательная спектроскопия (NIR) и экстракция по Сокслету. Например, содержание масла в каноле может быть измерено с помощью методов NMR (Rossell & Pritchard, *Analysis of Oilseeds, Fats & Fatty Foods*, 48-53 (Elsevier Sci. Pub. Ltd, London, 1991) на импульсном приборе NMS 100 Minispec, который одновременно измеряет содержание влаги. Содержание масла в семени также может быть измерено методом NIR-спектроскопии (Li et al., 67 *Phytochem.* 904 (2006)).

Выражения "экстрагированный растительный липид", "выделенный растительный липид", "экстрагированный липид" и т.п. относятся к композициям, содержащим липиды, которые были экстрагированы, например, из измельченного растения или частей растения, таких как семена. Экстрагированный липид может представлять собой относительно сырую композицию, полученную, например, путем измельчения растительного материала, такого как семена; или более очищенную композицию, в которой большая, если не вся часть воды, нуклеиновых кислот, белков или углеводов, происходящих из растительного материала, была удалена из масла. Примеры способов очистки известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления экстрагированный или выделенный растительный липид содержит по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% (мас./мас.) липида по массе композиции. Экстрагированный липид может быть твердым или жидким при комнатной температуре, причем последний рассматривается в настоящем документе как "масло". В некоторых вариантах осуществления экстрагированный липид не смешивали с другим липидом, таким как DHA, продуцируемым другим источником (например, DHA из рыбьего жира). В некоторых вариантах осуществления после экстракции соотношение олеиновой кислоты к DHA, пальмитиновой кислоты к DHA, линолевой кислоты к DHA или общих жирных кислот $\omega 6$ к общим жирным кислотам $\omega 3$ существенно не изменилось (например, отклонение составило не более чем 10 или 5%) по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Другими словами, экстрагированное масло не было обогащено конкретной жирной кислотой, например DHA. В других вариантах осуществления экстрагированный растительный липид не подвергался процедуре, такой как гидрогенизация или фракционирование, которая изменяет соотношение олеиновой кислоты к DHA, пальмитиновой кислоты к DHA, линолевой кислоты к DHA или общих жирных кислот $\omega 6$ к общим жирным кислотам $\omega 3$.

по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Другими словами, экстрагированное масло не было обогащено конкретной жирной кислотой, например, ДНА. Когда экстрагированный растительный липид согласно настоящему изобретению представляет собой масло, указанное масло может, кроме того, содержать молекулы нежирных кислот, таких как стеролы.

Как отмечено выше, выражения "экстрагированное растительное масло" и "выделенное растительное масло" относятся к композициям, содержащим экстрагированный растительный липид или выделенный растительный липид, который представляет собой жидкость при комнатной температуре. Масло получают из растения или его части, такой как семена. Экстрагированное или выделенное масло может представлять собой относительно сырую композицию, полученную, например, путем измельчения семян растения; или более очищенную композицию, в которой большая, если не вся часть воды, нуклеиновых кислот, белков или углеводов, происходящих из растительного материала, была удалена из масла. Композиция может содержать другие компоненты, которые могут представлять собой липид или не липид. В одном варианте осуществления композиция масла содержит по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% (мас./мас.) экстрагированного растительного липида. В одном варианте осуществления экстрагированное масло согласно изобретению не смешивали с другим маслом, таким как ДНА, не продуцируемым другим источником (например, ДНА из рыбьего жира). В одном варианте осуществления после экстракции соотношение олеиновой кислоты к ДНА, пальмитиновой кислоты к ДНА, линолевой кислоты к ДНА или общих жирных кислот $\omega 6$ к общим жирным кислотам $\omega 3$ существенно не изменилось (например, отклонение составило не более чем 10 или 5%) по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. В другом варианте осуществления экстрагированное растительное масло не подвергалось процедуре, такой как гидрогенизация или фракционирование, которая изменяет соотношение олеиновой кислоты к ДНА, пальмитиновой кислоты к ДНА, линолевой кислоты к ДНА или общих жирных кислот $\omega 6$ к общим жирным кислотам $\omega 3$ при сравнении с соотношением в интактном семени или клетке. Экстрагированное растительное масло согласно этим вариантам осуществления может содержать молекулы нежирных кислот, таких как стеролы.

Используемый в настоящем документе термин "масло" представляет собой композицию, содержащую преимущественно липид и которая является жидкостью при комнатной температуре. Например, масло согласно изобретению предпочтительно содержит по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% по массе липидов. Как правило, очищенное растительное масло содержит по меньшей мере 90% триацилглицеринов (TAG) по массе липида в масле. В масле могут присутствовать второстепенные компоненты масла, такие как диацилглицерины (DAG), свободные жирные кислоты (FFA), фосфолипид или стеролы. Пищевое масло, полученное из NS-B50027-4, может характеризоваться одной или несколькими из следующих характеристик: содержание ДНА по меньшей мере около 7% по массе, содержание ДРА по меньшей мере около 1% по массе, содержание ЕРА по меньшей мере около 0,4% по массе, содержание олеиновой/цис-вакценовой кислот около 46% по массе, содержание линолевой кислоты около 8,2% по массе, содержание АЛА по меньшей мере около 19%, объединенное содержание АЛА/арахиновой кислоты/SDA около 21% по массе, объединенное содержание ЕРА/ДРА/ДНА по меньшей мере около 9% (в мас.% от общего содержания жирных кислот). В некоторых вариантах осуществления объединенное содержание ЕРА/ДРА/ДНА составляет около 16%.

Используемый в настоящем документе термин "жирная кислота" относится к карбоновой кислоте, часто с длинным алифатическим хвостом, либо насыщенной, либо ненасыщенной. Как правило, жирные кислоты имеют углерод-углеродную цепь длиной по меньшей мере восемь атомов углерода, например, по меньшей мере 12 атомов углерода, 16 атомов углерода, 18 атомов углерода, 20 атомов углерода, 22 атома углерода или 24 атома углерода. Большинство природных жирных кислот имеют четное число атомов углерода, потому что их биосинтез включает ацетат, который имеет два атома углерода. Жирные кислоты могут находиться в свободном состоянии (неэтерифицированные); в этерифицированной форме, такой как часть триглицерида (TAG), диацилглицерид (DAG), моноацилглицерид; быть связанными ацил-СоА (тиоэфиром) или в другой связанной форме. Жирная кислота может быть этерифицирована в виде фосфолипида, такого как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол или дифосфатидилглицерин.

"Насыщенные жирные кислоты" не содержат углерод-углеродных двойных связей (алкенов) или других функциональных групп вдоль цепи. Таким образом, термин "насыщенные" относится к присутствию водорода при всех возможных атомах углерода (кроме группы карбоновой кислоты $[-COOH]$). Другими словами, в насыщенной жирной кислоте омега (ω) конец (также называемый n-концом) жирной кислоты содержит три атома водорода ($-CH_3$) и каждый углерод в пределах цепи содержит два атома водорода ($-CH_2-$). "Общее насыщение" обычно относится к объединенному процентному содержанию пальмитиновой ($C16:0$), стеариновой ($C18:0$), арахидовой ($C20:0$), бегеновой ($C22:0$) и тетракозановой ($C24:0$) жирных кислот.

"Ненасыщенные жирные кислоты" имеют схожий с насыщенными жирными кислотами остов за исключением того, что они включают по меньшей мере одну алкеновую группу ($-CH=CH-$) в углеродной

цепи. Два фланкирующих атома углерода (присоединенных к каждой стороне алкеновой группы) могут встречаться в цис- или транс-конфигурации. "Мононенасыщенные жирные кислоты" относятся к жирным кислотам, которые имеют по меньшей мере двенадцать атомов углерода, но только одну алкеновую группу в углеродной цепи. "Полиненасыщенные жирные кислоты" или "PUFA" относятся к жирным кислотам, которые имеют по меньшей мере двенадцать атомов углерода и по меньшей мере две алкеновые группы в углеродной цепи. "Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты" и "LC-PUFA" относятся к жирным кислотам, которые имеют по меньшей мере двадцать атомов углерода в углеродной цепи и содержат по меньшей мере две алкеновые группы. "Полиненасыщенные жирные кислоты с очень длинной цепью" и "VLC-PUFA" относятся к жирным кислотам, которые имеют по меньшей мере двадцать два атома углерода и по меньшей мере три алкеновые группы в углеродной цепи. Ссылка на LC-PUFA включает VLC-PUFA. Обычно число атомов углерода в углеродной цепи жирных кислот относится к неразветвленной углеродной цепи. Если углеродная цепь является разветвленной, из числа атомов углерода исключаются атомы, присутствующие в боковых группах.

В одном варианте осуществления LC-PUFA представляет собой "жирную кислоту $\omega 3$ " или "жирную кислоту Омега-3": она относится к семье ненасыщенных жирных кислот (алкеновая группа, двойная связь или C=C), имеющих углерод-углеродную связь у третьего атома углерода от метилового конца жирной кислоты. В другом варианте осуществления LC-PUFA представляет собой жирную кислоту $\omega 6$: она относится к семье ненасыщенных жирных кислот (алкеновая группа), имеющих углерод-углеродную связь у шестого атома углерода от метилового конца жирной кислоты. Положение алкена в цепи жирной кислоты также обозначается с использованием Δ (или дельта), при этом положение алкена пронумеровано относительно карбоксильного конца жирной кислоты. Например, линолевая кислота может быть обозначена также как "цис- $\Delta 9$, цис- $\Delta 12$ октадекадиеновая кислота" или " $\Delta^{9,12}$ октадекадиеновая кислота". Жирные кислоты могут быть также идентифицированы путем обращения к липидному числу "C:D", где C представляет собой число атомов углерода и D представляет собой число двойных связей в углеродной цепи. Например, арахидоновая кислота может быть аннотирована $20:4\Delta^{5,8,11,14}$, что означает цепь из двадцати атомов углерода с четырьмя алкеновыми группами, расположенными у атомов углерода 5, 8, 11 и 14 от карбоксильного конца жирной кислоты. Это название также указывает на то, что арахидоновая кислота представляет собой жирную кислоту $\omega 6$, потому что если имеется двадцать атомов углерода и алкен у C14 от карбоксильного конца, первый алкен от метильного конца должен быть у C6.

В следующем варианте осуществления LC-PUFA выбрана из группы, состоящей из арахидоновой кислоты (ARA, $20:4\Delta^{5,8,11,14}$; $\omega 6$), эйкозатетраеновой кислоты (ETA, $20:4\Delta^{8,11,14,17}$; $\omega 3$), эйкозапентаеновой кислоты (EPA, $20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$; $\omega 3$), докозапентаеновой кислоты (DPA, $22:5\Delta^{7,10,13,16,19}$; $\omega 3$) или докозагексаеновой кислоты (DHA, $22:6\Delta^{4,7,10,13,16,19}$; $\omega 3$). LC-PUFA также может представлять собой дигомо-γ-линолевую кислоту (DGLA) или эйкозатриеновую кислоту (ETra, $20:3\Delta^{11,14,17}$; $\omega 3$). LC-PUFA, полученная в соответствии с настоящими вариантами осуществления, может представлять собой смесь любого или всего вышеперечисленного и может включать другие LC-PUFA или производные любых из этих LC-PUFA. По меньшей мере в одном варианте осуществления жирные кислоты $\omega 3$ представляют собой по меньшей мере одну из DHA; DPA и DHA; или EPA, DPA и DHA.

Кроме того, как отмечено выше, LC-PUFA и VLC-PUFA могут представлять собой свободную жирную кислоту (неэтерифицированную), этерифицированную или находиться в другой связанной форме. Таким образом, LC-PUFA согласно настоящим вариантам изобретения может быть представлена в виде смеси форм в липиде клетки, экстрагированном липиде или очищенном масле. По меньшей мере в одном варианте осуществления масло содержит по меньшей мере 75% или по меньшей мере 85% триацилглицеринов ("TAG"), при этом остальная часть присутствует в виде других форм липида, таких как упомянутые, при этом TAG содержат по меньшей мере одну LC-PUFA. Затем масло может быть дополнительно очищено или обработано, например, путем гидролиза с помощью сильного основания для высвобождения свободных жирных кислот или путем дистилляции или т.п.

Таким образом, выражения "общие жирные кислоты $\omega 3$ ", "общее содержание жирных кислот $\omega 3$ " и т.п. относятся к сумме всех жирных кислот $\omega 3$, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяет контекст, обычно выраженной в виде процента от общего содержания жирных кислот. Эти жирные кислоты $\omega 3$ включают ALA, SDA, ETra, ETA, EPA, DPA или DHA и исключают любые жирные кислоты $\omega 6$ или мононенасыщенные жирные кислоты. Выражения "новые жирные кислоты $\omega 3$ ", "содержание новых жирных кислот $\omega 3$ " и т.п. относятся к сумме всех жирных кислот $\omega 3$ за исключением ALA, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяет контекст, выраженной в процентах от общего содержания жирных кислот. Эти новые жирные кислоты $\omega 3$ представляют собой жирные кислоты, которые продуцируются в клетках, растениях, частях растений и семенах согласно настоящим вариантам осуществления путем экспрессии трансгенных конструкций элитного события и, в случае присутствия, включают SDA, ETra, ETA, EPA, DPA или DHA, но исключают ALA, любые жирные кислоты $\omega 6$ или мононенасыщенные

жирные кислоты. Иллюстративное общее содержание жирных кислот $\omega 3$ и содержание новых жирных кислот $\omega 3$ может быть определено путем превращения жирных кислот в образце в метиловые эфиры жирных кислот (FAME) и анализа с помощью газовой хроматографии (GC) способами, известными в данной области. См., например, American Oilseed Chemists' Society (AOCS) method Celd-91.

Сходным образом, выражения "общие жирные кислоты $\omega 6$ ", "общее содержание жирных кислот $\omega 6$ " и т.п. относятся к сумме всех жирных кислот $\omega 6$, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяет контекст, выраженной в процентах от общего содержания жирных кислот. "Общие жирные кислоты $\omega 6$ " в случае присутствия могут включать LA, GLA, DGLA, ARA, EDA или $\omega 6$ -DPA и исключают любые жирные кислоты $\omega 3$ или мононенасыщенные жирные кислоты. Выражения "новые жирные кислоты $\omega 6$ ", "содержание новых жирных кислот $\omega 6$ " и т.п. относятся к сумме всех жирных кислот $\omega 6$, исключая LA, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяет контекст, выраженной в процентах от общего содержания жирных кислот. Эти новые жирные кислоты $\omega 6$ представляют собой жирные кислоты, которые продуцируются в клетках, растениях, частях растения или семенах, как описано в настоящем документе, посредством экспрессии трансгенов элитного события и могут включать GLA, DGLA, ARA, EDA или $\omega 6$ -DPA, но исключают LA, любые жирные кислоты $\omega 3$ или мононенасыщенные жирные кислоты.

"Анализ половинок семян" представляет собой процедуру, в которой анализ жирных кислот проводят на одной из двух семядолей (половинке семени), а оставшийся проросток, несущий вторую семядоль, используют для формирования растения, если результаты анализа являются положительными.

"Содержание белка" представляет собой типичное процентное массовое содержание белка в не содержащей масла муке или по существу не содержащей масла муке, например, с удалением 95 или 99% масла из зрелых цельных высушенных семян, как определено способами, известными в данной области. См., например, Daun et al., 2011; AOCS Official Meth. Ba 4e-93 Combustion Meth. Determination Crude Protein.

Зрелое семя, произведенное коммерческими производителями для целей, отличных от выращивания или размножения видов, иногда называется "зерном".

Квалифицированному специалисту будет понятно, например, что термин "получение части растения" в качестве стадии в способе согласно настоящим вариантам осуществления может включать получение одной или нескольких частей растения, таких как семена, для использования в способе. Получение части растения включает сбор части растения от растения, например, с помощью механического харвестера, или приобретение части растения, или получение части растения от поставщика, или получение части растения иным способом путем приобретения части растения у кого-либо еще, у кого имеется собранная часть растения. Таким образом, например, получение семени NS-B50027-4 или потомства NS-B50027-4 может включать выращивание растений, сбор семян растений, приобретение семян, получение семян, покупку семян, помещение семян в контейнер или хранение семян, или транспортировку семян в другое место.

Выражение "по существу все физиологические и морфологические характеристики родителя" относится к растению, которое обладает по существу всеми физиологическими и морфологическими характеристиками рекуррентного родителя за исключением характеристик, происходящих от преобразованного признака. Инбредная линия канолы NS-B50027-4.

Линия канолы NS-B50027-4 представляет собой стабильную и однородную линию разведения, как описано в настоящем документе. Линия NS-B50027-4 была разведена с удалением особого внимания однородности типа растения, и указанная линия была размножена при постоянном наблюдении за однородностью. Линия NS-B50027-4 прошла полевые испытания с разрешением регулирующих органов на десяти участках в главных регионах выращивания канолы в Австралии и Канаде. Оценки агрономических характеристик проводились в полевых исследованиях на множестве участков для оценки характеристик, таких как всхожесть, мощность проростков, высота растений, полегание и выход. Все полевые испытания также проводили в отношении условно-патогенных болезней или вызывающих стресс насекомых, а также нормальных фенотипических характеристик.

Линия NS-B50027-4 является сходной с австралийским сортом AV Jade (родительская изогенная линия) с точки зрения листьев, цветков и стручков, и дает растения с одинаковой высотой и внешним видом в зрелом состоянии. Линия NS-B50027-4 обладает приемлемой устойчивостью к болезням черной ножки (*Leptosphaeria*) и имеет сходный потенциал выхода семян в типичных условиях выращивания канолы в Австралии и не демонстрирует повышенной склонности к растрескиванию семян или полеганию растений при созревании по сравнению с AV Jade. Значимых различий не наблюдалось между канолой DHA и AV Jade в отношении характеристик вредителей растений, и ничто не указывало на селективное преимущество, которое могло бы привести к повышенной вероятности зарастания сорняками канолы NS-B50027-4.

В дополнение к признаку LC-PUFA линия NS-B50027-4 отличается от AV Jade немного более длительным периодом достижения стадии цветения и в этом отношении является сходной с австралийским

культиваром ATR Wahoo. NS-B50027-4 отличается, в частности, продукцией в своих семенах LC-PUFA, в частности жирных кислот LC-ω3 и более конкретно DHA. Линия канолы NS-B50027-4 не является родителем какого-либо другого культивара канолы, коммерциализированного на момент подачи патента на эту линию NS-B50027-4.

Инбредная трансгенная линия канолы NS-B50027-4 имеет следующие морфологические и физиологические характеристики (основанные в первую очередь на данных, полученных и усредненных из восьми различных местоположений в Австралии в 2015 г.).

Таблица 1

Описательная информация: NS-B50027-4 и AV Jade

	NS-B50027-4	Сорт сравнения: AV Jade
Виды	<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>
Лист: Зеленый цвет	средний	средний
Лист: Лепестки	присутствуют	присутствуют
Лист: Число лепестков	среднее	среднее
Лист: Зубчатая форма края листа	средняя	средняя
Лист: Длина	средняя	средняя
Время цветения	от среднего до позднего	среднее
Цветок: Цвет лепестков	желтый	желтый
Цветок: Ширина лепестков	средняя	средняя
Цветок: Производство пыльцы	присутствует	присутствует
Растение: Мощность проростков	от средней до высокой	средняя
Растение: Высота при полном цветении	средняя	средняя
Растение: Полегание при созревании	низкое	низкое
Устойчивость к болезням черной ножки	присутствует	присутствует
Стручок: Длина	от средней до длинной	от средней до длинной
Стручок: Длина до «носика»	средняя	средняя
Стручок: Длина цветоножки	от средней до длинной	от средней до длинной
Раскалывание семян	низкое	низкое
Семена: Выход	высокий	высокий
Семена: % масла	умеренный	умеренный
Семена: % Эруковой кислоты	ноль	ноль
Семена: % EPA C20:5n3	присутствует	отсутствует
Семена: % DPA C22:5n3	присутствует	отсутствует
Семена: % DHA C22:6n3	присутствует	отсутствует

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается способ получения происходящего из NS-B50027-4 растения *Brassica* или канолы, или его частей, таких как семя, включающий получение семени NS-B50027-4 или семени новой линии *Brassica napus*, описанной выше, и выращивание семени в растении в условиях выращивания *Brassica* или канолы. В другом варианте осуществления предлагается получение гибридного семени путем получения семени NS-B50027-4 или семени линии *Brassica napus*, как описано выше, выращивания растения, перекрестного опыления растения и получения семени, которое созревает в результате перекрестного опыления. Затем семя может быть культивировано в условиях выращивания растения *Brassica* или канолы с получением гибрида растения *Brassica* или канолы, или его частей, включая семя. Таким образом, в другом аспекте предлагается способ выращивания линии *Brassica napus* NS-B50027-4 (репрезентативное семя указанной линии депонировано в ATCC® под номером доступа PTA-123186), сублинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или сублинии, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением *Brassica*, при этом способ включает: получение семени *Brassica* NS-B50027-4 или семени линии *Brassica napus*, как описано выше, и выращивание семени в условиях выращивания растения *Brassica*. Дополнительные аспекты, касающиеся потомства, гибридов и интрогрессивной гибридизации с получением NS-B50027-4, описаны в настоящем документе.

Элитное событие.

Фенотипическая экспрессия трансгенов в канале определяется структурой самой трансгенной кассеты и локализацией ее вставки в геноме растения: присутствие трансгенов в конкретных локализациях в геноме растения может влиять на экспрессию трансгена и общий фенотип растения. Встраивание молекулы рекомбинантной ДНК в геном растения обычно происходит в результате трансформации клетки или ткани (или в результате других генетических манипуляций). Конкретный(ые) сайт(ы) встраивания может(могут) быть случайными или предварительно определенными (если используется процесс таргетной интеграции). Агрономически или промышленно успешное введение представляющего коммерческий интерес признака в растение путем генетической манипуляции может представлять длительную процедуру, зависящую от различных факторов. Фактическая трансформация и регенерация генетически трансформированных растений являются лишь первыми в сериях стадий отбора, которые включают обширное описание генетических характеристик, разведение и оценку во время испытаний в теплице или поле, что в конечном итоге приводит к отбору элитного события.

Линия NS-B50027-4 была выбрана в качестве элитного события в разработке канолы, которая продуцирует LC-PUFA, в частности жирные кислоты LC-ω3 и более конкретно DHA. "Элитное событие" представляет собой событие, выбираемое из группы событий, полученных путем трансформации одной и той же трансформирующей ДНК или путем возвратного скрещивания с растениями, полученными в результате такой трансформации, на основании экспрессии и стабильности трансгенных конструкций, совместимости с оптимальными агрономическими характеристиками растения, содержащего такие конструкции, и реализации желаемого фенотипического признака. Таким образом, критерии селекции элитного события представляют собой по меньшей мере один, и предпочтительно все критерии из следующего списка:

(a) присутствие трансгенов не ставит под угрозу другие желательные характеристики растения, например характеристики, относящиеся к агрономической производительности или коммерческой ценности;

(b) событие описывается четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно наследуется и для которой можно разработать подходящие диагностические инструменты для контроля идентичности;

(c) представляющие интерес гены в трансгенной кассете демонстрируют корректную, адекватную и стабильную пространственную и временную фенотипическую экспрессию на коммерчески приемлемом уровне в диапазоне условий окружающей среды, при которых возможно нормальное агрономическое использование растений, несущих указанное событие. Трансгены также могут быть ассоциированы с положениями в геноме растения, которые обеспечивают возможность интрогрессии в последующее коммерчески желательное генетическое окружение.

Элитный статус события подтверждается интрогрессией элитного события в различные варианты генетического окружения, имеющие отношение к рассматриваемому вопросу, и наблюдением соответствия по меньшей мере одному из вышеприведенных критериев, например (a), (b) и (c). Кроме того, отбор элитных событий может быть также определен по совместимости, в частности, потомство, полученное в результате скрещивания между NS-B50027-4 и растением, несущим по меньшей мере одно другое событие таким образом, что указанное потомство несет оба события. Таким образом, "элитное событие" относится к генетическому локусу, содержащему трансгенную(ые) кассету(ы), которая(ые) соответствует(ют) вышеописанным критериям. Растение, семена, растительный материал или потомство могут содержать одно или несколько элитных событий в составе своего генома.

Экспрессия трансгенов наделяет растение одним или несколькими фенотипическими признаками (например, продукцией жирных кислот LC-ω3), которые должны были быть приданы путем встраивания трансформирующей ДНК (на основе структуры и функции некоторых или всех представляющих интерес генов). В настоящих вариантах осуществления несколько трансгенов обеспечивают путь биосинтеза для продукции жирных кислот LC-ω3 в трансформированном растении.

Один аспект настоящих вариантов осуществления относится к удивительному количеству копий экспрессируемых трансгенов в геноме NS-B50027-4. Под "экспрессируемым" подразумевается, что первичная структура молекулы ДНК, т.е. кодирующая последовательность трансгена, указывает на то, что ген кодирует активный белок. Однако экспрессируемые кодирующие последовательности могут не экспрессироваться, поскольку "сайленсинг генов" происходит вследствие действия различных механизмов инактивации гомологичных трансгенов *in vivo*. Инактивация гомологичных трансгенов описана в растениях, где трансген вводили в смысловой ориентации с неожиданным результатом, показавшим, что активность гена, и трансгена подавлялась. См. Napoli et al., 2 Plant Cell 279 (1990). Возможные механизмы инактивации гомологичных генетических последовательностей включают инактивацию транскрипции посредством метилирования, где сигнал эндогенным механизмам генного сайленсинга дают области дублированной ДНК, и посттранскрипционного сайленсинга, при котором совместные уровни мРНК от эндогенного гена и трансгена запускают индуцированную пороговым уровнем деградацию обоих транскриптов. См. van Bokland et al., 6 Plant J. 861 (1994). Удивительно, однако, что хотя в NS-B50027-4

имеется по меньшей мере три копии нескольких трансгенов, некоторые из которых расположены в одинаковой ориентации, NS-B50027-4 проявляет синергетическую экспрессию ДНА.

Исходные трансформанты, культивированные из *Brassica napus* L. (вар. AV Jade), продемонстрировали широкую вариабельность в уровнях продукции жирных кислот, особенно в уровнях ЕРА и ДНА. Для второго и третьего поколений отбор был основан, главным образом, на содержании ДНА и ЕРА в трансгенных семенах. В некоторых случаях, особенно в поколениях Т2 или Т3, картины сегрегации (определенные по выращиванию двадцати-сорока индивидуальных семян от одного растения до двадцати-сорока потомков и затем измерению содержания ДНА и ЕРА в индивидуальных семенах этих потомков) также показали результаты с большим разбросом, что указывает на появление комплексных или мультикопийных вставок. Таким образом, многие из первоначальных поколений Т2 или Т3 растений были отброшены. Первоначально был сделан вывод о том, что множественные копии трансгенной вставки будут давать нестабильные трансформанты, а также проявлять классический сайленсинг генов, наблюдаемый в гомозиготных генотипах, как обсуждалось выше. Следовательно, если анализ PCR трансформированных растений показал число копий >1, эти трансформанты часто отбрасывали.

Удивительным образом было обнаружено, что элитное событие NS-B50027-4 содержит стабильное (и функциональное) мультикопийное событие: вставку из шестнадцати генов, включающую две кассеты по восемь генов, ограниченные Т-ДНК (каждая вставка из восьми генов, кодирующая семь ферментов, и маркер), расположенные в бинарном (перевернутом) виде от левой границы до левой границы (аналогично массивному палиндрому); и отдельную меньшую кассету с четырьмя генами; и эта комбинация трансгенных вставок действует синергетически в отношении продукции ДНА в инбредной линии NS-B50027-4. Более конкретно комбинация скрещивания, возвратного скрещивания и самоскрещивания сегрегировала вставку из шестнадцати генов в хромосому A05 (также называемую N05) и вставку из четырех генов в хромосому A02 (также называемую N02). Вклад каждой трансгенной хромосомы определяли путем разведения каждого сегреганта с получением чистых гомозиготных линий каждого события. Например, в одном эксперименте сегрегант, содержащий вставку из шестнадцати генов, продуцировал около 4% ДНА; и сегрегант, содержащий вставку из четырех генов, не продуцировал ДНА; но когда сегреганты выращивали путем объединения трансгенного локуса A02 хромосомы и трансгенного локуса A05 хромосомы, комбинация двух трансгенных вставок обеспечивала растение, которое продуцировало по меньшей мере от около 7% ДНА до по меньшей мере около 14% ДНА, включительно, в своем семени. Этот результат был неожиданным. Как уже отмечалось, несмотря на необычный генетический состав элитного события NS-B50027-4 эта линия оказалась стабильной и надежной в отношении продукции жирных кислот.

Как уже отмечалось в настоящем документе, путь биосинтеза для LC-PUFA включал семя-специфические промоторы для ограничения экспрессии и продукции LC-PUFA в развивающемся семени. Экспрессии какого-либо из семи трансгенов не было обнаружено в целых растениях, корнях, цветках или других растительных тканях (например, бутоне цветка, молодом стручке) NS-B50027-4, кроме семян. В развивающемся семени содержание трансгенных белков составляло от самого высокого до самого низкого (нг/мг общего белка): Pavsa-Δ4D>Lackl-Δ12D>Picpa-ω3D>Micpu-Δ6D>Pavsa-Δ5D>Pygco-Δ6E и Pygco-Δ5E не был обнаружен. В зрелом семени содержание трансгенного белка составляло от самого высокого до самого низкого (нг/мг общего белка): Pavsa-Δ4D>Lackl-Δ12D=Picpa-ω3D>Pavsa-Δ5D>Micpu-Δ6D>Pygco-Δ5E, в то время как Pygco-Δ6E не был обнаружен.

В одном аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается способ увеличения LC-PUFA в растениях путем обеспечения (например, путем генетической трансформации или разведения) растения множественными копиями генетических конструкций, экспрессирующих некоторые ферменты "front end" пути биосинтеза LC-PUFA. См. Napier et al., 330 Biochem. J. 611 (1998) (характеризует структуру как N-концевой домен цитохрома b5 и типичный домен жирной кислоты-десатуразы, имеющий три высококонсервативных гистидиновых бокса). Например, хотя не все ферменты Δ6-десатуразы, Δ5-десатуразы, Δ5-элонгазы и ω3/Δ15-десатуразы (считаются № 2, 3, 5 и 6 в пути биосинтеза) могут рассматриваться исключительно как "front end" десатуразы, в конкретных вариантах осуществления эти гены собраны в искусственный локус, который усиливает продукцию LC-PUFA, такой как ДНА. В конкретных вариантах осуществления искусственный локус, содержащий некоторые "front end" гены, включает Δ6-десатуразу, происходящую из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазу, происходящую из *Pyramimonas cordata*, Δ5-десатуразу, происходящую из *Pavlova salina*, и Δ15/ω3-десатуразу, происходящую из *Pichia pastoris*. Локализация этого искусственного локуса на хромосоме A02 NS-B50027-4 обеспечивает средства сегрегации этого локуса в линию растения (сегрегант) и обеспечивает возможность его интрогрессии в другое растение с помощью традиционных методов разведения растений.

Масло и жирная кислота ω3.

С помощью растений канолы линии NS-B50027-4 в соответствии с настоящими вариантами осуществления жирные кислоты ω3 и LC-ω3 могут быть получены в промышленных количествах из семян канолы NS-B50027-4. Таким образом, методы отбора и размножения трансформированных растений обеспечивают получение множества растений с выгодными признаками NS-B50027-4, которые собирают

обычным способом и жирную кислоту экстрагируют из представляющей интерес ткани, например, семян.

В следующем варианте осуществления экстрагированный растительный липид может быть обработан для увеличения уровня ДНА в виде процента от общего содержания жирных кислот. Например, обработка представляет собой гидролиз этерифицированных жирных кислот с получением свободных жирных кислот или переэтерификацию для модификации компонентов ТАГ. Например, масло из семени NS-B50027-4 или его потомства может быть обогащено в отношении содержания ДНА или обработано для превращения жирных кислот в масле в сложные алкиловые эфиры, такие как сложные метиловые или этиловые эфиры, которые затем могут быть очищены или фракционированы для обогащения липида или масла ДНА. В некоторых вариантах осуществления композиция жирных кислот липида после такой обработки содержит по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% ДНА включительно.

Настоящие варианты осуществления также включают потомство и потомков этих новых линий *B. napus* из линии NS-B50027-4. Потомство или потомки могут быть получены с помощью способов разведения или тканевой культуры, известных специалистам в данной области. Например, потомство или потомки могут содержать профиль жирных кислот канолы, развитый в этих линиях. Таким образом, потомки или потомство могут иметь любое количество генов из развитых линий. Потомки или потомство могут включать только те гены, которые обеспечивают фенотип жирных кислот канолы, представленный в настоящем документе, или дополнительные гены. Это может быть определено при помощи молекулярного анализа, известного специалистам в данной области.

В одном аспекте предлагается способ получения семени растения *Brassica*, такого как *B. napus* или *B. juncea*, имеющего фенотип NS-B50027-4, например содержание ДНА в семенах, составляющее по меньшей мере 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10%, около 11%, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около 14% ДНА, около 15%, около 16% ДНА, около 17% ДНА, около 18% ДНА, около 19% ДНА, около 20% ДНА, около 21% ДНА, около 22% ДНА, около 23% ДНА, около 24% ДНА, около 25% ДНА включительно или более ДНА (в мас.% от общего содержания жирных кислот); или, например, содержание жирной кислоты LC-PUFA, составляющее по меньшей мере 5% LC-PUFA, около 6% LC-PUFA, около 7% LC-PUFA, около 8% LC-PUFA, около 9% LC-PUFA, около 10% LC-PUFA, около 11% LC-PUFA, около 12% LC-PUFA, около 13%, около 14% LC-PUFA, около 15% LC-PUFA, около 16% LC-PUFA, около 17% LC-PUFA, около 18% LC-PUFA, около 19% LC-PUFA, около 20% LC-PUFA, около 21% LC-PUFA, около 22% LC-PUFA, около 23% LC-PUFA, около 24% LC-PUFA, около 25% LC-PUFA включительно или более LC-PUFA (сумма EPA, DPA и ДНА в мас.% от общего содержания жирных кислот).

В другом аспекте предлагается гомогенная совокупность измельченных семян *Brassica napus*, полученных из растений, описанных в настоящем документе (т.е. семя NS-B50027-4 или семя потомства, содержащего по меньшей мере один локус NS-B50027-4), при этом измельченные семена *B. napus* содержат по меньшей мере около 30%, около 35% или от около 36% до около 40% включительно по массе от общего содержания жирных кислот (мас.% семени). В конкретных вариантах осуществления, например, содержание жирных кислот в семени NS-B50027-4 или семени, полученном от потомства, содержащего по меньшей мере один локус из NS-B50027-4, составляет по меньшей мере 5% ДНА, около 6% ДНА, около 7% ДНА, около 8% ДНА, около 9% ДНА, около 10% ДНА, около 11% ДНА, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около 14% ДНА, около 15%, около 16% ДНА, около 17% ДНА, около 18% ДНА, около 19% ДНА, около 20% ДНА, около 21% ДНА, около 22% ДНА, около 23% ДНА, около 24% ДНА, около 25% ДНА включительно (в виде мас.% от общего содержания жирных кислот) или более ДНА. В конкретных вариантах осуществления, например, содержание жирных кислот в семени NS-B50027-4 или семени потомства, содержащем по меньшей мере один локус из NS-B50027-4, составляет по меньшей мере 5% LC-PUFA, около 6% LC-PUFA, около 7% LC-PUFA, около 8% LC-PUFA, около 9% LC-PUFA, около 10% LC-PUFA, около 11% LC-PUFA, около 12% LC-PUFA, около 13%, около 14% LC-PUFA, около 15% LC-PUFA, около 16% LC-PUFA, около 17% LC-PUFA, около 18% LC-PUFA, около 19% LC-PUFA, около 20% LC-PUFA, около 21% LC-PUFA, около 22% LC-PUFA, около 23% LC-PUFA, около 24% LC-PUFA, около 25% LC-PUFA, около 26% LC-PUFA, около 27% LC-PUFA, около 28% LC-PUFA, около 29% LC-PUFA, около 30% LC-PUFA, около 31% LC-PUFA, около 32% LC-PUFA, около 33% включительно или более LC-PUFA (LC-PUFA представляет собой сумму EPA, DPA и ДНА в мас.% от общего содержания жирных кислот). В других вариантах осуществления, например, содержание жирных кислот в семени NS-B50027-4 включает по меньшей мере около 18% ALA, около 19% ALA, около 20% ALA, около 21% ALA, около 22% ALA, около 23% ALA, около 24% ALA, около 25% ALA, около 26% ALA включительно или более ALA в мас.% от общего содержания жирных кислот семени.

Также предлагается гомогенная совокупность измельченного семени *Brassica napus* NS-B50027-4, раскрытого в настоящем документе, или гомогенная совокупность измельченного семени *B. napus* от потомства или потомка NS-B50027-4, при этом содержание ДНА в измельченных семенах *B. napus* составляет по меньшей мере 5% ДНА, около 6% ДНА, около 7% ДНА, около 8% ДНА, около 9% ДНА, около 10% ДНА, около 11% ДНА, около 12% ДНА, около 13% ДНА, около 14% ДНА, около 15%, около

16% DHA, около 17% DHA, около 18% DHA, около 19% DHA, около 20% DHA, около 21% DHA, около 22% DHA, около 23% DHA, около 24% DHA, около 25% DHA, включительно, или более DHA (в мас.% от общего содержания жирных кислот). Также предлагается масло, мука и белок из такого измельченного семени.

В следующем варианте осуществления экстрагированный растительный липид (например, масло) может быть обработан для увеличения уровня DHA в виде процента от общего содержания жирных кислот. Например, обработка включает гидролиз этерифицированных жирных кислот с получением свободных жирных кислот или перэтерификацию. Например, масло канолы может быть обработано для превращения жирных кислот в масле в сложные алкиловые эфиры, такие как сложные метиловые или этиловые эфиры, которые затем могут быть фракционированы для обогащения липида или масла DHA. В вариантах осуществления композиция жирных кислот липида после такого обогащения содержит по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% DHA или по меньшей мере 95% DHA включительно.

В другом варианте осуществления предлагается способ получения масла или муки из растения *Brassica napus* линии NS-B50027-4, репрезентативные семена которого депонированы в ATCC® под номером доступа PTA-123186, сублинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или сублинии, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением *Brassica*, включающий выращивание растения *Brassica napus*, описанного выше, в условиях выращивания растения *Brassica*; сбор семян; и экстракцию масла, муки или белка из семян.

В другом варианте осуществления в настоящем документе предлагается способ получения масла из растения *Brassica napus* линии NS-B50027-4, репрезентативные семена которого депонированы в ATCC® под номером доступа PTA-123186, сублинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинии, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением *Brassica*, включающий измельчение семян растения *Brassica napus* линии NS-B50027-4, при этом репрезентативные семена указанной линии депонированы в ATCC® под номером доступа PTA-123186, сублинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинии, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением *Brassica*; и экстракцию масла из указанных семян.

В другом аспекте предлагается мука и белок, а также масло из семени NS-B50027-4 или из семени потомства, происходящего из NS-B50027-4. Экстракция белка из растительной биомассы может быть осуществлена известными способами. См., например, Heney & Ott, 114 Anal. Biochem. 92 (1981). Мука из семян NS-B50027-4 может оказаться особенно полезной, поскольку она содержит по меньшей мере некоторое количество DHA и других жирных кислот $\omega 3$. Аналогично белковая фракция, полученная из семени NS-B50027-4, содержит по меньшей мере некоторое количество полезной DHA и других жирных кислот $\omega 3$. Таким образом, в другом варианте осуществления предлагается мука из семян, полученная из семени NS-B50027-4 или из семени потомства, происходящего из NS-B50027-4. В одном варианте осуществления мука из семян содержит элитное событие NS-B50027-4. Предпочтительно мука из семян сохраняет некоторое количество липида или масла, продуцированного в семени, из которого получена мука из семян, хотя и на более низком уровне, после экстракции большей части липида или масла из семени. Мука из семян может быть использована в качестве пищевого продукта, например компонента корма для животных или ингредиента в производстве продуктов питания. Учитывая более высокое соотношение в этой муке из семян жирных кислот $\omega 3:\omega 6$, мука из семени NS-B50027-4 может обеспечить превосходное питание по сравнению с другой коммерчески доступной мукой из семян.

Как отмечалось выше, выражение "содержание жирных кислот" или "композиция жирных кислот" обычно относится к массовым процентам различных жирных кислот, присутствующих в эндогенно образованном масле зрелых, цельных, частично высушенных семян (обычно содержащих около 6 или 7% влаги), рассчитанным как процент конкретной жирной кислоты в виде нормализованной площади; или относительно известного стандарта; или в виде массового соотношения жирных кислот на грамм семян (например, мг DHA/г семян).

В общепринятой отраслевой практике композиция жирных кислот представлена в виде процента по площади (нормализованной по площади), а не в абсолютных количествах. Например, хроматография часто генерирует данные в виде пиков и площадь под каждым пиком интегрируется и выражается в виде процента от общей площади под всеми пиками для жирных кислот на хроматограмме. Процент от площади легко рассчитать и сравнить с результатами, представленными другими в отрасли, кто также сообщает процент от площади. Процент от площади не является абсолютным, но обеспечивает приемлемое приближение. Абсолютный выход в виде результатов, представленных в мг/кг, можно рассчитать, например, путем включения эталонных стандартов известной концентрации и внутреннего стандарта. Поправочные коэффициенты также могут быть использованы для вычисления массовых долей жирных кислот.

Например, при определении содержания жирных кислот семена могут быть измельчены, экстрагированы триацилглицериды (TAG) масла с последующим омылением и метилированием метанолом и метоксидом натрия или путем реакции с 1,25% 3-(трифторметил)фенил-триметил-аммония гидроксида в

метаноле (Meth Prep II™, Fischer Scientific Cat #AT18007) с образованием сложных метиловых эфиров жирных кислот. Полученные сложные метиловые эфиры жирных кислот (FAME) могут быть проанализированы с помощью газожидкостной хроматографии (GLC) с использованием капиллярной колонки, которая разделяет FAME на основе степени ненасыщенности и длины цепи жирных кислот. FAME также можно анализировать, например, с помощью GC, LC-MS, GC-MS, NMR или отражательной спектроскопии. Композиция жирных кислот также может быть определена по цельным семенам, например, путем разрушения оболочек семян и подвергания разрушенных семян прямому метилированию. Общий липид может быть разделен методами, известными в данной области для очистки фракций, таких как фракция TAG. Например, тонкослойная хроматография (TLC) может быть выполнена в аналитическом масштабе для отделения TAG от других липидных фракций, таких как DAG, ацил-CoA или фосфолипид, для определения композиции жирных кислот, в частности TAG. Можно использовать ряд других аналитических методов, известных специалистам в данной области. См., например, Tinoco et al., 3 Anal. Biochem. 514 (1962); Canola: Chemistry, Production, Processing & Utilization (Daun et al., eds., AOCS Press, Urbana, IL, 2011) (Daun et al., 2011); US 2015/0166928; US 20160002566.

Липид или масло семени NS-B50027-4 также может быть очищено или обогащено для увеличения доли TAG, например, путем удаления свободных жирных кислот или фосфолипидов. По меньшей мере в одном варианте осуществления липид семени NS-B50027-4 находится в форме масла, в котором по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% включительно или в диапазоне от 95 до 98% включительно по массе липида находится в форме TAG.

В другом варианте осуществления липид из семени NS-B50027-4 (или его потомства) обрабатывают для увеличения количества DHA в виде процента от общего содержания жирных кислот. Например, обработка может включать переэтерификацию. Например, липид может быть обработан для превращения жирных кислот, содержащихся в масле, в сложные алкиловые эфиры, такие как сложные метиловые или этиловые эфиры, которые затем могут быть фракционированы для обогащения липида или масла DHA. В вариантах осуществления композиция жирных кислот липида после такого обогащения содержит по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% DHA. Аналогично, так как липид из семени NS-B50027-4 содержит более высокую долю ALA по сравнению с типичной канолой, липид из семени NS-B50027-4 может быть обработан для обогащения липида в отношении содержания ALA. Кроме того, жирная кислота может находиться в смеси жирных кислот, имеющих композицию жирных кислот, описанную в настоящем документе, или может быть обогащена таким образом, что содержание жирной кислоты составляет по меньшей мере 40% или по меньшей мере 90% от содержания жирных кислот в смеси. В одном варианте осуществления жирная кислота является неэтерифицированной. Альтернативно жирная кислота этерифицирована, например, в метильную, этильную, пропильную или бутильную группу.

Несмотря на более низкое содержание олеиновой кислоты по сравнению с маслами, которые, как утверждают, придают стабильность DHA и другим LC-PUFA благодаря высокому содержанию олеиновой кислоты, масло жирных кислот ω 3 LC-PUFA из семени NS-B50027-4 проявляет удивительную стабильность. Более конкретно общеизвестно, что жирные кислоты ω 3 LC-PUFA являются нестабильными и особенно подвержены окислению. В данной области понятно, что для продления срока хранения LC-PUFA и пищевых продуктов, содержащих LC-PUFA, требуется инкапсулирование, смешивание с другими маслами, в частности маслами с высоким содержанием олеиновой кислоты, или добавление антиоксидантов. Однако несмотря на отсутствие таких обработок данные свидетельствуют о том, что масло, экстрагированное из измельченного семени NS-B50027-4, сохраняет свежесть в течение нескольких месяцев при комнатной температуре. Кроме того, уровни питательных веществ, таких как фитостеролы, витамин Е, витамин К1, β -каротин и минералы масла NS-B50027-4, находятся в естественном диапазоне других коммерческих масел канолы. Нежелательные вещества, такие как пестициды, микотоксины или полиароматические углеводороды, обнаруженные в масле, полученном из NS-B50027-4, на детектируемых уровнях отсутствовали. Кроме того, в масле, полученном из NS-B50027-4, не было обнаружено растительной ДНК.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагается источник DHA и LC-PUFA для применения в пищевых добавках и продуктах питания для людей и животных, не относящихся к человеку. В частности, масло из семени NS-B50027-4 обеспечивает устойчивый источник DHA и LC-PUFA для применения в аквакультуре. Из-за высокого мирового спроса на рыбу и, как следствие, чрезмерного промысла в морях, морская и пресноводная аквакультура приобретает все большее значение. См., например, Betancor et al., 4 Sci. Rep. 8104 (2014). Например, разведение и потребление лососевых рыб резко выросло за последние 20 лет. Однако рацион питания диких рыб сильно отличается от рациона других видов в аквакультуре. Фактически аквакультура по-прежнему сильно зависит от морского рыболовства для обеспечения основных пищевых питательных веществ, таких как рыбная мука и рыбий жир. Действительно рыбий жир является основным источником ω 3-LC PUFA в аквакультуре. Поскольку жир морской рыбы является ограничивающим фактором для быстрорастущей рыбоводческой отрасли

(от 5 до 10% в год), рацион питания для аквакультуры содержит широкий спектр альтернативных растительных ингредиентов, таких как семена бобовых, жмых, жмых листьев и все большую долю растительного масла в дополнение к маслу животного происхождения. Замена рыбьего жира растительными маслами, которые традиционно содержат низкий уровень LC-PUFA, означает, что меньшее количество LC-PUFA будет доступно в рационе питания рыб, даже если некоторые масла, такие как льняное масло, содержат некоторое количество ALA, которое может быть превращено, хотя и только в ограниченном количестве, в метаболиты LC у рыб. В целом существующие в настоящее время растительные масла в кормах для рыб могут оказывать вредное влияние на распределение FA у рыб и они могут изменять соотношение $\omega 3/\omega 6$ и снижать общее содержание LC-PUFA в рыбном мясе.

Например, типичные растительные масла содержат высокие количества $\omega 6$ PUFA, главным образом в виде линолевой кислоты (C18:2 $\omega 6$; LA). Масло из родительской линии AV Jade имеет отношение DHA:LA, равное 0,016; масло из NS-B50027-4 имеет отношение DHA:LA, равное 1,048; по сравнению с маслом из выращенного на ферме лосося, имеющего отношение DHA:LA, равное 0,908. Strobel et al., 11 *Lipids Health Dis.*, 144 (2012). Интересно, что отношения $\omega 3$ FA из NS-B50027-4 являются особенно выгодными в отношении пальмитиновой кислоты, насыщенной жирной кислоты, связанной с сердечно-сосудистыми заболеваниями и дислипидемией. Diet, Nutrition & Prevention of Chronic Dis., WHO Tech. Rep. Series 916, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, 88 (World Health Organization, Geneva, 2003). Масло из родительской линии AV Jade не содержит DHA; например, масло из NS-B50027-4 имеет отношение DHA:пальмитат, равное около 2,12; по сравнению с маслом из выращенного на ферме лосося, имеющим отношение DHA:пальмитат, равное около 0,59; и масло из дикого лосося имеет отношение DHA:пальмитат, равное около 1,028. Strobel et al., 2012. Приготовление пищевых продуктов для использования в аквакультуре, включая LC-PUFA, также известно в данной области. See Betancor et al., 2014; Petrie et al., 9 *PLOS ONE* 1, 2014; Tocher, 449 *Aquaculture*, 94 (2015).

Таким образом, объем настоящих вариантов осуществления охватывает применение масла из NS-B50027-4 в качестве источника жирных кислот $\omega 3$ для корма для аквакультуры и корм для аквакультуры, содержащий масло, полученное из NS-B50027-4 и его потомства. Исследования, проведенные с использованием масла, полученного из NS-B50027-4, показали, что это масло является безопасным для включения в корм, даваемый пресноводному лососю (от 2 до 25 г рыбной молоди) и что в мясо лосося были введены EPA и DHA из корма, содержащего масло из NS-B50027-4.

В другом аспекте в настоящих вариантах осуществления предлагаются композиции, содержащие одно или несколько из липида, масла, жирной кислоты, семени, муки из семян, белка, клетки, масличного растения или части растения NS-B50027-4. В некоторых вариантах осуществления композиция, кроме того, содержит носитель, подходящий для фармацевтического, пищевого или сельскохозяйственного применения, соединение для обработки семян, удобрение, другой пищевой или кормовой ингредиент, или добавленный белок или витамины. На фиг. 4 показана схема возможных стадий обработки, продуктов или фракций, полученных на разных стадиях процесса, и предлагаемое применение таких фракций или продуктов.

Также, предлагаются пищевые продукты, косметика или химические вещества, содержащие одно или более из липида или масла, полученного из NS-B50027-4, жирной кислоты, полученной из NS-B50027-4, клетки, полученной из NS-B50027-4, масличного растения, муки из семян или другой композиции, полученной или происходящей из NS-B50027-4. В другом аспекте предлагается способ получения пищевого продукта, при этом способ включает смешивание одного или более из липида или масла NS-B50027-4 или ее потомства, жирной кислоты NS-B50027-4 или ее потомства, клетки, части растения, семени, муки из семян, масличного растения NS-B50027-4 или ее потомства, или другой композиции, представляющей собой любую из композиций, полученных или происходящих из NS-B50027-4 или ее потомства, по меньшей мере с одним другим пищевым ингредиентом. Способ может включать стадии смешивания, варки, выпекания, экструдирования, эмульгирования или иного составления пищевого продукта, или упаковку пищевого продукта, или анализ количества липида или масла в пищевом продукте.

Пищевой продукт, рассматриваемый в настоящем документе, содержит масло, липид, сложный эфир жирной кислоты или жирную кислоту, полученную напрямую или опосредованно с использованием способов, клеток, растений или семени, раскрытого в настоящем документе, т.е. масло из семени NS-B50027-4 или из семени, полученного из потомства, происходящего из NS-B50027-4, содержащего по меньшей мере один локус из NS-B50027-4. Пищевые продукты включают продукты питания или препараты для потребления человеком или животными, которые при попадании в организм питают или формируют ткани, или снабжают энергией; или сохраняют, восстанавливают или поддерживают адекватный пищевой статус для метаболической функции. Пищевые продукты включают питательные композиции для младенцев или маленьких детей, такие как, например, молочная смесь и мука из семян. Пищевые продукты также включают пищевые добавки, такие как биологически активные добавки. Кроме того, пищевые продукты могут включать пищевые макронутриенты, белок, углеводы, витамины или минералы в количествах, подходящих для конкретного применения. Количества этих ингредиентов изменяются в зависимости от того, предназначена ли композиция для применения у нормальных индивидуумов или

для применения у индивидуумов, имеющих особые потребности, таких как индивидуумы, страдающие метаболическими нарушениями и т.п. Пищевой продукт может быть представлен в твердой, жидкой, желеобразной или эмульсионной форме. Пищевой продукт может быть добавлен к пище любого типа для любой подходящей цели, т.е. его не обязательно добавлять только в целях специального диетического применения.

Пищевой продукт, рассматриваемый в настоящем документе, также содержит измельченную канолу, муку из семян канолы или полученный из нее белок (т.е. мука, жмых или белок из муки) из семени NS-B50027-4 или потомства, происходящего из NS-B50027-4, содержащего по меньшей мере один локус из NS-B50027-4. В настоящее время использование муки канолы в специфических высококачественных промышленных кормах часто ограничивается вследствие ряда проблем, включая анти-питательные факторы, высокое содержание клетчатки, ограниченную усвояемость и отсутствие ω 3-FA или LC-PUFA, или источника белка низкой плотности. Обработка фракции жмыха семян канолы в белковый концентрат канолы может устранить эти проблемы, таким образом, что белок канолы, полученный из семени NS-B50027-4 или его потомства, обеспечивает подходящую замену для рыбной муки, муки канолы, соевой муки или концентрата соевого белка, а также ряда других широко используемых кормовых ингредиентов. Например, креветкам требуется десять незаменимых аминокислот. Канола имеет подходящий баланс аминокислот для креветок. Четыре жирные кислоты являются важными для креветок: LA, ALA и, более важно, EPA и DHA. Соотношение жирных кислот ω 3: ω 6 также является важным в кормах для креветок, при этом оптимальное отношение ω 3: ω 6 составляет около 2,5. Оптимальным считается общее включение в корм липидов, составляющее от 4,5 до 7,5%. Полезным будет включение некоторого количества масла в белок, полученный из муки, из линий канолы, описанных в настоящем документе. Кроме того, очевидная усвояемость сырого белка для креветок является высокой и составляет более 80%; и ранее исследования показали, что белок из растений хуже усваивается, чем белок, полученный из рыбной муки. Посредством фракционирования белка и концентрирования белка, полученного из жмыха канолы, описанной в настоящем документе, ожидается, что усвояемость будет точно соответствовать рыбной муке и может превосходить существующую в настоящее время муку канолы. Такие белковые продукты могут также обеспечить важные альтернативы рыбной муке в кормах для аквакультуры и наземных животных.

В другом аспекте NS-B50027-4 согласно настоящему изобретению обеспечивает способ лечения или предупреждения состояния, на которое будут оказывать благоприятный эффект PUFA, такие как ω 3-жирная кислота или DHA, при этом способ включает введение субъекту одного или более из следующего: липида или масла, полученного из NS-B50027-4; жирной кислоты, полученной из NS-B50027-4; клетки, полученной из NS-B50027-4; масличного растения, муки из семян или другой композиции, полученной или происходящей из NS-B50027-4. В другом аспекте предлагается способ изготовления лекарственного средства, при этом способ включает смешивание одного или более из следующего: липида или масла NS-B50027-4; жирной кислоты NS-B50027-4; клетки NS-B50027-4; масличного растения NS-B50027-4, части растения NS-B50027-4, семени NS-B50027-4, муки из семян NS-B50027-4; или другой композиции, содержащей любую из этих композиций, полученных или происходящих из NS-B50027-4 или его потомства; при этом лекарственное средство можно вводить в форме фармацевтической композиции, содержащей сложный этиловый эфир PUFA. Субъект может представлять собой человека или животное, не относящееся к человеку.

Примеры состояний, на которые может благоприятно влиять жирная кислота ω 3, включают повышенные уровни триглицеридов в сыворотке, повышенные уровни холестерина в сыворотке, такие как повышенный уровень холестерина LDL, сердечные аритмии, высокое кровяное давление, ишемическая болезнь сердца, респираторная дисфункция, воспаление, астма, ревматоидный артрит, язвенный колит, болезнь Крона, псориаз, агрегация тромбоцитов при экземе, желудочно-кишечные кровотечения, эндометриоз, предменструальный синдром, камни в почках, алкогольный синдром плода, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, униполярную депрессию, биполярную депрессию, агрессивную враждебность, шизофрению, адренолейкодистрофию, гипертензию, диабет, ожирение, остеопороз, болезнь Альцгеймера, хроническую обструктивную болезнь легких, рассеянный склероз, муковисцидоз, фенилкетонурию, миалгический энцефаломиелит, приобретенный иммунный дефицит, хроническую усталость после вирусной инфекции, рак или заболевание глаз.

Изготовление лекарственного средства может включать смешивание масла, полученного из NS-B50027-4, с фармацевтически приемлемым носителем для лечения состояния, приведенного в качестве примера в настоящем документе. Способ может включать очистку масла или переэтерификацию, или фракционирование масла для повышения уровня DHA. В конкретном варианте осуществления способ включает обработку липида или масла для превращения жирных кислот, содержащихся в масле, в сложные алкиловые эфиры, такие как сложные метиловые или этиловые эфиры. Дальнейшая обработка, такая как фракционирование или дистилляция, может применяться для обогащения липида или масла DHA. В иллюстративном варианте осуществления лекарственное средство содержит сложные этиловые эфиры DHA. Уровень сложных этиловых эфиров DHA в лекарственном средстве может находиться в

диапазоне от около 30% до около 50%, включительно, или составлять по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, включительно лекарственного средства, или жирнокислотного компонента лекарственного средства. Лекарственное средство может, кроме того, содержать сложные этиловые эфиры EPA или DPA, например, в количестве от 30 до 50% включительно, или по меньшей мере 90% от общего содержания жирных кислот в лекарственном средстве. Лекарственное средство может, кроме того, содержать сложные этиловые эфиры ALA, EPA или DPA, при этом содержание жирных кислот $\omega 3$ находится в диапазоне от около 30% до около 50%, включительно, или составляет по меньшей мере 90% от общего содержания жирных кислот в лекарственном средстве. Такие лекарственные средства являются подходящими для введения человеку или животным, как определено медицинским работником. Составление фармацевтических композиций, содержащих жирные кислоты, известно в данной области. Кроме того, как известно в данной области, желательно получение как минимум около 300 мг в день жирной кислоты $\omega 3$, особенно $\omega 3$ LC-PUFA, такой как EPA, DPA или DHA; но согласно рекомендациям медицинского работника могут быть подходящими дозы от 0,1 мг до 20 г в день или более конкретной жирной кислоты.

Кроме того, масло, полученное из NS-B50027-4, можно использовать в косметических целях: оно может быть добавлено к уже существующим косметическим композициям с образованием смеси или жирную кислоту, полученную, как описано в настоящем документе, можно применять в качестве "активного" ингредиента в косметической композиции. См., например, US 2008/0241082.

Кроме того, методики, которые обычно применяют на практике в данной области, можно использовать для экстракции, обработки и анализа масел, полученных в основном из семян NS-B50027-4. Масло может быть получено холодным прессованием, водной обработкой или более типичной обработкой. См., например, Mansour et al., 6 Nutrients 776 (2014); патент США 6599513. Например, семя NS-B50027-4 может быть подвергнуто холодному прессованию (например, с помощью винтового пресса) и масло отфильтровано; и оставшаяся жмыховая мука может быть подвергнута экстракции гексаном с получением дополнительного количества масла из измельченного/прессованного семени канолы.

При производстве пищевых продуктов, подвергшихся технологической обработке, семя канолы подвергают варке, прессованию и экстракции с получением сырого масла, которое затем дегуммируют, рафинируют, отбеливают и дезодорируют. Различные стадии могут быть проведены в атмосфере азота. В целом методы измельчения семян известны в данной области. Например, семена масличных культур могут быть размягчены (при необходимости) путем опрыскивания водой или замачивания в воде, чтобы повысить содержание влаги в семенах, например, до 7-8,5%. Размягченное семя вальцуют, например, с использованием гладкого вальца с установкой зазора от 0,23 до 0,27 мм. Нагревание можно применять для дезактивации ферментов, разрушения клеток, сливания капель масла и образования агломератов белковых частиц. Большая часть масла из семян выделяется путем прессования при прохождении через винтовой пресс, в результате чего образуется обработанная мука из семян ("жмых") и отжатое сырое масло. Сырое масло, полученное в результате операции прессования, может быть осветлено путем прохождения через отстойник с дренажной крышкой с прорезями для удаления твердых частиц, которые выделяются с маслом во время операции прессования. Это осветленное масло может быть прокачено через пластинчатый и рамочный фильтр для удаления любых оставшихся мелких твердых частиц. Жмых, выходящий из винтового пресса, часто содержит значительное количество масла, которое может быть экстрагировано растворителем, например, гексаном, используя, например, колонну с теплоконтролем для получения дополнительного количества масла из муки из семян. После удаления растворителя из сырого масла, полученного из шмыха, прессованные и экстрагированные масла могут быть объединены и подвергнуты дополнительным процедурам обработки масла. Например, экстрагированный липид или масло могут быть подвергнуты одной или нескольким стадиям обработки для увеличения чистоты липидного/масляного компонента. Например, стадии очистки могут включать обработку экстрагированного сырого масла по меньшей мере одним из следующих способов: дегуммирование, дезодорация, обесцвечивание, сушка, фракционирование или обогащение антиоксидантами (например, смешанными токоферолами).

Дегуммирование является первой стадией в рафинации масел и в первую очередь предназначено для удаления большей части фосфолипидов из масла, которые могут присутствовать в количестве примерно 1-2% от общего количества экстрагированного липида. Добавление воды, обычно содержащей 2% фосфорной кислоты, к сырому маслу при температуре 70-80°C приводит к отделению большей части фосфолипидов, следовых количеств металлов, пигментов и нерастворимого лецитина. Дегуммирование также может быть выполнено путем добавления концентрированной фосфорной кислоты к сырому маслу из семян для превращения негидратируемых фосфатидов в гидратируемую форму и для хелатирования незначительных количеств присутствующих металлов. Фосфолипидную эмульсию отделяют от масла из семян путем центрифугирования.

Щелочная рафинация, иногда также называемая как нейтрализация, обычно следует за дегуммированием и предшествует дезодорации и отбеливанию. Более конкретно после дегуммирования масло из семян титруют достаточным количеством щелочного раствора для нейтрализации свободной жирной кислоты и фосфорных кислот и отделения фракции триглицеридов. Подходящие щелочные соединения

включают гидроксид натрия, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид лития, гидроксид кальция, карбонат кальция и гидроксид аммония. Мыло удаляют путем центрифугирования или экстракции в растворитель для мыла, и нейтрализованное масло промывают водой. При необходимости любая избыточная щелочь в масле может быть нейтрализована подходящей кислотой, такой как соляная кислота или серная кислота.

Некоторые растительные масла, такие как соевое масло, обрабатываются комбинацией дегуммирования и нейтрализации. Для кондиционирования негидратируемых фосфатидов добавляют небольшое количество фосфорной или лимонной кислоты к сырому недегуммированному маслу. После интенсивного перемешивания добавляют разбавленную каустическую соду (7 и 12%) для нейтрализации свободных жирных кислот. Адекватное количество воды гидратирует фосфатиды в присутствии каустической соды. По истечении времени реакции в удерживающем смесителе масло нагревают и направляют непосредственно в сепаратор для отделения мыльного сырья. Нейтральное масло промывают в около 3-10% воды, чтобы уменьшить остаточное содержание мыла, и смесь разделяют на промывочную воду и масло. В вакуум-сушилке происходит снижение остаточной влаги в масле.

Дезодорация представляет собой обработку масел и жиров при высокой температуре (200~260°C) и низком давлении (0,1-1 мм рт.ст.), как правило, достигаемая путем подачи пара в масло из семян со скоростью около 0,1 мл/мин/100 мл масла из семян. Примерно через 30 мин такого барботирования масло из семян охлаждают под вакуумом. Масло из семян обычно переносят в стеклянный контейнер и промывают аргоном перед хранением в холодильнике. Эта обработка также улучшает цвет масла из семян и удаляет большую часть летучих или пахучих соединений, включая любые оставшиеся свободные жирные кислоты, моноацилглицерины или продукты окисления.

Отбеливание представляет собой это процесс рафинации, при котором масла нагревают при температуре 90-120°C в течение от 10-30 мин в присутствии (например, 0,2-2,0%) отбелочной глины (например, Trisyl® Silicas, W.R. Grace & Co., Columbia, Md., US) и в отсутствие кислорода (в атмосфере азота или в вакууме). На этой стадии происходит удаление нежелательных пигментов (каротиноидов, хлорофилла, госсипола и т.д.), а также продуктов окисления, следовых количеств металлов, соединений серы и следов мыла. "Масло RDB" относится к маслу, которое было рафинировано, дезодорировано и отбелено.

Винтеризация представляет собой процесс, который иногда используется в промышленном производстве масел для разделения масел и жиров на твердые (стеариновые) и жидкие (олеиновые) фракции путем кристаллизации при температурах ниже температуры окружающей среды. Некоторые растительные масла, такие как подсолнечное или кукурузное масло, содержат воски (сложные эфиры длинноцепочечных жирных спиртов и сложные эфиры жирных кислот), которые кристаллизуются при низких температурах и вызывают помутнение масла. Влажная винтеризация в комбинации с нейтрализацией является подходящей для удаления этих восков. Первоначально ее применяли к хлопковому маслу для получения продукта без содержания твердых частиц и можно также использовать для снижения содержания насыщенных жирных кислот в маслах.

Переэтерификация представляет собой процесс обмена жирными кислотами внутри и между молекулами триглицеридов (TAG) или переноса жирной кислоты в другой спирт с образованием сложного эфира. Вначале это может включать высвобождение жирных кислот из TAG в виде свободных жирных кислот, или непосредственное получение сложных эфиров жирных кислот, таких как сложные метиловые или этиловые эфиры жирных кислот. В реакции переэтерификации TAG со спиртом, таким как метанол или этанол, алкильная группа спирта образует сложноэфирную связь с ацильными группами (включая DHA) TAG. В сочетании с процессом фракционирования переэтерификацию можно использовать для модификации композиции жирных кислот липидов. Marangom et al., 6 Trends Food Sci. Technol. 329 (1995). Для переэтерификации можно использовать химические средства (например, катализируемая сильной кислотой или основанием) или ферментативные средства, причем последние используют липазы, которые могут быть позиционно специфичными (специфичными к положению sn-1/3- или sn-2) в отношении жирной кислоты TAG или иметь предпочтение в отношении одних жирных кислот по сравнению с другими. Adamczak, 13 Pol. J. Food Nutr. Sci., 3 (2004); Ferreira-Dias Elec., 16 J. Biotechnol. (2013).

Альтернативно на стадиях очистки можно избежать процессов переэтерификации или других процессов, которые изменяют состав жирных кислот в липиде или масле, с тем чтобы повысить содержание ДНА в процентах от общего содержания жирных кислот. Другими словами, состав/профиль жирных кислот очищенного липида или масла, полученного из семени NS-B50027-4 или его потомства, может быть по существу таким же, как и неочищенного липида или масла.

Необязательно фракционирование жирных кислот для увеличения концентрации LC-PUFA в масле может быть достигнуто любым из способов, известных в данной области, таких как, например, кристаллизация путем замораживания, комплексообразование с использованием мочевины, молекулярная дистилляция, сверхкритическая флюидная экстракция, противоточная хроматография и комплексообразование ионов серебра. Комплексообразование с мочевиной является предпочтительным способом из-за его простоты и эффективности в отношении снижения уровня насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в масле. Gamez et al., 36 Food Res. Int'l 721 (2003). Вначале TAG масла расщепляются на составляющие их жирные кислоты, часто в форме сложных эфиров жирных кислот, под действием липаз или

путем реакции гидролиза, катализируемой кислотой или основанием, в которой один моль TAG вступает в реакцию по меньшей мере с 3 молями спирта (например, этанолом для сложных этиловых эфиров или метанолом для сложных метиловых эфиров), при этом избыток спирта позволяет разделить образовавшиеся сложные алкиловые эфиры и образовавшийся глицерин. Свободные жирные кислоты или сложные эфиры жирных кислот обычно не изменяются в композиции жирных кислот при обработке и затем могут быть смешаны с этанольным раствором мочевины для образования комплекса. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты легко образуют комплекс с мочевиной и кристаллизуются при охлаждении и впоследствии могут быть удалены фильтрацией. Таким образом, готовая фракция, не содержащая мочевины, обогащается LC-PUFA.

Как отмечено, различные стадии или множество стадий могут быть проведены на практике в атмосфере азота, иной инертной атмосфере или вакууме, и желаемое масло или липид, полученный из семени NS-B50027-4 или его потомства, может быть упакован в атмосфере азота, инертного газа или вакуума, чтобы избежать окисления.

Также, как отмечено в настоящем документе, измельченную канолу, муку из семян или полученный из нее белок (т.е. муку, жмых или белок из муки) из семени, полученного из NS-B50027-4 или его потомства, можно применять для продуктов питания или корма. Прессованный жмых с высоким содержанием ДНА можно применять в виде жмыха с высоким содержанием масла, или же он может быть обезжирен гексаном для получения муки. Из обработанной гексаном муки обычно удаляют растворитель и поджаривают (DT-мука). Идентификация NS-B50027-4 и его потомства

Элитное генетическое событие может характеризоваться локализацией(ями) и конфигурацией в сайте(ах) встраивания рекомбинантной молекулы(молекул) ДНК в геном растения. Сайт генома растения, куда встраивают рекомбинантную кассету ДНК, также называют "сайтом инсерции" или "сайтом-мишенью". "Фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность" относится к участку ДНК длиной, например, по меньшей мере 20 пар оснований, по меньшей мере 50 пар оснований или до 5000 пар оснований генома растения, который располагается или непосредственно против хода транскрипции (5') и смежно с трансгенной кассетой, или непосредственно по ходу транскрипции (3') и смежно с трансгенной кассетой. Результатом процедур трансформации, приводящих к встраиванию чужеродной ДНК случайным образом, является образование трансформантов, содержащих различные фланкирующие области, характерные и уникальные для каждого трансформанта (элитное событие).

В другом аспекте предлагается способ получения происходящего из NS-B50027-4 растения *Brassica napus* или его частей, включающий скрещивание описанного выше растения *Brassica napus* или его частей со вторым растением для получения семени потомства первого поколения; выращивание указанного семени потомства первого поколения для получения растения F2 поколения; необязательно повтор стадий скрещивания и выращивания для получения последующих дочерних поколений указанного семени с получением происходящего из линии скрещивания NS-B50027-4 семени *Brassica napus*, растения или его частей. Также предлагается растение или части растения (включая любой гибрид), полученные этим способом. В одном варианте осуществления генетический признак, который был встроен в геном конкретного растения канолы, может быть перенесен в геном другого культивара с использованием традиционных методов разведения, хорошо известных в области разведения растений. Например, подход на основе возвратного скрещивания может быть использован для переноса трансгена из трансформированного культивара канолы в уже развитый культивар канолы и полученное в результате возвратного скрещивания растение будет тогда содержать трансген(ы).

Соответственно в другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагаются композиции, способы и наборы для детекции NS-B50027-4. Было бы полезно иметь возможность детекции наличия конкретного события, чтобы определить, содержит ли потомство полового скрещивания представляющий интерес трансген. Кроме того, способ детекции конкретного события будет полезен для соблюдения правил, требующих, например, предпродажного одобрения и маркировки продуктов питания, полученных из рекомбинантных сельскохозяйственных культур. Присутствие трансгена можно обнаружить любым известным способом детекции нуклеиновых кислот, таким как полимеразная цепная реакция (PCR) или гибридизация ДНК с использованием нуклеиновых кислот в качестве зондов. Указанные способы детекции обычно основаны на часто используемых генетических элементах, таких как промоторы, терминаторы, маркерные гены и т.д. В результате, такие способы могут оказаться непригодными для идентификации различия между разными событиями, в частности событиями, полученными с использованием аналогичных ДНК-конструкций, за исключением тех случаев, когда последовательность хромосомной ДНК, смежная со встраиваемой ДНК ("фланкирующая ДНК"), является известной. Специфический по отношению к событию PCR анализ описан. См., например, Windels et al., Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459 (1999) (где идентифицировано событие, сообщающее резистентность к глифосату у сои, путем PCR с использованием набора праймеров, перекрывающих участок соединения: первого праймера, включающего последовательность из вставки, и второго праймера, включающего последовательность из фланкирующей ДНК). Кроме того, вставка из шестнадцати генов NS-B50027-4 нарушала экспрессию гена *Brassica*, кодирующего белок, взаимодействующий с Pto (Pto-interacting protein, PTI), серин-треонинкиназу, участвующую в передаче сигнала, опосредованного гиперчувствительным ответом, рас-

положенную на хромосоме A05. Хотя никаких фенотипических изменений не наблюдалось, это обеспечивает еще один маркер для идентификации NS-B50027-4 или потомства, происходящего из NS-B50027-4.

Способы и наборы в настоящем документе являются полезными для идентификации в биологических образцах присутствия растительного материала, содержащего, в частности, трансгены в NS-B50027-4, а также трансгенных растений канолы, растительных материалов и семян, содержащих такое событие. Элитное событие NS-B50027-4, описанное в настоящем документе, может быть идентифицировано по генотипу, который может быть охарактеризован с помощью профиля генетического маркера, который может идентифицировать растения такого же культивара или родственного культивара, или быть использован для определения или подтверждения родословной. Профили генетических маркеров могут быть получены такими методами, как полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP), случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (Randomly Amplified Polymorphic DNAs, RAPD), произвольно праймированная полимеразная цепная реакция (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, AP-PCR), ДНК-амплификационный фотопринтинг (DNA Amplification Fingerprinting, DAF), амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью (Sequence Characterized Amplified Regions, SCAR), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP), простые повторяющиеся последовательности (Simple Sequence Repeats (SSR) (также называемые микросателлитами) и однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphisms (SNP).

Например, элитное событие NS-B50027-4, описанное в настоящем документе, может быть идентифицировано путем составления генетической карты из образца растительного материала. Генетическая карта может быть создана с помощью стандартных методов анализа RFLP, полимеразной цепной реакции (PCR) или SSR, которые идентифицируют приблизительное положение встроенной молекулы ДНК на хромосоме, кодирующей чужеродный белок. См. Glick & Thompson, *Methods in Plant Molec. Biol. & Biotechnol.*, 269 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1993). Информация о картировании в отношении хромосомной локализации полезна для защиты собственности на данное трансгенное растение. Например, карту области встраивания можно сравнить с аналогичными картами проверяемых растений, для того, чтобы определить, имеют ли последние общих родителей с данным растением. Сравнение карт может включать гибридизацию, RFLP, PCR, SSR и секвенирование, которые являются стандартными методиками.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагаются наборы и способы для определения, является ли растение канолы инбредной линией NS-B50027-4 или находится с ней в родстве, или является растением канолы, которое содержит по меньшей мере часть генетического элитного события линии NS-B50027-4. В настоящем документе описаны композиции и способ для простой и однозначной идентификации элитного события NS-B50027-4 в биологических образцах.

Например, набор может включать по меньшей мере один набор праймеров для идентификации одного или нескольких генетических маркеров NS-B50027-4, такой как набор смысловых (прямых) и анти-смысловых (обратных) праймеров. Конкретные варианты осуществления праймеров включают следующие праймеры, используемые в наборах для проведения анализов KASP для детекции генетических признаков NS-B50027-4, особенно полезные в исследованиях интрогрессии и выведении гибридов. См. пример 2. Эти праймеры могут состоять из молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере десять последовательных нуклеиновых кислот последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1-90 (см. табл. 14, пример 3), или их комплементов.

В настоящем изобретении также предлагаются способы идентификации растения канолы, содержащего элитное событие NS-B50027-4, включающие

(a) получение смеси, включающей биологический образец, содержащий ДНК растения канолы, и первый и второй праймеры нуклеиновой кислоты, способные амплифицировать молекулу нуклеиновой кислоты, специфичную для события NS-B50027-4;

(b) проведение реакции в смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновой кислоты амплифицировать молекулу нуклеиновой кислоты, специфичную для события NS-B50027-4; и

(c) детекцию присутствия амплифицированного фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты, при этом присутствие молекулы нуклеиновой кислоты, специфичной для элитного события канолы NS-B50027-4, указывает на то, что растение канолы является растением канолой NS-B50027-4.

В другом варианте осуществления предлагаются способы детекции молекулы нуклеиновой кислоты элитного события NS-B50027-4 в биологическом образце, включающие

(a) получение смеси, включающей биологический образец, содержащий ДНК, и зонд нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться с молекулой нуклеиновой кислоты, специфичной для события NS-B50027-4;

(b) проведение реакции в смеси в условиях, которые позволяют зонду гибридизоваться с молекулой нуклеиновой кислоты, специфичной для NS-B50027-4; и

(c) детекцию наличия гибридизованной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом присутствие молекулы нуклеиновой кислоты, специфичной для события NS-B50027-4, указывает на то, что образец содержит молекулу нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4.

В еще одном варианте осуществления предлагаются способы детекции присутствия молекулы нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4 в биологическом образце, включающие

(а) получение смеси, включающей биологический образец, содержащий ДНК, и первый праймер, способный к отжигу с участком встроенной молекулы нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4, и второй праймер, способный к отжигу с фланкирующей молекулой нуклеиновой кислоты в геноме клетки-хозяина;

(b) проведение реакции в смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновой кислоты продуцировать амплифицированную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую фрагмент встроенной молекулы нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4; и

(с) детекцию наличия амплифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом присутствие фрагмента встроенной молекулы нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4 показывает, что образец содержит встроенную ДНК события NS-B50027-4.

Правильное тестирование должно выявлять любые основные недостатки и уровень превосходства или улучшения над существующими коммерческими культиварами канолы. В дополнение к демонстрации улучшенных характеристик должен существовать спрос на новый культивар, который совместим с промышленными стандартами или который создает новый рынок. Введение нового культивара может внести дополнительные затраты производителю семян, производителю растений, переработчику и потребителю из-за специальной рекламы и продаж измененных семян и технологий коммерческого производства, и использования нового продукта. В тестировании, предшествующем выпуску нового культивара, следует учитывать затраты на исследования и выведение, а также техническое превосходство конечного культивара. Для размножаемых семенами культиваров должно быть возможным легкое и экономичное производство семян.

Потомство.

Линия NS-B50027-4, описанная в настоящем документе, может быть использована в качестве родительской для разведения других линий. Например, в качестве источника она может быть подвергнута самоопылению, скрещиванию, возвратному скрещиванию, применяться для получения двойных гаплоидов, используемых в качестве исходных материалов для генетической трансформации, или подвергнута генетической трансформации, в дальнейшем мутагенезу, и применяться для других форм разведения, как известно специалистам в данной области. Способы и результаты использования исходного материала для разведения других линий также находятся в пределах объема этих вариантов осуществления.

С появлением методов молекулярной биологии, которые обеспечили выделение и характеристику генов, кодирующих специфические белковые продукты, ученые в области биологии растений проявляли повышенный интерес к созданию генома растений, которые содержат и экспрессируют чужеродные гены, или дополнительные или модифицированные варианты нативных или эндогенных генов (возможно под управлением различных промоторов), для того чтобы определенным образом изменить генетические признаки растения. Любые последовательности ДНК, из разных видов или из одних и тех же видов, которые введены в геном с использованием трансформации или различных способов разведения, совместно называются в настоящем документе как "трансгены". За последние пятнадцать-двадцать лет было разработано несколько способов получения трансгенных растений, и настоящее изобретение в конкретных вариантах осуществления также относится к трансформированным версиям заявленной линии.

Нуклеиновые кислоты, олигонуклеотиды или полинуклеотиды относятся к молекулам РНК или ДНК, которые являются линейными или разветвленными, одно- или двухцепочечными, или их гибридам, включая гибриды РНК/ДНК. Эти термины также охватывают 3'-UTR и 5'-UTR, обычно по меньшей мере около 1000 нуклеотидов последовательности выше 5'-конца кодирующей области и по меньшей мере около 200 нуклеотидов последовательности ниже 3'-конца кодирующей области гена. Реже встречающиеся основания, такие как инозин, 5-метилцитозин, 6-метиладенин, гипоксантин и другие, могут быть также использованы для антисмыслового, дцРНК и рибозимного спаривания. Например, установлено, что полинуклеотиды, содержащие С-5 пропиновые аналоги уридина и цитидина, могут связываться с РНК с высокой степенью сродства и являются сильнодействующими антисмысловыми ингибиторами экспрессии генов. Можно также произвести другие модификации, такие как изменение фосфодиэфирного скелета или 2'-гидроксильной группы в рибозосахарной группе РНК. Антисмысловые полинуклеотиды и рибозимы могут состоять полностью из рибонуклеотидов или могут содержать смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Полинуклеотиды согласно изобретению могут быть получены любыми способами, включая геномные препараты, препараты кДНК, синтез *in vitro*, RT-PCR и транскрипцию *in vitro* или *in vivo*.

Трансформация растения включает конструирование вектора экспрессии, который будет функционировать в растительных клетках. Такой вектор включает ДНК, включающую ген под контролем регуляторного элемента или оперативно связанный с регуляторным элементом (например, промотором). Вектор экспрессии может содержать одну или несколько таких оперативно связанных комбинаций ген/регуляторный элемент. Вектор(ы) может(могут) быть в форме плазмиды и может быть использован самостоятельно или в комбинации с другими плазмидами, чтобы обеспечить трансформированные растения канолы, применяя способы трансформации, известные в данной области, для введения трансгенов

в генетический материал растения(й) канолы, включая растения канолы NS-B50027-4. Например, трансгенная кассета, содержащая ген(ы), кодирующий глицерол-3-фосфатацилтрансферазу (GPAT), ацилтрансферазу лизофосфатидной кислоты (LPAAT) или диацилглицеролацилтрансферазу (DGAT), может быть трансформирована в NS-B50027-4 для модификации жирной кислоты или синтеза TAG. См., например, Shrestha et al., 7 Front. Plant Sci. 1402 (2016).

Генетический признак, который был встроен в конкретное растение канолы с использованием способов трансформации, может быть перенесен в другую линию, используя традиционные способы разведения, хорошо известные в области разведения растений. Например, растения, несущие элитное событие NS-B50027-4, могут, например, быть получены из семени, депонированном в ATCC®. Такие растения могут быть затем размножены или использованы в традиционной схеме разведения для введения события NS-B50027-4 (т.е. биосинтеза LC-PUFA) в другие культивары такого же растения или растения родственных видов. Депонированные семена принадлежат видам *Brassica napus*. Тем не менее способы введения аллелей или трансгенов, локализованных на А-геноме или С-геноме из *B. napus* в *B. juncea*, хорошо известны в данной области и включают повторное возвратное скрещивание. Метод возвратного скрещивания можно использовать для переноса трансгена из трансформированного растения канолы в элитную инбредную линию, и полученное потомство содержит трансген. Кроме того, если для трансформации используется инбредная линия, то трансгенные растения могут быть скрещены с другой линией для получения трансгенного гибридного растения канолы. Используемый в настоящем документе термин "скрещивание" может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу возвратного скрещивания, в зависимости от контекста.

Различные генетические элементы могут быть, кроме того, введены в геном растения с использованием трансформации. Эти элементы включают, но без ограничения, гены; кодирующие последовательности; индуцибельные, конститутивные и тканеспецифичные промоторы; энхансерные последовательности; а также сигнальные и таргетные последовательности. Появление новых молекулярно-биологических методов позволило выделить и охарактеризовать генетические элементы со специфическими функциями, такими как кодирование специфических белковых продуктов. Ученые в области биологии растений проявили высокий интерес к созданию генома растений, которые содержат и экспрессируют чужеродные генетические элементы, или дополнительные или модифицированные версии нативных или эндогенных генетических элементов, для того чтобы специфическим образом изменить признаки растения. Любые молекулы ДНК, будь то из других видов или из одних и тех же видов, вставленные в геном с использованием трансформации, собирательно именуется в настоящем документе "трансгенами". Процесс "трансформации" представляет собой вставку ДНК в геном. Было разработано несколько способов получения трансгенных растений, и настоящее изобретение в конкретных вариантах осуществления также относится к трансформированным версиям заявленной линии канолы NS-B50027-4.

Для трансформации растений было разработано множество способов, включая протоколы биологической и физической трансформации растений. Кроме того, доступны экспрессионные векторы и способы культивирования *in vitro* для трансформации растительных клеток или тканей и регенерации растений. См., например, Miki et al., Procedures for introducing foreign DNA into plants, in Meth. Plant Molec. Biol. & Biotechnol. at 63 (Glick & Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, 1993); Gruber et al., Vectors for plant transformation, id. at R 89; Genetic transformation for the improvement of Canola, Proc. World Conf. Biotechnol. Fats & Oils Indus. at 43-46 (Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, IL, 1988).

Наиболее распространенные типы трансформации растений включают конструирование экспрессионного вектора. Такой вектор включает молекулу ДНК, которая содержит кодирующую область, находящуюся под контролем регуляторной области или оперативно связанную с регуляторной областью, например, промотором. Экспрессионный вектор может содержать один или несколько генов, и один или несколько регуляторных элементов. По меньшей мере одна из кодирующих областей и их соответствующие регуляторные элементы могут быть расположены в противоположной ориентации внутри вектора, обеспечивая бинарный вектор. Теоретически расположение генов, подверженных сайленсингу генов, в бинарной форме, может свести к минимуму сайленсинг генов. Вектор(ы) может(могут) быть в форме плазмиды и может(могут) быть использован(ы) самостоятельно или в комбинации с другими плазмидами, чтобы обеспечить трансформированные растения канолы, применяя способы трансформации, известные в данной области, для введения трансгенов в генетический материал растения NS-B50027-4 или растения, происходящего из NS-B50027-4.

Например, первоначальная трансформационная кассета, pJP3416_GA7-modB, включала семь генов, способных стимулировать накопление жирных кислот омега-3 в семени канолы, и селективируемый маркерный ген для облегчения отбора предполагаемых трансгенных растений *in vitro*. См. WO 2013185184; публикация патента США 20150374654; Petrie et al., 6 Plant Meth. 8 (2010). Экспрессируемые гены все являются синтетическими - кодон-оптимизированными и синтезированными - поскольку трансгенные молекулы ДНК не обнаружены ни в одном природном организме. Исходные последовательности ДНК, которые использовали в качестве шаблонов для оптимизации кодонов, были описаны. См. Petrie et al., 12 Metab. Eng'g 233 (2010a); Petrie et al., 11 Plant Methods 6 (2010b); Petrie et al., 21 Transgenic Res. 139 (2012).

Как известно в данной области, функциональные промоторы генов представляют собой участки

ДНК, которые являются важными для транскрипции генов, но не кодируют функциональные продукты, такие как пептиды. Например, типичный промотор для конститутивной экспрессии происходит из вируса мозаики цветной капусты. Kay et al., 236 Sci. 1299 (1987); Coutu et al., 16 Transgenic Res. 771 (2007). Промоторы под контролем индивидуального развития включают в себя промоторы, которые предпочтительно иницируют транскрипцию в конкретных тканях, таких как семена, листья, корни, волокна, сосуды ксилемы, трахеиды или склеренхима. Промоторы, имеющие особое значение, представляют собой "предпочтительные для семени" промоторы, которые иницируют транскрипцию преимущественно или только в семени. "Предпочтительные для семян" промоторы включают "специфичные для семени" промоторы (т.е. промоторы, активные во время развития семян, такие как промоторы запасных белков семян) и промоторы "прорастания семени" (т.е. промоторы, активные во время прорастания семян). См. Thompson et al., 10 BioEssays 108 (1989). Такие предпочтительные для семени промоторы включают, но без ограничения, Cim1 (цитокинин-индуцированный сигналинг); cZ19B1 (19 кДа зеин кукурузы); milps (миоинозит-1-фосфат-синтаза) (см. WO 2000/11177 и патент США 6225529). Для двудольных специфичные для семени промоторы включают, но без ограничения, бета-фазеолин фасоли, напин, бета-конглианин, лектин сои, круциферин, конглианин и т.п. Специфичные для семян промоторы, используемые в GA7-modB, были описаны ранее: A. thaliana FAE1 (Rossack et al., 46 Plant Molec. Biol. 717 (2001)); L. usitatissimum Cnl1 и Cnl2 (Chaudhary et al., WO 2001016340); и усеченный промотор напина из B. napus (Stalberg et al., 23 Plant Molec. Biol. 671 (1993)). См. также WO 2013185184.

"Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который может регулироваться окружающей средой. Примеры условий окружающей среды, при которых может происходить транскрипция индукцибельными промоторами, включают анаэробные условия или присутствие света. Специфичные для ткани, предпочтительные для ткани (например, специфичные для семени) и индукцибельные промоторы представляют класс "неконститутивных" промоторов. See Ward et al., 22 Plant Mol. Biol. 361 (1993); Meft et al., 90 PNAS 4567 (1993) (индуцируемые медью); Gatz et al., 243 Mol. Gen. Genet. 32 (1994) (индуцируемые антидотами гербицидов); Gatz et al., 227 Mol. Gen. Genet. 229 (1991) (индуцируемые тетрациклином); Schena et al., 88 PNAS 10421 (1991) (индуцируемые глюкокортикоидами). См. также WO 2001016340 и обсуждаемые в них промоторы.

"Конститутивный" промотор представляет собой промотор, который может быть активным в большинстве условий окружающей среды. Типичные конститутивные промоторы включают промоторы из растительных вирусов, такие как промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты (CMV) (Odell et al., 313 Nature 810 (1985)) и промоторы из таких генов, как рисовый актин (McElroy et al., 2 Plant Cell 163 (1990)); убиквитин (Christensen et al., 12 Plant Mol. Biol. 619 (1989); Christensen et al., 18 Plant Mol. Biol. 6759 (1992)); pEMU (Last et al., 81 Theor. Appl. Genet. 581 (1991)); MAS (Velten et al., 3 EMBO J. 2723 (1984)), и гистон H3 кукурузы (Lepetit et al., 231 Mol. Gen. Genet. 276 (1992); Atanassova et al., 2 Plant J. 291 (1992)). Промотор ALS, фрагмент 5' XbaI/NcoI к структурному гену Brassica napus ALS3 (или нуклеотидная последовательность, подобная указанному фрагменту XbaI/NcoI) представляет собой другой конститутивный промотор. См. также заявку WO 1996/30530 и обсуждаемые в ней промоторы. Промотор CMV также связан с полезной энхансерной областью. См, например, WO 1996/30530 и WO 2013185184, и промоторы, обсуждаемые в них.

Терминаторные области, которые включают сигналы полиаденилирования, необходимы для продуцирования полных и стабильных молекул мРНК. Например, терминатор нопалинсинтазы A. tumefaciens (NOS) обеспечивает полезный терминатор. Bevan, 12 Nucl. Acid Res. 8711 (1984); Rogers et al., in Biotechnol. Plant Sci. at 219 (Acad. Press, Inc., New York, NY, 1985); Sanders et al., 15 Nucl. Acids Res. 1543 (1987). Ряд регуляторных последовательностей использовали в комбинации для управления и терминции транскрипции различных экспрессионных кассет.

Транспорт белка, продуцируемого трансгенами, в субклеточное пространство, например, в хлоропласт, вакуолю, пероксисому, глиоксисому, клеточную стенку или митохондрию, или для секреции в апопласт, может осуществляться посредством функционального присоединения нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, к 5'- или 3'-области гена, кодирующего рассматриваемый белок. Нацеливание последовательностей на 5'- или 3'-конце структурного гена во время синтеза и процессинга белка может определить, где может произойти окончательная компартиментализация кодируемого белка.

Присутствие сигнальной последовательности направляет полипептид или к внутриклеточному органоиду, или в субклеточное пространство, или для секреции в апопласте. В данной области известно множество сигнальных последовательностей. См., например, Becker et al., 20 Plant Mol. Biol. 49 (1992); Knox et al., 9 Plant Mol. Biol. 3 (1987); Lerner et al., 91 Plant Physiol. 124 (1989); Fontes et al., 3 Plant Cell 483 (1991); Matsuoka et al., 88 PNAS 834 (1991); Creissen et al., 2 Plant J. 129 (1991); Kalderon et al., 39 Cell 499 (1984); Steifel et al., 2 Plant Cell 785 (1990).

Векторы экспрессии обычно включают по меньшей мере один генетический маркер, функционально связанный с регуляторным элементом (например, промотором), который позволяет восстанавливать несущие маркер трансформированные клетки или путем отрицательной селекции, т.е. ингибированием роста клеток, которые не содержат селективируемый маркерный ген, или путем положительной селекции,

т.е. скринингом продукта, кодируемого генетическим маркером. В методиках трансформации известно множество селективируемых маркерных генов для трансформации растений, и они включают, например, гены, кодирующие ферменты, которые метаболически детоксифицируют селективный химический агент, который может представлять собой антибиотик или гербицид, или гены, кодирующие измененную мишень, которая может быть нечувствительной к ингибитору. В данной области также известен ряд способов положительной селекции.

Один широко используемый селективируемый маркерный ген, подходящий для трансформации растений, может включать в себя ген неомицин-фосфотрансферазы II (nptII), выделенный из транспозона Tn5, который при помещении под контроль регуляторных сигналов растения придает устойчивость к канамицину. Fraley et al., 80 PNAS 4803 (1983). Другим обычно используемым селективируемым маркерным геном может быть ген гигромицин-фосфотрансферазы, который придает устойчивость к антибиотику гигромицину. Vanden Elzen et al., 5 Plant Mol. Biol., 299 (1985). Дополнительные селективируемые маркерные гены бактериального происхождения, которые придают устойчивость к антибиотикам, включают гентамицин-ацетилтрансферазу, стрептомицин-фосфотрансферазу, аминогликозид-3'-аденил-трансферазу и детерминанту устойчивости к блеомицину. Hayford et al., 86 Plant Physiol. 1216 (1988); Jones et al., 210 Mol. Gen. Genet., 86 (1987); Svab et al., 14 Plant Mol. Biol. 197 (1990); Hille et al., 7 Plant Mol. Biol. 171 (1986). Другие селективируемые маркерные гены придают устойчивость к гербицидам, таким как глифосат, глюфосинат или бромоксирил. Comai et al., 317 Nature 741 (1985); Gordon-Kamm et al., 2 Plant Cell 603 (1990); Stalker et al., 242 Sci. 419 (1988). Селективируемые маркерные гены, подходящие для трансформации растений, не имеющие бактериального происхождения, включают, например, мышиную дигидрофлат-редуктазу, растительную 5-энолпирувиллицимат-3-фосфат-синтазу и растительную ацетолактат-синтазу. Eichholtz et al., 13 Somatic Cell Mol. Genet. 67 (1987); Shah et al., 233 Sci. 478 (1986); Charest et al., 8 Plant Cell Rep. 643 (1990).

Для другого класса маркерных генов, подходящих для трансформации растений, необходим скрининг предположительно трансформированных растительных клеток, а не прямая генетическая селекция трансформированных клеток на устойчивость к токсическому веществу, например к антибиотику. Эти гены особенно полезны для количественного определения или визуализации пространственной характеристики экспрессии гена в конкретных тканях, и часто их называют репортерными генами, поскольку для изучения генной экспрессии их можно сливать с геном или регуляторной последовательностью гена. Обычно используемые гены для скрининга трансформированных клеток включают α -глюкуронидазу (GUS), α -галактозидазу, люциферазу и хлорамфеникол-ацетилтрансферазу. Jefferson, 5 Plant Mol. Biol. 387 (1987); Teeri et al., 8 EMBO J. 343 (1989); Koncz et al., 84 PNAS 131 (1987); DeBlock et al., 3 EMBO J. 1681 (1984). Некоторые способы визуализации активности GUS in vivo не требуют разрушения растительной ткани. Molecular Probes, Publication 2908, IMAGE GREEN, 1-4 (1993); Naleway et al., 115 J. Cell Biol. 151a (1991). Вместе с тем эти способы in vivo для визуализации активности GUS не доказали свою полезность для восстановления трансформированных клеток из-за низкой чувствительности, высоких исходных уровней флуоресценции и ограничений, связанных с использованием генов люциферазы в качестве селективируемых маркеров. Зеленый флуоресцентный белок (GFP) может быть использован в качестве маркера генной экспрессии в прокариотических и эукариотических клетках. Chalfie et al., 263 Sci. 802 (1994). В качестве возможных для скрининга маркеров можно использовать флуоресцентные белки (GFP) и мутации GFP.

NS-B50027-4 и потомство NS-B50027-4 может быть, кроме того, трансформировано для придания устойчивости к болезням или вредителям. Например, линия растений может быть трансформирована клонированным геном устойчивости, чтобы создать растения, которые являются устойчивыми к определенным патогенным штаммам. См., например, Jones et al., 266 Sci. 789 (1994) (клонирование гена томата Cf-9 для устойчивости к *Cladosporium flavum*); Martin, et al., 262 Sci. 1432 (1993) (ген Pto томата для устойчивости к *Pseudomonas syringae* pv. tomato, кодирующий протеинкиназу); Mindrinos et al., 78 Cell 1089 (1994) (ген Arabidopsis RSP2 для устойчивости к *P. syringae*); Geiser et al. 48 Gene 109 (1986) (ген δ -эндотоксина *Bacillus thuringiensis*); Van Damme et al., 24 Plant Mol. Biol. 25 (1994) (ген лектина, связывающий маннозу из *Clivia miniata*); Sumitani et al., 57 Biosci. Biotech. Biochem. 1243 (1993) (ингибитор амилазы); Abe et al., 262 J. Biol. Chem. 16793 (1987) (ингибитор протеиназы цистеина риса); Huub et al., 21 Plant Mol. Biol. 985 (1993) (ингибитор I протеиназы табака); Regan, 269 J. Biol. Chem. 9 (1994) (рецептор диуретического гормона насекомого); Pratt et al., 163 Biochem. Biophys. Res. Comm. 1243 (1989) (аллостатин); Tomalski et al., патент США 5266317 (гены, кодирующие специфичные для насекомого паралитические нейротоксины); Scott et al., WO 1993/02197 (ген каллазы); Kramer et al., 23 Insect Biochem. Mol. Biol. 691 (1993) (хитиназа табачного бражника); Kawalleck et al., 21 Plant Mol. Biol. 673 (1993) (ген полиубиквитина ubi4-2 петрушки); WO 1995/16776 (производные пептида тахиплесина, которые ингибируют грибковые патогены растений); WO 199518855 (синтетические антибактериальные пептиды); Jaynes et al., 89 Plant Sci. 43 (1993) (секропин- β -литический аналог пептида для придания трансгенным растениям табака устойчивости к *Pseudomonas solanacearum*); Botella et al., 24 Plant Mol. Biol., 24:757 (1994) (кальмодулин бобов мунг); Griess, et al., 104 Plant Physiol. 1467 (1994) (кальмодулин кукурузы);

Taylor, et al., Тезис № 497, Седьмой Международный симпозиум по молекулярным взаимодействиям растение - микроорганизм (Эдинбург, Шотландия) (1994) (ферментативная инактивация в трансгенном табаке путем продукции фрагментов одноцепочечных антител); Tavladorakiet al., 366 Nature 469 (1993) (устойчивость к вирусам посредством трансгенного антитела); Lamb et al., 10 Bio technol. 1436 (1992) (грибковые эндо- α -1,4-D-полигалактуроназные фрагменты способствуют грибковой колонизации и высвобождению растительного питательного вещества путем солиubilизации гомо- α -1,4-D-галактуроназы стенки растительной клетки); Toubart et al., 2 Plant J. 367 (1992) (белок, ингибирующий эндополигалактуроназу бобов); Logemann et al., 10 Bio/technology 305 (1992) (трансгенные растения, которые экспрессируют ген, инактивирующий рибосому ячменя, имеют повышенную устойчивость к грибковым болезням).

Как уже отмечалось, устойчивость к гербицидам является еще одним полезным признаком, который может быть введен путем генетической модификации. Например, устойчивость к гербицидам, которые ингибируют точку роста или меристему, таким как имидазолинон или сульфонилмочевина, может быть придана мутантными ферментами ALS и AHAS. См., например, Lee et al., 7 EMBO J. 1241 (1988); Miki et al., 80 Theor. Appl. Genet. 449 (1990); устойчивость к глифосату придается мутантными генами 5-энолпирулшкимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) и генами agoA; устойчивость к глюофосинату придается генами фосфинотрицин-ацетилтрансферазы; и гены, кодирующие ингибитор ACCase, придают устойчивость к пиридинокси или фенокси-пропионовым кислотам и циклогексонам. См., например, патент США 4940835 (EPSPS придает устойчивость к глифосату); мутантный ген agoA, номер доступа ATCC® 39256, см. Comai, патент США 4769061; см. также Umaballava-Mobapathie, 8 Transgen. Res. 33 (1999) (салат *Lactuca sativa*, устойчивый к глюофосинату); Kumada et al., EP 0 333 033; Goodman et al., патент США 4975374 (гены глутаминсинтазы придают устойчивость к гербицидам, таким как L-фосфинотрицин); Leemans et al., EP 0242246 (фосфинотрицин-ацетилтрансфераза); DeGreef et al., 7 Bio/technol. 61 (1989) (химерные гены bar, кодирующие фосфинотрицинацетилтрансферазную активность); Marshall et al., 83 Theor. Appl. Genet. 435 (1992) (гены Accl-S1, Accl-S2 и Accl-S3 придают устойчивость к феноксипропионовым кислотам и циклогексонам, таким как сетоксидим и галоксифоп); Przibilla et al., 3 Plant Cell 169 (1991) (гены PsbA и gs^+ придают устойчивость к триаину); Stalker, патент США 4810648 (гены нитриказы придают устойчивость к бензонитрилу); Hayes et al., 285 Biochem. J. 173 (1992) (глутатион-S-трансфераза); Hattori et al., 246 Mol. Gen. Genet. 419 (1995) (синтаза ацетогидроксикислоты придает устойчивость к множеству гербицидов); Shiota et al., 106 Plant Physiol. 17 (1994) (NADPH-цитохром P450-оксидоредуктаза дрожжей); Aono et al., 36 Plant Cell Physiol. 1687 (1995) (глутатионредуктаза и супероксиддисмутаза); Datta et al., 20 Plant Mol. Biol. 619 (1992) (различные фосфотрансферазы); WO 01/12825; патенты США 6288306; 6282837; 5767373 (растения с измененной активностью протока, устойчивые к гербицидам, нацеленным на проток).

NS-B50027-4 и потомство, происходящее из NS-B50027-4, может быть дополнительно модифицировано для придания любого количества признаков с добавленной ценностью, известных в данной области. См., например, Goto, et al., 521 Acta Horticult. 101 (2000) (ген ферритина сои); Curtis et al., 18 Plant Cell Rep. 889 (1999) (нитратредуктаза); Knultzon et al., 89 PNAS 2625 (1992) (стеарил-ACP-деацетилаза); Shiroza et al., 170 J. Bacteriol. 810 (1988) (нуклеотидная последовательность мутантного гена фруктозилтрансферазы *Streptococcus*); Steinmetz et al., 20 Mol. Gen. Genet. 220 (1985) (ген левансуказы *Bacillus subtilis*); Pen et al., 10 Bio/technol. 292 (1992) (трансгенные растения экспрессируют α -амилазу *Bacillus licheniformis*); Elliot et al., 21 Plant Mol. Biol. 515 (1993) (гены инвертазы томата); Sogaard et al., 268 J. Biol. Chem. 22480 (1993) (сайт-направленный мутагенез гена α -амилазы ячменя); Fisher et al., 102 Plant Physiol. 1045 (1993) (крахмалветвящий фермент II эндоспермы кукурузы).

Линия канолы NS-B50027-4 также может быть подвергнута манипуляциям для обеспечения мужской стерильности с помощью любого из ряда способов, известных в данной области, включая использование механических способов, химических способов, самонесовместимости (SI), цитоплазматической мужской стерильности (CMS, Ogura или другая система) или ядерной мужской стерильности (NMS). Выражение "подвергнута манипуляциям для обеспечения мужской стерильности" относится к использованию любых доступных методов для получения мужской стерильной версии линии NS-B50027-4 канолы. Мужская стерильность может быть частичной или полной мужской стерильностью. См., например, WO 2001/29237 (введение гена деацетилазы под контролем тапетум-специфического промотора и с применением химической N-Ас-PPT); WO 199213956, WO 199213957 (промоторы, специфичные для тычинки); Paul et al., 19 Plant Mol. Biol. 611 (1992) (введение генов барназы и барстара); см. также патенты США № 5859341; 6297426; 5478369; 5824524; 5850014; 6265640; Hanson et. al., 16 Plant Cell S154 (2004).

Разработаны многочисленные способы трансформации растений, включая биологические и физические протоколы трансформации растений. См., например, WO 2013185184; Miki et al., in Meths. Plant Molec. Biol. Biotechnol. at 67-88 (Glick & Thompson, Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993). Кроме того, доступны экспрессионные векторы и способы культивирования *in vitro* для трансформации растительных клеток или тканей и регенерации растений. См., например, WO 2013185184; Gruber et al., Meths. Plant Molec. Biol. Biotechnol. at 89-119 (Glick & Thompson, Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993). В одном из способов введения экспрессионного вектора в растения используется естественная система

трансформации *Agrobacterium*, см. Horsch et al., 227 Sci. 1229 (1985); Curtis et al., 45 J. Exper. Botany 1441 (1994); Torres et al., 34 Plant Cell Tissue Organ Culture 279 (1993); Dinant et al., 3 Molec. Breeding 75 (1997); Kado, 10 Crit. Rev. Plant Sci. 1 (1991) (плазмиды Ti и Ri *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* соответственно, несут гены, ответственные за генетическую трансформацию растений); Gruber et al.; Miki et al.; Moloney et al., 8 Plant Cell Rep. 238 (1989) (векторные системы для *Agrobacterium* и способы *Agrobacterium*-опосредованного переноса генов); патент США № 5591616.

В качестве альтернативы трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, было разработано несколько способов трансформации растения, которые совместно называются прямым переносом генов. Широко применяемым способом трансформации растений является трансформация, опосредованная микрочастицами, при которой ДНК переносится на поверхность микрочастиц размером от 1 до 4 мкм. Вектор экспрессии вводится в ткани растений при помощи биолистического устройства, которое разгоняет микрочастицы до скорости 300-600 м/с, достаточной для проникновения через стенки и мембраны растительных клеток. Russell et al., 12 Plant Cell Rep. 165 (1993); Aragao et al., 20 Plant Mol. Biol. 357 (1992); Aragao et al., 12 Plant Cell Rep. 483 (1993); Aragao, 93 Theor. Appl. Genet. 142 (1996); Kim & Minamikawa, 117 Plant Sci. 131 (1996); Sanford et al., 5 Part. Sci. Technol. 27 (1987); Sanford, 6 Trends Biotech. 299 (1988); Klein et al., 6 Bio/technol. 559 (1988); Sanford, 7 Physiol. Plant, 206 (1990); Klein et al., 10 Bio/technol. 268 (1992).

Способы физической доставки ДНК в растения также известны в данной области. См., например, Zhang et al., 9 Bio/technol. 996 (1991) (обработка ультразвуком); Deshayes et al., 4 EMBO J. 2731 (1985) (липосомы); Christou et al., 84 PNAS 3962 (1987) (сферопласт NHW11915); Hain et al., 199 Mol. Gen. Genet. 161 (1985) (Осаждение CaCl_2); Draper et al., 23 Plant Cell Physiol. 451 (1982) (поливиниловый спирт или поли-L-орнитин); Saker et al., 40 Biologia Plantarum, 507 (1997/98) (электропорация протопластов). Дополнительные способы включают, но без ограничения, экспрессионные векторы, вводимые в растительные ткани посредством использования прямого способа переноса генов, такого как опосредованная микрочастицами доставка с помощью биолистического устройства, инъекция ДНК, электропорация и т.п. После трансформации экспрессия описанных выше селективируемых маркерных генов может обеспечить возможность предпочтительного отбора трансформированных клеток, тканей или растений с использованием способов регенерации и отбора, хорошо известных в данной области. См., например, WO 2013185184.

Вышеупомянутые способы трансформации обычно применяют для получения трансгенной линии. Затем трансгенная линия может быть скрещена с другой (нетрансгенной, мутированной или трансформированной) линией для того, чтобы получить новую трансгенную линию канолы. Альтернативно, генетический признак, встроенный в конкретный гибрид растения *Brassica*, такого как *B. napus* или *B. juncea*, с использованием хорошо известных способов трансформации, может быть перенесен в другую линию с использованием стандартных методов скрещивания, возвратного скрещивания и самоопыления, которые также хорошо известны в области разведения растений. Например, подход на основе возвратного скрещивания может быть использован для переноса встроенного признака из общедоступной незлитной инбредной линии в элитную инбредную линию, или из инбредной линии, содержащей чужеродный ген в своем геноме, в инбредную линию или линии, которые не содержат этот ген. Используемый в настоящем документе термин "скрещивание" может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу возвратного скрещивания, в зависимости от контекста.

Когда термин "растение NS-B50027-4" употребляется в контексте настоящих вариантов осуществления, это также включает любые конверсии гена этой линии. Термин "растение с конвертированным геном" относится к тем растениям NS-B50027-4, которые получены методами возвратного скрещивания, генной инженерии или мутации, при этом по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики сорта получены в дополнение к одному или нескольким генам, перенесенным в линию, происходящую из NS-B50027-4, посредством метода возвратного скрещивания, генной инженерии или мутации. Методы возвратного скрещивания могут быть использованы в настоящем изобретении для улучшения или введения характеристики в сорт растения. Используемый в настоящем документе термин "возвратное скрещивание" относится к многократному возвратному скрещиванию гибридного потомства с рекуррентным родителем, т.е. возвратное скрещивание 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более раз с рекуррентным родителем. Родительское растение, которое вносит в ген(ы) желаемую характеристику, называется "нерекуррентным" или "родителем-донором". Эта терминология относится к тому факту, что неrecurрентный родитель употребляется один раз в протоколе возвратного скрещивания и поэтому не повторяется. Родительское растение *Brassica* или канолы, в которое переносится ген или гены из неrecurрентного родителя, известно как рекуррентный родитель, поскольку оно используется для нескольких циклов в протоколе возвратного скрещивания. Poehlman & Sleper, 1994; Fehr, 1993. В типичном протоколе возвратного скрещивания исходный интересующий сорт (рекуррентный родитель) скрещивается со вторым сортом (нерекуррентным родителем), который несет единственный интересующий ген для переноса. Полученное потомство от этого скрещивания затем снова скрещивается с рекуррентным родителем, и процесс повторяется, пока не будет получено растение канолы или *Brassica*, в котором по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики рекуррентного родителя получают в конвертированном растении в дополнение к перенесенному(ым) гену(ам) из неrecurрентного родителя. Со-

ответственно один или два локуса из NS-B50027-4 могут быть перенесены в другую линию канолы или Brassica.

Выбор подходящего рекуррентного родителя является важным шагом для успешной процедуры возвратного скрещивания. Целью протокола возвратного скрещивания является изменение или замена признака или характеристики в исходной линии. Для выполнения этого ген рекуррентного родителя модифицируется или заменяется желаемым геном из нереккуррентного родителя, при этом оставляя по существу весь остальной желаемый генетический и потому желаемый физиологический и морфологический состав исходной родительской линии. Выбор конкретного нереккуррентного родителя будет зависеть от цели возвратного скрещивания. Одной из главных целей интрогрессии является добавление некоторого коммерчески желаемого, агрономически важного признака растения. Точный протокол возвратного скрещивания будет зависеть от характеристики или признака, изменяемого для определения подходящего тестирующего протокола. Хотя методы обратного скрещивания упрощаются, когда переносимая характеристика представляет собой доминантную аллель, рецессивная аллель также может быть перенесена. В этом случае может потребоваться введение теста потомства для того, чтобы определить, была ли желаемая характеристика успешно перенесена.

Могут быть идентифицированы генетические признаки, которые обычно не выбираются при разработке новой линии, но которые могут быть улучшены с помощью методов возвратного скрещивания. Такие признаки могут быть или не быть трансгенными. Примеры этих признаков включают, но без ограничения, мужскую стерильность, модифицированный метаболизм углеводов, устойчивость к гербицидам, устойчивость к бактериальным, грибковым или вирусным заболеваниям, устойчивость к насекомым, повышение качества питательности, промышленную применимость, стабильность урожая и повышенную урожайность. Эти гены обычно наследуются через ядро. См., например, патенты США 5969212; 7164059.

Дальнейшее воспроизводство инбредной линии NS-B50027-4 может происходить тканевой культурой и регенерацией. Термин "тканевая культура" обозначает смесь, включающую изолированные клетки одного и того же или разного вида, или скопление таких клеток, организованных в части растения. Типичными видами тканевых культур являются протопласты, каллус, растительные куски и клетки растения, которые могут генерировать цельную тканевую культуру в растениях или частях растений, такую как листья, пыльца, эмбрионы, корни, кончики корней, пыльники, пестики, цветки, семена, черешки, пасынки и т.п. Средства подготовки и поддержания растительной тканевой культуры хорошо известны в данной области. Тканевая культура различных тканей канолы и регенерация из нее растений хорошо известны. См., например, Teng et al., 27 HortSci. 1030 (1992); Teng et al., 28 HortSci. 669 (1993); Zhang et al., 46 J. Genet. Breeding 287 (1992); Webb et al., 38 Plant Cell Tissue Organ Cult. 77 (1994); Curtis et al., 45 J. Exp. Bot. 1441 (1994); Nagata et al., 125 J. Am. Soc'y Hort. Sci. 669 (2000); Ibrahim, et al., 28 Plant Cell Tissue Organ Cult. 139 (1992); патенты США 5959185; 5973234; 5977445; 8816111. Тканевая культура, а также культура микроспор может быть успешно получена для регенерации растений канолы. См. Chuong et al. 4 Plant Cell Rep. 4 (1985); Barsby et al., 5 Plant Cell Rep. 101 (1986); Kartha et al., 31 Physiol. Plant 217 (1974); Narasimhulu et al., 7 Plant Cell Rep. 104 (1988); Swanson, 6 Meth. Molec. Biol. 159 (1990); Cell Culture Tech. & Canola Improvement, 66 J. Am. Oil Chem. Soc. 455 (1989). Из литературы ясно, что уровень техники таков, что эти способы получения растений обычно используются с высокой степенью успеха. Таким образом, в другом аспекте настоящих вариантов осуществления предлагаются клетки, которые после выращивания и дифференциации воспроизводят растения канолы, обладающие физиологическими и морфологическими характеристиками инбредной трансгенной линии NS-B50027-4.

Как правило, когда трансген вводят в растение посредством традиционного скрещивания, его сайт вставки в растительный геном и его фланкирующие области не изменяются. "Область вставки" относится к области, соответствующей области по меньшей мере 40 пар оснований, такой как по меньшей мере 100 пар оснований или до более чем 10000 пар оснований, окруженной расположенными выше (положение "апстрим") и ниже (положение "даунстрим") фланкирующими областями трансгена в геноме (не-трансформированного) растения и включающей сайт инсерции (и возможную делецию сайта-мишени). Принимая во внимание незначительные различия из-за мутаций внутри видов, область вставки будет сохранять по меньшей мере 85%, например 90, 95 или 100%, идентичность последовательности с последовательностью, содержащей расположенные выше (положение "апстрим") и ниже (положение "даунстрим") фланкирующие области чужеродной ДНК в заданном растении этих видов. Однако вставка трансгенной кассеты в геном растения иногда может быть связана с делецией растительной ДНК, называемой как "делеция сайта-мишени". Тем не менее дополнительные трансгены или другие генетические манипуляции могут быть сделаны в NS-B50027-4 без проведения излишних экспериментов; и растения, происходящие из NS-B50027-4, могут быть идентифицированы, как описано в настоящем документе.

Исходный материал NS-B50027-4 может быть использован для получения линий для получения гибридных семян, например, если его подвергают возвратному скрещиванию с источником цитоплазматической мужской стерильности или каким-либо другим источником для стерилизации инбредной линии как женской. Альтернативно, линия может быть использована напрямую. Например, линия B. napus NS-B50027-4 может быть скрещена с другим растением канолой для формирования популяции растений F1

первого поколения. Популяция растений F1 первого поколения, полученная этим способом, также является вариантом осуществления. Эта популяция растений F1 первого поколения содержит по существу полный набор аллелей линии канолы NS-B50027-4.

Обычно считается, что гибрид F1 имеет все аллели каждого родителя. Специалист в данной области может использовать книги по разведению или молекулярные способы для идентификации конкретного растения F1, полученного с использованием линии канолы NS-B50027-4, и любое такое индивидуальное растение также охвачено данным изобретением. Эти варианты осуществления также охватывают применение этих способов с использованием трансгенной линии NS-B50027-4 или конверсий одиночного гена линии NS-B50027-4.

В другом варианте осуществления предлагается способ использования линии канолы NS-B50027-4 в возвратном скрещивании с рекуррентным родителем любое количество раз. Используя трансгенные способы, описанные в настоящем документе, способы возвратного скрещивания или другие способы разведения, известные специалисту в данной области, можно разработать индивидуальные растения и популяции растений, которые удерживают по меньшей мере 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% генетического профиля линии канолы NS-B50027-4. Процент генетического профиля, удерживаемый у потомства, может быть измерен с помощью анализа родословной или посредством использования генетических методов, таких как молекулярные маркеры или электрофорез. В анализе родословной в среднем 50% исходной зародышевой плазмы будет передаваться линии потомства после одного скрещивания с другой линией, 25% после еще одного скрещивания с другой линией и т.д. Молекулярные маркеры также могут быть использованы для подтверждения и/или определения родословной линии потомства.

Конкретный способ получения линии, происходящей из линии канолы NS-B50027-4, состоит в следующем. Специалист в данной области скрещивал линию канолы NS-B50027-4 с другим растением канолы, таким как элитная/изогенная линия. Семя F1, полученное в результате этого скрещивания, выращивали с получением однородной популяции. Семя F1 содержало 50% аллелей из линии канолы NS-B50027-4 и 50% аллелей другого растения. Семя F1 выращивали и подвергали самоопылению, тем самым получая семя F2. В среднем семя F2 получало 50% своих аллелей из линии NS-B50027-4 и 50% из другого растения канолы, но разные индивидуальные растения из популяции имели гораздо больший процент своих аллелей, происходящих из события NS-B50027-4. Wang et al., 40 Crop Sci. 659 (2000); Bernardo et al., 102 Theor. Appl. Genet. 986 (2001). Используемый в данном контексте термин "популяция" относится к статистически репрезентативной выборке. Семя F2 выращивали, и отбор растений проводили на основе визуального наблюдения или измерения признаков. Признак, используемый для отбора, может представлять собой признак высокой продукции ДНА в семенах линии канолы NS-B50027-4. Потомство, происходящее из события NS-B50027-4, демонстрирующее желательный признак, происходящий из NS-B50027-4, отбирали и каждое растение собирали отдельно. Это семя F3 от каждого растения выращивали отдельными рядами и подвергали самоопылению. Затем отобранные ряды или растения из рядов собирали и обмолачивали по отдельности. Отбор снова основывался на визуальном наблюдении фенотипа растений или измерении желательных признаков растений, таких как желательный признак, происходящий из NS-B50027-4. Процесс выращивания и отбора повторяли любое количество раз, пока не было получено инбредное растение канолы, происходящее из NS-B50027-4.

Растение канолы, происходящее из NS-B50027-4, содержит желательные признаки, происходящие из линии канолы NS-B50027-4, некоторые из которых могут не экспрессироваться другим растением канолы, с которым скрещивали линию канолы NS-B50027-4, и некоторые из которых могут экспрессироваться обеими линиями канолы, но теперь находятся на уровне, равном или больше, чем уровень, экспрессируемый в NS-B50027-4.

Растения канолы, происходящие из NS-B50027-4, имеют в среднем 50% своих генов, происходящих из NS-B50027-4, но различные отдельные растения из популяции имеют гораздо больший процент своих аллелей, происходящих из NS-B50027-4. Процесс разведения, скрещивания, самоопыления и отбора повторяют для получения другой популяции растений канолы, происходящих из NS-B50027-4, при этом в среднем 25% своих генов происходит из линии канолы NS-B50027-4, но различные индивидуальные растения из популяции имеют гораздо больший процент своих аллелей, происходящих из NS-B50027-4. Другим вариантом осуществления изобретения является инбредное растение канолы, происходящее из NS-B50027-4, которое получило желательный признак высокого содержания ДНА, происходящий из NS-B50027-4.

Предыдущий пример можно модифицировать множеством способов, например, отбор может происходить или может не происходить в каждом подвергнутом самоопылению поколении, отбор может происходить до или после фактического процесса самоопыления, или индивидуальный отбор может быть осуществлен путем сбора отдельных стручков, растений, рядов или участков в любой момент во время описанного процесса разведения. Кроме того, способы разведения удвоенных гаплоидов могут быть использованы на любой стадии процесса. Популяция растений, полученных в каждом и любом поколении самоопыления, также является вариантом осуществления настоящих вариантов осуществления, и каждая такая популяция будет состоять из растений, содержащих приблизительно 50% своих генов из

линии канолы NS-B50027-4, 25% своих генов из линии канолы NS-B50027-4 во втором цикле скрещивания, самоопыления и отбора, 12,5% своих генов из линии канолы NS-B50027-4 в третьем цикле скрещивания, самоопыления и отбора и т.д.

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения гомозиготного растения канолы, происходящего из NS-B50027-4, путем скрещивания линии канолы NS-B50027-4 с другим растением канолой и применения способов двойных гаплоидов к семенам F1 или растению F1 или к любому поколению линии канолы NS-B50027-4, полученному путем самоопыления этого скрещивания. Выведение чистых линий обычно используют для улучшения самоопыляющихся культур или инбредных линий перекрестноопыляющихся культур. Два родителя, которые обладают благоприятными, взаимодополняющими признаками, скрещивают, получая F1. Популяцию F2 получают самоопылением одной или нескольких популяций F1 или путем скрещивания двух популяций F1 (скрещивание между сибсами). Отбор лучших индивидуумов обычно начинают на популяции F2. Затем, начиная с F3, отбирают лучших индивидуумов в лучших семействах. Для улучшения эффективности отбора по признакам с низким наследованием повторное тестирование семейств или гибридных комбинаций, включающих индивидуумов из этих семейств, можно начинать с поколения F4. На поздней стадии инбридинга (а именно F6 и F7) лучшие линии или смеси фенотипически похожих линий тестируют на возможное применение в качестве новых культиваров.

Кроме того, настоящие варианты осуществления относятся к способам получения растений канолы, происходящих из NS-B50027-4, путем скрещивания линии канолы NS-B50027-4 с растением канолы и выращивания семян потомства, и повторения стадий скрещивания и выращивания с растением канолы, происходящим из NS-B50027-4, от 1 до 2 раз, от 1 до 3 раз, от 1 до 4 раз или от 1 до 5 раз, и самоопыления любое количество раз после первого, второго, третьего, четвертого или пятого скрещивания. Массовый и рекуррентный отбор можно использовать для улучшения популяций либо само-, либо перекрестно-опыляющихся культур. Генетически вариабельная популяция гетерозиготных индивидуумов либо идентифицируется, либо создается перекрестным скрещиванием нескольких различных родителей. Лучшие растения отбирают исходя из индивидуального превосходства, выдающегося потомства или превосходной комбинационной способности. Проводят перекрестное скрещивание отобранных растений для получения новой популяции, с которой продолжают дополнительные циклы отбора. Этот процесс можно использовать для объединения NS-B50027-4 с другими трансгенными линиями LC-PUFA, эффективно увеличивая число копий в гомозиготной линии для увеличения продукции LC-PUFA в семенах. Этот метод выгоден для введения трансгенов в сильные линии, которые не поддаются трансформации, или когда известно, что трансгенные локусы расположены в хромосомах, отличных от хромосом NS-B50027-4, например, трансгенный locus в A06 может быть объединен с локусами A02 и A05 NS-B50027-4. Гомозиготная линия в результате такого скрещивания включает шесть копий трансгенных вставок. Если сайленсинг генов не подавляет экспрессию до неуправляемого эффекта, продукция LC-PUFA может быть существенно увеличена. Действительно гомозиготная экспериментальная линия F4, содержащая шесть трансгенных локусов (Full Single×NS-B50027-4), продуцировала около 25% DHA (мас.% от общего содержания жирных кислот в семенах).

Разведение на основе возвратного скрещивания используют для переноса генов для просто и высоконаследуемого признака в желаемый гомозиготный культивар или линию, которая является рекуррентным родителем. Источник признака, который необходимо перенести, называется родителем-донором. Ожидается, что полученное растение будет иметь характеристики рекуррентного родителя (например, культивара) и желаемый признак, перенесенный из родителя-донора. После первоначального скрещивания отбирают индивидуумов, обладающих фенотипом родителя-донора, и повторно скрещивают (возвратное скрещивание) с рекуррентным родителем. Ожидается, что полученное растение будет иметь характеристики рекуррентного родителя (например, культивара) и желаемый признак, перенесенный из родителя-донора.

Метод поколения одного семени в строгом смысле относится к высеванию расщепляющейся популяции, сбору образцов по одному семени на растение и использованию этого образца для высевания следующего поколения. Когда популяция продвигается от F2 до желательного уровня инбридинга, каждое из растений, из которых получены линии, можно отследить до различных F2-индивидуумов. Число растений в популяции снижается в каждом поколении вследствие неспособности некоторых семян к прорастанию или некоторых растений к продукции по меньшей мере одного семени. В результате не все растения F2, исходно представленные в популяции, будут представлены потомством при завершении процесса улучшения поколения.

В следующем варианте осуществления предлагается конверсия одиночного гена NS-B50027-4. Конверсия гена происходит, если последовательности ДНК вводят с помощью традиционных (без трансформации) способов разведения, таких как возвратное скрещивание. Последовательности ДНК, или встречающиеся в природе или трансгены, можно вводить с использованием этих традиционных способов разведения. Требуемые признаки, переносимые с помощью этого способа, включают в себя, но без ограничения, модификацию фертильности, модификацию профиля жирных кислот, другие улучшения питательных свойств, улучшения промышленного применения, устойчивость к болезням, устойчивость к на-

секомым, устойчивость к гербицидам и улучшения урожайности. Интересующий признак переносят от родителя-донора к рекуррентному родителю в этом случае описанному здесь растению канолы. Моногенные признаки могут получаться в результате переноса или доминантной аллели или рецессивной аллели. Отбор потомства, обладающего интересующим признаком, осуществляют непосредственной селекцией по признаку, связанному с доминантным аллелем. Для селекции потомства по признаку, который переносят посредством рецессивного аллеля, требуется выращивание и самоскрещивание (самоопыление) первого возвратного скрещивания для определения того, какие растения несут рецессивные аллели. Для рецессивных признаков может потребоваться дополнительное тестирование потомства в поколениях из последующего возвратного скрещивания для определения наличия интересующего гена. Наряду с селекцией по интересующему признаку потомство отбирают по фенотипу рекуррентного родителя. Следует понимать, что иногда дополнительные полинуклеотидные последовательности или гены переносятся вместе с интересующим признаком, возникшим из конверсии одиночного гена. Потомство, содержащее по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% генов от рекуррентного родителя, описанного здесь растения канолы, плюс содержащее признак, возникший из конверсии одиночного гена, рассматривают как конверсию одиночного гена NS-B50027-4. Когда признак контролируется двумя генами (например, устойчивость к некоторым болезням), отбор осуществляется для двух генов и т.д. Конкретный аспект варианта осуществления, описанного в настоящем документе, предусматривает использование четырех-генного сегреганта (четырёх-генного локуса, встроенного в хромосому A02) NS-B50027-4 для увеличения продукции LC-PUFA в другом трансгенном растении.

Мутационное разведение является еще одним способом введения новых признаков в сорта канолы. Мутации, которые возникают спонтанно или вызваны искусственно, могут быть полезными источниками изменчивости для селекционера. Целью искусственного мутагенеза является увеличение частоты мутаций для желаемой характеристики. Частота мутаций может быть увеличена различными способами, включая воздействие температуры, длительного хранения семян, условий культивирования тканей, излучения (например, рентгеновского излучения, гамма-излучения, нейтронов, бета-излучения или ультрафиолетового излучения), химических мутагенов (таких как аналоги оснований, подобные 5-бромурацилу), антибиотиков, алкилирующих агентов (таких как сернистые иприты, азотистые иприты, эпоксиды, этиленамины, сульфаты, сульфонаты, сульфоны или лактоны), азиды, гидроксилламина, азотистой кислоты или акридинов. Как только желаемый признак наблюдается посредством мутагенеза, этот признак затем может быть включен в существующую зародышевую плазму с помощью традиционных методов разведения. См., например, Fehr, *Principles Cultivar Devel.* (Macmillan Publ Co., 1993). Например, мутация может быть использована для увеличения продукции DPA в NS-B50027-4 путем нарушения экспрессии трансгена Δ4-десатуразы.

Следует понимать, что линия канолы согласно настоящим вариантам осуществления, посредством рутинной манипуляции с цитоплазматическими генами, ядерными генами или другими факторами, может быть получена в форме мужской стерильности, как описано в ссылках, обсуждаемых ранее. Такие варианты осуществления также находятся в пределах объема настоящей формулы изобретения. Настоящие варианты осуществления, таким образом, обеспечивают гибридные семена F1 и растения, полученные с использованием линии канолы NS-B50027-4. Соответственно в другом варианте осуществления предлагается способ получения ДНА-содержащего семени канолы путем интрогрессии признака ДНА NS-B50027-4 в элитную линию Brassica, которая является линией с мужской стерильностью; интрогрессию признака ДНА NS-B50027-4 во вторую элитную линию Brassica, которая является фертильной; скрещивание двух линий с получением гибридного потомства; культивирование семени гибридного потомства; сбор зерна, произведенного культивированным гибридным потомством. Дополнительная стадия экстракции масла из потомства гибридного семени обеспечивает ДНА-содержащее масло канолы.

Существует много лабораторных методов, доступных для анализа, сравнения и характеристики генотипа растений; к ним относятся изоферментный электрофорез, полиморфизмы длины рестрикционных фрагментов (RFLP), случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (RAPD), произвольно праймированная полимеразная цепная реакция (AP-PCR), ДНК-амплификационный фингерпринтинг (DAF), амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью (SCAR), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP), простые повторяющиеся последовательности (SSR) (также называемые микросателлитами) и однонуклеотидный полиморфизм (SNP). В приведенном в настоящем документе примере 3 представлены анализы KASP для анализа растения NS-B50027-4 и потомства, полученного из него. Праймеры, выбранные из тех, которые представлены в SEQ ID NO: 1-90, также могут быть адаптированы к другим методикам, основанным на последовательностях.

Изоферментный электрофорез и RFLP широко применяются для определения генетического состава. См. Shoemaker & Olsen, in *Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes*, at 6.131 (O'Brien, ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1993) (карта молекулярно-генетической связи состояла из 25 групп сцепления с ~365 RFLP, 11 RAPD, 3 классическими маркерами и 4 локусами изофермента); см. также Shoemaker, in *DNA-Based Markers in Plants*, 299 (Phillips & Vasil, Eds., Kluwer Acad. Press, Dordrecht, Netherlands, 1994).

В настоящее время технология SSR является эффективной и используемой на практике маркерной

технологией; больше маркерных локусов можно применять в повседневной практике и больше аллелей на маркерный локус может быть обнаружено с использованием SSR по сравнению с RFLP. See, e.g., Diwan & Cregan, 95 Theor. Appl. Genet. 22 (1997). SNP могут быть также использованы для идентификации уникальной генетической композиции согласно изобретению и видов потомства, сохраняющих эту уникальную генетическую композицию. Различные методы, использующие молекулярные маркеры, можно применять в комбинации для улучшения общего разрешения. Молекулярные маркеры, включающие маркеры, идентифицированные посредством использования таких способов, как электрофорез изоферментов, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), случайным образом амплифицируемые полиморфные ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (AP-PCR), фингерпринтинг амплифицированной ДНК (DAF), амплифицированные области с охарактеризованной последовательностью (SCAR), полиморфизмы длин амплифицированных фрагментов (AFLP), простые повторяющиеся последовательности (SSR) и полиморфизмы одиночных нуклеотидов (SNP), можно использовать в способах разведения растений. Одно из применений молекулярных маркеров состоит в картировании локусов количественных признаков (QTL). Картирование QTL представляет собой применение маркеров, которые, как известно, тесно связаны с аллелями, которые обладают измеримыми эффектами на количественный признак. Селекция в процедуре разведения основана на накоплении маркеров, связанных с аллелями, обладающими положительным эффектом, или элиминации маркеров, связанных с аллелями, обладающими отрицательным эффектом, из генома растения.

Молекулярные маркеры можно также использовать в ходе процедуры разведения для отбора качественных признаков. Например, маркеры, тесно связанные с аллелями, или маркеры, содержащие последовательности в пределах фактических интересующих аллелей, можно использовать для отбора растений, которые содержат интересующие аллели, в ходе программы разведения с помощью возвратного скрещивания. Маркеры можно также использовать для отбора генома рекуррентного родителя и против маркеров родителя-донора. С использованием этого способа можно минимизировать количество генома родителя-донора, которое остается в отбираемых растениях. Его также можно использовать для уменьшения количества возвратных скрещиваний с рекуррентным родителем, необходимых для программы возвратного скрещивания. Использование молекулярных маркеров в процедуре отбора часто называют селекцией, усиленной генетическими маркерами, или маркера-вспомогательной селекцией. Молекулярные маркеры можно также использовать для идентификации и исключения определенных источников зародышевой плазмы родительских сортов или предков растения путем обеспечения средств отслеживания генетических профилей посредством скрещивания.

Таким образом, из уровня техники очевидно, что эти способы получения растений являются "общепринятыми" в том смысле, что их применение вошло в повседневную практику и они имеют высокий показатель успеха. Полезность линии канолы NS-B50027-4 также распространяется на скрещивания с другими видами. Обычно подходящие виды относятся к семейству Brassicaceae. Соответственно любые и все способы, использующие в разведении элитное событие канолы NS-B50027-4, охвачены настоящими вариантами осуществления, включая самоопыление, чистое разведение, возвратные скрещивания, получение гибрида и скрещивания с популяциями. Все растения и популяции растений, полученные с использованием элитного события линии канолы NS-B50027-4 в качестве родителя, входят в объем этих вариантов осуществления, включая разработанные из сортов, происходящих из линии канолы NS-B50027-4. Специалисты в данной области могут использовать уникальные профили молекулярных маркеров или селекционные записи для идентификации линий потомства или популяций потомства, происходящих из линии канолы NS-B50027-4. Конкретный аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает неожиданное преимущество в продукции LC-PUFA в трансгенных растениях, в которые был введен локус A02, сегрегированный из NS-B50027-4, с помощью традиционных методов разведения.

Примеры

Пример 1. Характеристика и отбор линии NS-B50027-4 в экспериментальных полевых испытаниях.

Трудной задачей в разведении растений является идентификация индивидуальных растений, превосходящих генетически, так как для большинства признаков истинная ценность генотипа может быть замаскирована другими искажающими признаками растения или факторами окружающей среды. Одним способом идентификации превосходящего растения является визуальная оценка его характеристик по сравнению с другими экспериментальными растениями и одним или несколькими широко выращиваемыми стандартными культиварами. Если одна визуальная оценка не позволяет сделать окончательный вывод, повторные визуальные оценки обеспечат лучшую оценку генетической ценности.

Растения, первоначально идентифицированные как B0050-027-18, отбирали на основе метода поколений одного семени путем сбора образца одного семени на растение и использования образца одного семени для посадки следующего поколения. Как правило, количество растений в популяции уменьшается с каждым поколением из-за того, что некоторые семена не прорастают или некоторые растения не производят хотя бы одного семени. В результате не все первоначально отобранные растения в популяции представлены потомством, когда улучшение потомства завершено. Более того, оригинальные трансгенные события усугубляют сложность наследования, так что прогнозы часто являются неточными в отношении генотипа или фенотипа потомства. Таким образом, экспериментальные растения подвергали са-

моопылению и отбирали по типу для последующих поколений до тех пор, пока конкретная линия не становилась гомозиготной, проявляла отобранные признаки с превосходными агрономическими свойствами и производила однородную популяцию чистотылинейного потомства. В частности, экспериментальные линии отбирали, следуя программе разведения с повторным отбором в Nuseed Innovation Centre (NIC), Horsham (Victoria, Australia). Отбор и улучшение линий-кандидатов основывалось на следующем:

- (a) число копий вставки Т-ДНК;
- (b) картина сегрегации экспрессии ДНК;
- (c) гомозиготность (на основе фенотипа и генотипа жирных кислот);
- (d) продукция LC- ω 3-ДНА; и
- (e) подходящие агрономические признаки для выращивания сельскохозяйственных культур на основе тестирования потомства на участках зимой и летом.

В Австралии канолу выращивают в южной зоне засушливых земель и в основном в условиях зимних осадков. Производство в Австралии в основном осуществляют из культиваров канолы весеннего типа, которые имеют низкие требования к яровизации. В целом австралийские культивары обычно сохраняют небольшую задержку начала цветения и имеют относительно высокую мощность растения или выработку биомассы в зимние месяцы. Посев культуры канолы в Австралии обычно осуществляют с апреля по май после первого крупного дождевого явления и собирают с октября по декабрь. На урожай в первую очередь влияет доступная вода в течение вегетационного периода и эффективность водопользования культивара. Ген устойчивости к основному патотипу возбудителя *Leptosphaeria maculans* болезни черной ножки, может дифференцировать культивары с точки зрения выживаемости проростков и загнивания стеблей, но считается, что австралийские культивары в целом имеют высокую устойчивость при выращивании в соответствии с рекомендованными агрономическими методами. После развития семян следует период роста от пяти до семи месяцев и происходит в конце весны или в начале лета. Помимо доступности воды, выход может значительно зависеть от больших перепадов температуры (от <0 до $>35^{\circ}\text{C}$), которые могут вызвать недоразвитость семян и семянков.

Как отмечено в настоящем документе, трансформацию зародышевой плазмы канолы осуществляли с помощью конструкции из восьми генов (семь ферментов для пути биосинтеза ДНА и маркер), что привело к специфичному для семени накоплению жирных кислот LC- ω 3, в частности ДНА. В более широком смысле, фенотип отличался качеством продукта (PQ) (продуцированными жирными кислотами омега-3), хотя растения несли маркерный ген (MG). Трансформированный материал повторно отбирали по гомозиготности локусов, экспрессии в семени ДНА, а также по агрономическим признакам и потенциальному выходу, пригодному для коммерческого производства. Тестируемые линии происходили из трансформированных проростков (сорт AV Jade). Экспериментальные семена проращивали, позволяя растениям самоопыляться в изоляции (т.е. палатки, защищающие от насекомых).

Три сибса, полученные из поколения T2 в результате трансгенного события, сравнивали с восемью другими коммерческими культиварами канолы (линиями) на ряд важных агрономических и семенных признаков по восьми экспериментальным полевым местоположениям (площадкам) в Австралии (последующие полевые испытания в Австралии и Канаде описаны далее ниже). Восемь площадок в Австралии представляли широкий диапазон потенциального выхода в различных условиях внешней среды, о чем свидетельствует диапазон среднего выхода на площадках (т.е. AV Garnet: 0,7-2,4 т/га). Трансгенные сибсы были представлены тестируемыми линиями: NS-B50027-4 (T3), B0050-027-18-36-13 (T4) и B0050-027-18-105-13 (T4). Кроме того, NS-B50027-4 выращивали на экспериментальных участках в Канаде и агрономические и семенные признаки сравнивали с нетрансгенными линиями канолы. Дополнительные поколения T3 и T5 NS-B50027-4 также сравнивали с нетрансгенными линиями и двумя трансгенными сегрегантами, полученными путем ауткроссинга из NS-B50027-4, каждый из которых содержал разные трансгенные локусы (т.е. сегрегированные A05 и A02) (см. пример 2). Изменчивость агрономических признаков тестируемых линий была сопоставимой с таковой коммерческих культиваров, оцененных по всем тестируемым средам. Этот вывод подкреплялся обнаружением того, что выход зерна тестируемой линии с самой высокой урожайностью был статистически сопоставимым, на основе анализа по площадкам (MET-REML), с коммерческими культиварами с самой высокой урожайностью. Кроме того, для каждой площадки тестируемая линия с самой высокой урожайностью была значительно более высокоурожайной, чем по меньшей мере один культивар, за исключением одной площадки, где не было значительных различий. Тестируемые линии производили семена с немного более низким процентным содержанием масла и с изменяющейся композицией жирных кислот; но это не повлияло на выход или агрономические характеристики. Экспрессия жирной кислоты ДНА LC ω 3 была высокостабильной по всем тестируемым средам.

Контрольные культивары (коммерческие линии разведения), используемые для сравнения, обеспечили агрономически разнообразный (например, растительный покров, фенология) спектр хорошо адаптированных (т.е. с высоким, но изменяющимся потенциалом выхода и содержанием масла) культиваров, широко выращиваемых в зоне посева. Все эти культивары являются перекрестноопыляющимися и описаны и тщательно оценены, например, в Австралийской национальной программе тестирования сортов и

в региональных ежегодных отчетах об урожаях (Australian National Variety Testing Program and Regional annual crop reports). См. веб-сайт "nvtonline". Кроме того, изменчивость устойчивости растений к болезням хорошо описана для черной ножки в Австралии. Van De Wouw et al., 67 Crop & Pasture Sci. 273 (2015). В Австралии болезнь черной ножки может привести к потере урожая до 90%. Marcroft & Bluett, Agric. Notes, AG1352, Victoria, Dept. Primary Indus. (2008). Генетическая изменчивость среди коммерческих культиваров в отношении композиции жирных кислот определенного семени и содержания масла в семени фиксировалась в течение времени. См. Seberry et al., Quality of Australian Canola 2011 (Australian Oilseeds Fed., 2012). Растения из культивара AV Jade трансформировали с получением трансгенного T0, и, следовательно, AV Jade можно считать нетрансформированной изолинией трансгенного события, описанного в настоящем документе.

Фенотипическая изменчивость для тестируемых линий характеризовалась всхожестью растений, мощностью растений, временем цветения, продолжительностью цветения, высотой растений, растрескиванием семян, устойчивостью к полеганию, тяжестью поражения черной ножкой, числом растений на момент сбора, выходом зерна, влажностью зерна, процентным содержанием масла в семенах и содержанием жирных кислот, в частности полиненасыщенной жирной кислоты LC-ω3 (LC-PUFA), особенно в отношении выхода EPA, DPA и DHA. Для всех измеренных признаков проводили анализ ограниченного правдоподобия с использованием ASREML в статистической программе GenStat. Gilmour et al., ASREML user guide, release 3.0, Biometric Bulletin (3) (VSV Int'l, Waterhouse Stm Hemel Hempstead, UK, 2009). Статистический метод линейной смешанной модели использовали для учета пространственного изменения полей, как подробно описано и использовано для полевых селекционных и генетических исследований растений. Cullis & Gleeson, 47 Biometrics 1449 (1991); Smith et al., 57 Biometrics 1138 (2001); Cullis & Gleeson, 47 Biometrics 1449 (1991); Smith et al., 57 Biometrics 1138 (2001); Welham et al., Analysis of linear mixed models by ASReml-R with Applications in Plant Breeding: Course Notes (VSV Int'l, Waterhouse Stm Hemel Hempstead, UK, 2013). Анализ Meta-REML на участках затем проводили в отношении выхода зерна (т/га) для определения наилучшего линейного несмещенного прогноза (BLUP) для тестируемых линий.

Более частые и детальные измерения проводили во всех окружающих средах. Оценку всхожести и укоренения растений осуществляли на двух произвольно выбранных квадрантах площадью один квадратный метр на каждом участке через четырнадцать дней после посева. Количество растений, проросших на квадратный метр, анализировали как переменную признака. Оценку в баллах всхожести растений, основанную на визуальной оценке средней плотности растений на участке, также записывали для каждого участка на всех площадках и анализировали как переменную признака (1: низкая всхожесть=0-5 растений/м²; 5: средняя всхожесть=25-30 растений/м²; 9: высокая всхожесть=45-50 растений/м²). Всхожесть растений, основанная на количестве на квадратный метр, и оценка в баллах всхожести растений значительно различались ($P<0,05$) между линиями для всех восьми площадок. Статистическая изменчивость всхожести растений трансгенных линий была значительной ($P<0,05$) в пределах диапазона культиваров во всех экспериментах. Мощность растений была основана на биомассе, которую оценивали в баллах по шкале от 1 (низкая: <10% листовой площади покрытия участка земли) до 9 (высокая: >90% листовой площади покрытия участка земли), и анализировали. Мощность растений значительно варьировалась ($P<0,05$) между линиями для шести из семи площадок. Средний балл мощности растений по площадкам составил 6 (60-70% листового покрытия участка земли) на всех восьми площадках; и изменчивость была относительно непротиворечивой, что указывает на низкие эффекты окружающей среды для этого признака. Статистически изменчивость мощности растений для тестируемых линий была значительной в пределах диапазона культиваров по всем площадкам.

Время цветения записывали как число дней от посева до того момента, когда 50% растений на экспериментальном участке имели хотя бы один открытый цветок. Это записывали для каждого участка для всех испытаний и анализировали как переменную признака. Цветение значительно изменялось ($P<0,05$) между линиями для всех площадок. Среднее время цветения на площадке изменялось от 99 до 110 дней и отражало различия в окружающей среде на экспериментальных площадках для этого признака. Статистически изменчивость времени цветения для трансгенных линий была значительной в пределах диапазона культиваров во всех экспериментах.

Продолжительность цветения представляла собой расчетную разницу между временем цветения и временем окончания цветения (представленную в виде количества дней). Расчет производили для каждого участка во всех испытаниях и анализировали как переменную признака:

$$\text{Продолжительность цветения} = \text{День окончания цветения} - \text{Время цветения (50\%)}$$

Среднее время цветения на площадках изменялось от 24 до 30 дней, что короче, чем среднестатистический показатель, и отражало условия, которые преобладали из-за налива семян. Статистически изменчивость продолжительности цветения трансгенных линий была значительной в пределах диапазона культиваров для всех экспериментов.

Количество растений на момент сбора, основанное на количестве растений на квадратный метр, значительно различалось между линиями для всех восьми площадок. Изменчивость количества растений

на момент сбора для трансгенных линий была значительной ($P < 0,05$) в пределах диапазона культиваров по всем насаждениям и местоположениям. Количество растений на момент появления всходов значительно коррелировало с количеством растений, подсчитанным при сборе. Некоторые из рассчитанных процентов выживаемости превышали 100%, что указывало на медленное появление всходов у двух культиваров (ATR Wahoo и AV Jade): не все проростки появились на момент записи количества появившихся всходов растений.

Высота растения на момент физиологической зрелости измерялась от основания до выросшей верхушки в центре участка. Центр участка использовали для того, чтобы избежать искажающих эффектов, вероятно связанных с областью пространства внутри участка (эффекты краев). Этот признак записывали для каждого участка во всех испытаниях и анализировали как переменную признака. Высота растения на момент зрелости (см) значительно изменялась ($P < 0,05$) между линиями для всех площадок. Средняя высота растения на площадках изменялась от 63 до 105 см, что указывало на различия в окружающей среде на экспериментальных площадках для этого признака.

Изменчивость высоты на момент зрелости для трансгенных линий была значительной ($P < 0,05$) в пределах диапазона культиваров во всех экспериментах.

Растрескивание семян (иногда называемое как растрескивание бобов) при созревании анализировали путем подсчета количества растрескавшихся семян на 1/8 квадратного метра, которое записывали в течение двухнедельного периода. Это осуществляли путем помещения двух лотков между посеянными рядами и под навесом для каждого участка во всех местоположениях и анализировали как переменную признака. Показатель в баллах растрескивания семян (по шкале от 1 [ноль] до 9 [высокий: +40]) также записывали для одной площадки исходя из количества семян, наблюдаемых на земле непосредственно перед сбором, и анализировали как переменную признака. Растрескивание семян, основанное на количестве семян на земле при сборе, значительно изменялось ($P < 0,05$) между линиями для четырех из восьми площадок. Среднее количество растрескавшихся семян на площадках изменялось от 3 до 15 (на 1/8-ю квадратного метра) и указывало на низкие уровни растрескивания на всех площадках. Показатель в баллах растрескивания семян на одной из площадок также значительно изменялся между линиями и тесно согласовывался со средним количеством растрескавшихся семян на площадках. Это указывает на то, что растрескивание, записанное в виде балла, являлось хорошим предиктором растрескивания семян. Статистически изменчивость растрескивания семян на основе количества семян и балла для трансгенных линий была значительной в пределах диапазона культиваров во всех экспериментах.

Устойчивость к полеганию записывали в виде балла от 1 (устойчивое к полеганию) до 9 (подверженное полеганию), оцененного по углу наклона растения от основания растения на момент созревания. Статистически значимая изменчивость полегания растений отсутствовала. Отсутствие изменчивости для этого признака, по-видимому, связано с уровнем осадков ниже среднего на поздней стадии налива стручка.

Тяжесть симптомов черной ножки, характерных для *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa*, записывали в баллах от 1 (низкая: <5%) до 9 (высокая: >40%) для одного повтора на пяти площадках. Не все участки были оценены из-за отсутствия видимого отклонения. Симптомы, связанных с гниением и поломкой ствола, не наблюдалось. Симптомы болезни черной ножки наблюдались на очень низких уровнях на всех восьми площадках. Одна площадка была засеяна с использованием голых семян (семян, не обработанных фунгицидом). Не было никаких относительных различий в прорастании растений среди протестированных линий между этой площадкой и другими площадками, обработанными фунгицидом для семян. Листовые симптомы не всегда предсказывают степень загнивания стеблей, вызванного *L. maculans* (основная причина потери урожая и основа для оценки устойчивости в Австралии, см. Sosnowski et al., 33 Australian Plant Pathol. 401 (2004)). В нескольких исследованиях была проведена оценка устойчивости к черной ножке на основе патогенной инфекции семядолей, листьев, стебля (загнивание) и выживаемости растений в полевых условиях. Учитывая отсутствие загнивания и повреждения ствола, линии канолы можно считать устойчивыми к воздействию данного заболевания для целей, описанных в настоящем документе.

Количество растений на момент сбора оценивали путем подсчета растений на двух квадрантах площадью один квадратный метр на каждом участке на всех восьми площадках. Среднее значение обоих квадрантов затем использовали для оценки количества растений на квадратный метр и анализировали в качестве переменной признака. Процент выживаемости растений (%) рассчитывали путем представления средних значений количества растений на площадках в виде % от средних значений взошедших растений на площадках:

$$\% \text{Выживаемость растений} = (\text{Количество растений на момент сбора} \times 100) / \text{Количество взошедших растений}$$

Зерно собирали с использованием уборочных машин для опытных и селекционных участков, когда экспериментальные семена были физиологически зрелыми. Направление сбора поддерживалось постоянным (т.е. от начала до конца для каждого ряда) для каждого испытания, чтобы избежать ошибок направления сбора. Вес сухого зерна для каждого участка определяли и переводили в единицы т/га на ос-

нове площади участка и анализировали как переменную признака.

Влажность зерна при сборе и в лабораторном образце фиксировали и анализировали как переменную признака. Ручной измеритель влажности использовали для анализа объемных образцов непосредственно в точке сбора на экспериментальном поле. Процент влажности также определяли с использованием метода сушильной печи, основанного на методе 4-1.5 Australian Oilseed Federation (AOF). Этот метод включал сушку в печи 5 г образца в открытых банках при 130°C в течение 1 ч. Образцы охлаждали в эксикаторе в течение 40 мин и взвешивали, и процент влажности определяли как процент потери массы. Влажность зерна при сборе (в процентах) значительно изменялась между обработками линий для всех восьми площадок. Средняя влажность зерна на площадках при сборе изменялась от 9 до 12%, что указывало на то, что семена собирали на одинаковой стадии развития зерна. Статистически изменчивость влажности зерна при сборе для трансгенных линий была значительной в пределах диапазона культиваров во всех экспериментах. Процент влажности зерна при сборе также коррелировал со временем цветения, так что семена линий позднего цветения (т.е. ATR Wahoo и Monola515TT) имели значительно более высокий процент влажности зерна на момент сбора на всех площадках. Лабораторная влажность семян значительно изменялась между линиями для всех площадок. Однако различия между линиями и по площадкам были незначительными и составляли в среднем ~7%. Это указывает на отсутствие искажающих эффектов хранения семян. Изменчивость влажности семян в лаборатории для трансгенной линии была значительной ($P < 0,05$) в пределах диапазона, представленного нетрансгенными линиями.

Содержание масла в семенах (%) анализировали с использованием Spinlock NMR спектроскопии на семенах, доведенных до 6% влажности. Вкратце образцы 5-10 г семян взвешивали в пробирке для NMR и анализировали с помощью спектрометра NMR. Содержание масла в семенах определяли с помощью калибровки программного обеспечения, созданного первоначально, с использованием двадцати эталонных образцов с известным процентным содержанием масла, определенным гравиметрическим методом экстракции масла. Содержание масла в семенах значительно изменялось ($P < 0,05$) между линиями на всех восьми экспериментальных площадках. Средний процент содержания масла в семенах на площадках изменялся от 37,0 до 41,5%, что, как правило, было ниже типичного среднего значения для посевных сред и возможно являлось результатом количества дождевых осадков ниже среднего уровня и более высоких, чем в среднем, температур, наблюдаемых в период налива семян. Относительные различия по линиям согласовывались по площадкам. Изменчивость содержания масла в семенах для трансгенных линий была несколько ниже по сравнению с нетрансгенными линиями по всем площадкам: в среднем примерно на 2%, что может служить объектом для генетического улучшения. Более низкое содержание масла может быть генетически не связано с трансгенным событием, но может быть результатом трансформации культивара с более низким содержанием масла, т.е. AV Jade.

Краткая характеристика агрономических признаков события NS-B50027-4 по сравнению с нетрансгенными культиварами, собранными во время экспериментальных культивирований, показана в табл. 2 (анализ REML; F $pr < 0,001$ Sig для всех признаков).

Таблица 2

Выход зерна (т/га) и данные агрономических измерений для нетрансгенных культиваров канолы и экспериментальных трансгенных тестовых линий по восьми окружающим средам в 2015 г.

Признак:	Всхожесть	Кол-во растений при севе	Всхожесть	Мощность растений	Начало цветения	Окончание цветения	Продолжит. цветения	Высота раст. в состоянии зрелости	Преснувшие семена	Выход зерна	Влажность зерна при севе
Название линии	Раст. на м ²	Раст. на м ²	Балл (1-9)	Балл (1-9)	День	День	Дни	см	Кол.	т/га	%
ATR Bonito	18.2	16.0	7.3	6.8	103.8	131.2	27.5	90.0	13.0	1.35	10.6
ATR Gem	17.9	16.6	7.1	6.7	105.3	133.6	28.2	91.0	10.9	1.21	13.0
ATR Stingray	17.6	17.3	7.1	5.9	100.9	129.7	28.8	82.7	14.4	1.34	8.2
ATR Wahoo	11.2	11.8	5.9	6.1	108.2	136.0	27.3	92.3	10.7	1.12	18.7
AV Garnet	18.6	16.3	7.4	7.2	104.4	132.8	28.6	102.1	15.0	1.31	10.2
AV Jade	7.8	12.5	5.0	4.8	106.7	134.8	28.3	89.9	9.8	0.96	9.9
AV Zircon	19.0	15.7	7.3	7.0	104.4	132.0	27.6	98.7	22.5	1.31	9.5
Monola 515TT	20.3	18.5	7.5	5.8	108.6	136.1	27.3	87.9	12.3	1.24	12.4
NS-B50027-4	18.1	15.7	7.1	5.9	107.8	135.0	27.2	88.2	10.5	1.17	11.0
B0050-027-18-36-13	22.5	20.3	7.2	5.9	106.6	134.4	27.9	76.4	10.3	0.95	10.8
B-050-27-18-105-13	22.6	19.8	7.6	5.4	108.5	135.8	27.3	70.6	8.9	0.92	11.1
Мин значение для сорта	7.8	11.8	5.0	4.8	100.9	129.7	27.3	82.7	9.8	0.96	8.2
NS-B50027-4	18.1	15.7	7.1	5.9	107.8	135.0	27.2	88.2	10.5	1.17	11.0
Макс. значение для сорта	20.3	18.5	7.5	7.2	108.6	136.1	28.8	102.1	22.5	1.35	18.7
Среднее	17.6	16.4	7.0	6.2	104.7	133.2	28.5	90.0	12.0	1.14	11.0
VAR	0.67	0.98	0.02	0.01	0.04	0.07	0.13	1.35	2.74	0.00	0.15
LSD	1.62	1.95	0.28	0.21	0.41	0.54	0.71	2.30	3.30	0.11	0.78
CV%	4.6	6.0	2.0	1.7	0.2	0.2	1.3	1.3	13.8	5.0	3.6

Жирные кислоты определяли с использованием экстракции растворителем с последующим одновременным омылением и метилированием и анализа методом GC-FID. Вкратце это включало измельчение образцов семян и экстракцию масла в растворитель из подвыборки измельченных семян. Растворитель выпаривали в атмосфере азота, и содержащую масло подвыборку разбавляли в новом растворителе. Аликвоту подвергали реакции с Meth Prep II (реагент омыления/метилования). Образцы нагревали при 40°C для ускорения реакции, а затем инжестировали в GC-FID с использованием колонки BPX-70 для определения жирных кислот. Жирные кислоты рассчитывали в виде процентного состава масла, где площадь каждого пика жирных кислот определяли как процент от суммы всех пиков жирных кислот на хроматограмме. Эти оценки анализировали индивидуально в качестве переменной признака. Процентное содержание определенной жирной кислоты определяли для: пальмитиновой кислоты; стеариновой кислоты; олеиновой и цис-вакценовой кислоты; линолевой кислоты; альфа-линоленовой кислоты (ALA); арахидиновой кислоты (также известной как эйкозановая кислота) и стеаридиновой кислоты (SDA); полиновой, гондоевой и гадолеиновой кислот; эруковой кислоты и эйкозатетраеновой кислоты (ETA); эйкозапентаеновой кислоты (EPA); докозапентаеновой кислоты (DPA); и докозагексаеновой кислоты (DHA).

В табл. 3 показан анализ по площадкам содержания жирных кислот в семенах (все значения представлены в процентах; анализ REML; F pr<0,001 Sig для всех признаков).

Таблица 3

Анализ семян по площадкам

	Влажность лаб. семян	Масло семян	Пальмитиновая кислота	Стеариновая кислота	Олеиновая & цис-вакценовая	Линолевая к-та	ALA, арахидоновая, & SDA	Поллиновая, гондоевая, & галоленовая	EPA	DPA	DHA	Сумма EPA, DPA и DHA
ATR Bonito	6.7	41.9	3.9	1.7	60.5	20.9	10.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0
ATR GEM	6.8	41.5	3.7	1.7	66.3	14.9	10.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.1
ATR Stingray	6.6	40.8	4.3	1.8	60.6	20.5	9.7	1.0	0.0	0.0	0.1	0.1
ATR Wahoo	6.8	41.7	3.7	1.6	60.7	20.4	10.4	1.2	0.0	0.0	0.1	0.1
AV Garnet	7.1	40.4	3.6	1.7	69.6	11.8	9.7	1.5	0.0	0.0	0.1	0.1
AV Jade	6.7	41.0	4.0	2.2	61.0	18.7	11.2	1.0	0.0	0.0	0.1	0.2
AV Zircon	6.8	41.0	3.8	1.6	69.3	11.8	10.4	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Monola 515TT	6.9	40.9	3.6	2.1	73.3	12.2	5.2	1.4	0.0	0.0	0.1	0.2
NS-B50027-4	6.9	37.0	4.1	2.1	45.9	8.2	20.7	3.4	0.4	1.0	8.6	9.9
B0050-027-18-36-13	7.1	35.5	4.2	2.4	41.8	7.9	22.2	3.8	0.6	1.2	10.5	12.2
B-050-27-18-105-13	7.2	35.3	4.1	2.4	42.0	7.7	22.1	3.9	0.5	1.2	10.3	12.0
Мин значение по сортам	6.6	40.4	3.6	1.6	60.5	11.8	5.2	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NS-B50027-4	6.9	37.0	4.1	2.1	45.9	8.2	20.7	3.4	0.4	1.0	8.6	9.9
Макс значение по сортам	7.1	41.9	4.3	2.2	73.3	20.9	11.2	1.5	0.0	0.0	0.1	0.2
Среднее	6.8	39.6	3.9	2	55	14.8	15	2.3	0.1	0.6	3.1	3.8
VAR	0.002	0.05	0.0005	0.0003	0.1912	0.0385	0.0475	0.0032	0.0001	0.0005	0.0248	0.0345
LSD	0.09	0.44	0.04	0.03	0.87	0.39	0.43	0.11	0.02	0.05	0.31	0.37
CV%	0.7	0.6	0.5	0.9	0.8	1.3	1.5	2.5	6.3	4.1	5.1	4.9

Процентное содержание жирной кислоты в семени, присутствующей в виде стеариновой кислоты, по данным анализа методом GC-FID значительно изменялось между линиями по всем восьми площадкам. Среднее процентное содержание стеариновой кислоты по площадкам показало очень незначительную изменчивость и варьировалось от 1,6 до 2,4%. Статистически изменчивость процентного содержания стеариновой кислоты для трансгенной линии была значительной в пределах диапазона, представленного нетрансгенными линиями, по всем площадкам.

Процентное содержание жирной кислоты в семени, такой как олеиновая и цис-вакценовая кислота, по данным анализа методом GC-FID значительно изменялось между линиями по всем восьми площадкам. Среднее процентное содержание олеиновой и цис-вакценовой кислот по площадкам варьировалось от 60 до 73%. Изменчивость процентного содержания олеиновой и цис-вакценовой кислот для трансгенной линии была значительно ($P < 0,05$) ниже, чем диапазон, представленный нетрансгенными линиями по всем площадкам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна. Кроме того, специализированный культивар с высоким содержанием олеинового масла, Monola515 TT, продуцировал значительно больше олеиновой и цис-вакценовой кислот по сравнению с другими культиварами за счет однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене Fad.

Процентное содержание жирной кислоты в семени, присутствующей в виде линолевой кислоты, по данным анализа методом GC-FID значительно изменялось между всеми линиями по всем восьми площадкам. Среднее процентное содержание линолевой кислоты на площадку изменялось от 12 до 21%. Изменчивость процентного содержания линолевой кислоты для трансгенных линий сибсов, происходящих из одного события T2 (растение NS-B50027-4), была значительно ($P < 0,05$) ниже, чем диапазон, представленный культиварами по всем площадкам, и сибсами, происходящими из сибсов других событий. Значительное различие в % содержании линолевой кислоты, по-видимому, связано с экспрессией трансгенов. Снижение % содержания линолевой кислоты, по-видимому, связано с трансгенной вставкой, но не влияет на агрономию или производство зерна в промышленном масштабе.

Процентное содержание жирной кислоты, присутствующей в виде ALA, арахидовой кислоты и SDA, значительно изменялось между всеми линиями по всем восьми площадкам. Среднее процентное содержание ALA, арахидовой кислоты и SDA по площадкам изменялось от 5 до 11%. Изменчивость % содержания ALA, арахидовой кислоты и SDA для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными культиварами по всем экспериментам. Значительные различия, наблюдаемые для этого признака на некоторых площадках, были связаны с экспрессией трансгенов. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна. Специализированный культивар с высоким содержанием олеинового масла (Monola515 TT) продуцировал значительно ($P < 0,05$) более низкий % ALA по сравнению с другими культиварами за счет SNP в генах Fad.

Процентное содержание жирной кислоты, присутствующей в виде полииновой, гондоевой и гадолеиновой кислот, значительно изменялось между линиями по всем восьми площадкам. Среднее процентное содержание полииновой, гондоевой и гадолеиновой кислот изменялось от 1,0 до 1,5%. Изменчивость процентного содержания полииновой, гондоевой и гадолеиновой кислот для трансгенных линий была значительно ($P<0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными культиварами по всем экспериментам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна.

Процентное содержание жирной кислоты, присутствующей в виде эруковой кислоты и ЕТА, было зафиксировано на пяти площадках и в целом приближалось к 0%. Результаты, связанные с трансгенной вставкой, коммерчески не влияют на агрономию или производство зерна.

Содержание в семенах LC-ω3 полиненасыщенной жирной кислоты (LC-PUFA), в частности EPA, DPA и DHA, рассчитывали в виде процента для каждого образца, взятого с участка, и анализировали как переменную признака, где

$$LC-PUFA = EPA\% + DPA\% + DHA\%$$

Прогнозируемое содержание DHA в единицах кг/га рассчитывали для каждого участка и анализировали как переменную признака:

$$DHA, \text{ кг/га} = (\% \text{ Масла} \times 0,01) \times (\% DHA \times 0,01) \times \text{Выход зерна (т/га)} \times 1000$$

Прогнозируемое содержание LC-PUFA в единицах кг/га рассчитывали для каждого участка и анализировали как переменную признака:

$$DHA, \text{ кг/га} = (\% \text{ Масла} \times 0,01) \times (LC-PUFA\% \times 0,01) \times \text{Выход зерна (т/га)} \times 1000$$

Процентное содержание жирной кислоты в виде EPA значительно изменялось ($P<0,05$) между линиями по всем восьми площадкам. Изменчивость процентного содержания для трансгенной линии была значительно ($P<0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными культиварами. Этот результат, связанный с трансгенной вставкой, не влияет на агрономию или производство семян, но действительно может сделать семена более ценными.

Процентное содержание жирной кислоты, такой как DPA, значительно изменялось между линиями по всем площадкам. Изменчивость процентного содержания для трансгенных линий была значительно ($P<0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными культиварами по всем участкам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на агрономию или производство зерна.

Процентное содержание жирной кислоты, такой как DHA, значительно изменялось ($P<0,05$) между линиями по всем восьми площадкам. Изменчивость процентного содержания для трансгенных линий была значительно ($P<0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными культиварами по всем площадкам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна. Изменчивость между трансгенными линиями сибсов использовали в качестве основы для отбора.

Процентное содержание DHA по площадкам и сравнение элитного события NS-B50027-4 с нетрансгенными культиварами (по данным анализа методом GC-FID) показано в табл. 4 (анализ REML; $F_{pr}<0,001$ Sig для всех площадок).

Таблица 4

Среднее % содержание DHA (C22:6n3) на площадках по
культивару/элитному событию

Название линии Площадка:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по площадке
ATR Bonito	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0
ATR Gem	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1
ATR Stingray	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1
ATR Wahoo	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1
AV Garnet	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.0	0.1
AV Jade	0.0	0.3	0.5	0.0	0.2	0.1	0.3	0.0	0.2
AV Zircon	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1
Monola 515TT	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1
NS-B50027-4	8.1	9.8	7.8	7.5	8.5	8.4	8.8	10.2	8.6
B0050-027-18-36-13	10.0	12.2	9.5	9.7	10.1	10.4	10.8	13.3	10.8
B-050-27-18-105-13	10.5	11.3	9.0	9.6	10.2	9.7	10.9	12.5	10.5
Мин значение для сорта	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0
NS-B50027-4	8.1	9.8	7.8	7.5	8.5	8.4	8.8	10.2	8.6
Макс значение для сорта	0.1	0.3	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.0	0.2
Среднее	3.5	3.6	3	2.49	3.7	3.56	3.88	4.1	
VAR	0.15	0.07	0.079	0.29	0.14	0.14	0.11	0.18	
SE	0.39	0.27	0.281	0.53	0.37	0.37	0.33	0.42	
LSD	0.78	0.54	0.6	1.1	0.75	0.73	0.65	0.84	
CV%	11	7.5	9.4	21.5	10	10.6	8.4	10.4	

Прогнозируемое содержание DHA, выраженное в кг/га, рассчитанное на основе профиля жирных

кислот, процентного содержания масла в семени и выхода зерна, значительно изменялось ($P < 0,05$) между линиями по всем площадкам. Изменчивость процентного содержания для трансгенных линий было значительно ($P < 0,05$) более высокой по сравнению с нетрансгенными линиями по всем площадкам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна. Изменчивость между трансгенными линиями сибсов использовали в качестве основы для отбора. Была отмечена высокая стабильность ДНА, выраженная в единицах продукции на единицу площади (кг/га), что обусловлено низкой изменчивостью по площадкам содержания масла в семенах и процентного содержания ДНА, продуцируемой в семенах.

Прогнозируемый выход ДНА (кг/га) по площадкам и сравнение элитного события NS-B50027-4 с нетрансгенными культиварами показано в табл. 5 (анализ REML, F $pr < 0,001$ Sig для всех площадок).

Таблица 5

Средний прогнозируемый выход ДНА (кг/га) на площадках по линиям

Название линии Площадка:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по площадке
ATR Bonito	0	1	0	1	0	0	1	0	0
ATR Gem	0	0	0	0	2	2	2	1	1
ATR Stingray	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ATR Wahoo	1	0	1	0	0	1	1	0	0
AV Garnet	0	1	2	1	1	4	1	2	1
AV Jade	0	0	1	0	1	0	0	0	0
AV Zircon	0	0	0	2	0	4	1	0	1
Monola 515TT	0	0	2	0	2	0	0	0	0
NS-B50027-4	30	28	39	36	50	49	24	41	37
B0050-027-18-36-13	25	27	41	41	52	53	24	36	37
B-050-27-18-105-13	24	25	34	50	46	40	26	33	35
Мин значение для сорта	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NS-B50027-4	30.0	28.0	39.0	36.0	50.0	49.0	24.0	41.0	37.0
Макс значение для сорта	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	1.0
Среднее	8	8	12	12	16	17	8	12	
VAR	3.93	3.08	14.60	38.66	10.77	24.55	7.60	6.94	
SE	1.98	1.75	3.81	6.20	3.28	4.79	2.75	2.63	
LSD	4.0	3.5	7.6	12.4	6.6	9.6	5.5	5.3	
CV%	23.6	22.5	33.1	53.4	20.3	29.8	34.2	22.7	

Что касается содержания в семенах LC-PUFA омега-3 - процентного содержания EPA, DPA и ДНА (измеренного с помощью HPLC) - процентное содержание LC-PUFA значительно изменялось ($P < 0,05$) между линиями по всем восьми площадкам. Изменчивость % содержания для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) более высокой по сравнению с культиварами по всем экспериментам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на агрономию или коммерческое производство зерна. Изменчивость между трансгенными линиями сибсов использовали в качестве основы для отбора. Следовые количества LC-PUFA, наблюдаемые в нетрансгенных линиях, вероятно, были связаны с потоком пыльцы, движением семян или ошибкой GC-FID.

В табл. 6 показаны значения в процентах, определенные методом GC-FID (анализ REML; F $pr < 0,001$ Sig для всех площадок).

Таблица 6

Площадка по культивару или трансгенной линии: среднее содержание LC-PUFA в семенах (% сумма EPA+DPA+DHA)

Название линии Площадка:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по площадке
ATR Bonito	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.2	0.1
ATR Gem	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
ATR Stingray	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.1	0.1	0.5	0.2
ATR Wahoo	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1
AV Garnet	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0	0.1
AV Jade	0.0	0.4	0.5	0.0	0.2	0.1	0.3	0.0	0.2
AV Zircon	0.0	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1
Monola 515TT	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.0	0.2

NS-B50027-4	9.5	11.4	9.1	8.9	9.8	9.8	10.3	11.8	10.1
B0050-027-18-36-13	11.7	14.2	11.0	11.4	11.8	12.2	12.7	15.3	12.5
B-050-27-18-105-13	12.2	13.2	10.5	11.3	11.9	11.3	12.7	14.5	12.2
Мин значение для сорта	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
NS-B50027-4	9.5	11.4	9.1	8.9	9.8	9.8	10.3	11.8	10.1
Макс значение для сорта	0.1	0.4	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5	0.2
Среднее	4.3	4.4	3.6	3.05	4.5	4.34	4.75	4.9	
VAR	0.23	0.11	0.112	0.33	0.19	0.2	0.14	0.23	
SE	0.48	0.33	0.334	0.58	0.44	0.43	0.38	0.48	
LSD	0.95	0.66	0.7	1.2	0.87	0.87	0.76	0.96	
CV%	11	7.6	9.3	18.9	9.7	10.3	8	9.8	

Прогнозируемое содержание LC-PUFA, выраженное в кг/га, рассчитанное на основе профиля жирных кислот, % содержания масла в семенах и выхода зерна, значительно изменялось ($P<0,05$) между обрабатываемыми линиями по всем площадкам. Изменчивость % содержания для трансгенных линий была значительно ($P<0,05$) более высокой по сравнению с культиварами по всем экспериментам. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не оказывает коммерческого влияния на агрономию или производство зерна. Изменчивость между трансгенными линиями сибсов использовали в качестве основы для отбора. Следовые количества в семенах культиваров, по-видимому, связаны с потоком пыльцы, движением семян или ошибкой HPLC. Была отмечена высокая стабильность LC-PUFA, выраженная в единицах продукции на единицу площади (кг/га), что обусловлено низкой изменчивостью по площадкам содержания масла в семенах и процентного содержания DHA, продуцируемой в семенах. См. также фиг. 2 и 3.

В табл. 7 показано прогнозируемое содержание LC-PUFU в кг/га ($F_{pr}<0,001$ для всех площадок).

Таблица 7

Среднее прогнозируемое содержание LC-PUFA (кг/га) в семенах на площадках по культиварам (линиям)

Название линии Площадка:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по площадке
ATR Bonito	0	1	0	1	0	0	1	0	0
ATR Gem	1	0	0	0	2	3	3	0	1
ATR Stingray	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ATR Wahoo	0	0	2	0	0	1	1	0	1
AV Garnet	0	1	2	1	1	4	1	0	1
AV Jade	0	1	1	0	1	0	0	0	0
AV Zircon	0	0	0	2	0	4	2	0	1
Monola 515TT	0	0	2	0	2	0	0	0	1
NS-B50027-4	35	33	46	43	58	58	28	46	43
B0050-027-18-36-13	29	32	48	48	60	61	28	41	43
B-050-27-18-105-13	28	29	40	58	53	46	30	40	41
Среднее	10	10	14	14	20	20	10	14	
VAR	5.50	4.34	21.71	54.48	15.98	34.93	11.14	58.10	
SE	2.34	2.08	4.65	7.36	3.99	5.71	3.33	4.04	
LSD	4.7	4.2	9.3	14.7	8.0	11.4	6.7	8.1	
CV%	22.6	21.9	33.1	51.9	20.1	28.9	33.5	54.8	

Содержание масла в семенах, определенное с помощью ЯМР, также было сведено в таблицу для каждой из площадок культивирования и представлено в табл. 8 (в процентах; анализ REML; $F_{pr}<0,001$ Sig для всех площадок).

Таблица 8

Среднее содержание масла в семенах (%) на площадках по культиварам

Линия:									
Площадка:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по площадке
ATR Bonito	43.0	40.6	43.6	43.4	42.6	41.8	39.1	39.6	41.7
ATR Gem	43.7	40.7	43.9	42.7	42.3	40.5	37.8	39.5	41.3
ATR Stingray	41.4	39.7	42.6	42.8	41.1	39.1	38.9	39.9	40.6
ATR Wahoo	43.1	41.0	43.3	43.4	42.5	40.1	39.0	39.9	41.4
AV Garnet	43.9	39.9	43.4	41.8	41.5	39.1	36.5	36.4	40.2
AV Jade	41.7	40.2	42.6	42.2	42.5	38.6	37.5	39.4	40.6
AV Zircon	44.0	40.6	43.6	42.1	41.5	39.8	36.9	38.8	40.9
Monola 515TT	42.2	40.1	42.3	42.1	42.2	38.8	38.1	39.3	40.6
NS-B50027-4	38.7	36.1	39.3	38.2	37.3	36.5	34.2	35.1	36.9
B0050-027-18-36-13	36.7	34.3	37.2	37.9	36.8	34.3	33.4	33.2	35.5
B-050-27-18-105-13	36.3	34.4	37.9	37.4	35.8	34.1	32.1	33.0	35.1
Мин значение для культивара	41.4	39.7	42.3	41.8	41.1	38.6	36.5	36.4	40.2
NS-B50027-4	38.7	36.1	39.3	38.2	37.3	36.5	34.2	35.1	36.9
Макс значение для культивара	44.0	41.0	43.9	43.4	42.6	41.8	39.1	39.9	41.7
Среднее	40.8	38.7	41.5	41.2	39.8	38.01	37	37.8	
VAR	0.13	0.09	0.23	0.13	0.13	0.19	0.18	0.1	
SE	0.36	0.3	0.477	0.36	0.36	0.42	0.43	0.31	
LSD	0.71	0.59	1	0.7	0.73	0.85	0.85	0.62	
CV%	1	0.8	1.2	0.9	0.9	1.1	1.2	0.8	

Дополнительный анализ содержания жирных кислот в семенах NS-B50027-4 представлен в табл. 9.

Таблица 9

Подробные данные по содержанию жирных кислот в семени NS-B50027-4

NS-B50027-4, Поколение Т7, Лето 2015-2016												
								GLA	ALA		SDA	
	C14:0	C16:0	C16:1n7c	C18:0	C18:1n9c	C18:1n7c	C18:2n6c	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C18:4n3	C20:1n9c
1*	0.05	4.33	0.24	2.16	38.83	4.26	7.81	0.58	21.54	0.64	2.20	1.31
2	0.05	4.28	0.23	2.19	38.32	4.17	7.76	0.59	21.58	0.65	2.21	1.31
3	0.05	4.20	0.22	2.19	38.77	4.06	7.81	0.60	21.73	0.66	2.22	1.28
4	0.05	4.19	0.21	2.16	38.69	4.09	7.79	0.61	21.66	0.63	2.25	1.34
5	0.05	4.26	0.21	2.18	38.35	4.22	7.81	0.59	21.78	0.64	2.25	1.29
	0.05	4.25	0.22	2.18	38.69	4.16	7.80	0.60	21.66	0.64	2.23	1.30
NS-B50027-4, Поколение Т6, Зима 2015												
1	0.0	4.60	0.21	2.22	41.95	3.10	6.35	0.47	21.06	0.69	2.27	1.14
2	0.0	5.00	0.25	2.01	36.02	3.50	6.70	0.66	21.46	0.66	3.21	1.10
3	0.09	4.67	0.24	2.32	34.45	3.41	6.33	0.60	22.53	0.71	3.35	1.01
4	0.0	4.57	0.20	2.01	34.27	3.08	6.47	0.59	23.14	0.65	3.24	1.08
5	0.0	5.08	0.30	2.22	36.51	3.99	6.55	0.57	21.59	0.72	3.41	1.06
	0.02	4.78	0.24	2.15	36.64	3.42	6.48	0.58	21.95	0.69	3.10	1.08
NS-B50027-4, Поколение Т5, Лето 2014-2015												
1	0.05	4.51	0.21	2.05	39.18	4.10	8.67	0.66	21.93	0.60	1.86	1.38
NS-B50027-4, Поколение Т4, Зима 2014												
1	0.17	3.93	0.16	2.14	44.54	2.65	7.02	0.45	19.4	0.64	2.21	1.26
*Номер образца												

NS-B50027-4, Поколение T7, Лето 2015-2016 (продолжение)												
		DGLA	ETE		ETA		EPA		DPA6		DPA3	DHA
	C21:0	C20:3n6	C20:3n3	C22:0	C20:4n3	C22:1n9c	C20:5n3	C24:0	C22:5n6	C24:1n9c	C22:5n3	C22:6n3
1*	0	0	0.71	0.31	0	0	0.40	0.24		0.10	0.85	9.69
2	0	0	0.70	0.32	0	0	0.39	0.23		0.11	0.88	9.78
3	0	0	0.72	0.32	0	0	0.40	0.23		0.09	0.89	9.83
4	0	0	0.71	0.33	0	0	0.41	0.23		0.08	0.91	9.92
5	0	0	0.72	0.32	0	0.01	0.41	0.23		0.10	0.89	9.80
	0	0	0.71	0.32	0	0	0.40	0.23		0.10	0.88	9.80
NS-B50027-4, Поколение T6, Зима 2015 (продолжение)												
1	0	0	0.59	0.34	0	0	0.55	0	0.09	0	0.89	10.22
2	0	0	0.47	0.33	0	0	0.68	0	0.11	0.10	1.21	13.34
3	0	0	0.60	0.33	0	0	0.80	0	0	0.09	1.13	14.02
4	0	0	0.63	0.38	0	0	0.71	0.14	0.10	0.10	1.07	13.99
5	0	0	0.52	0.37	0	0	0.60	0.11	0	0.13	1.06	12.10
	0	0	0.56	0.35	0	0	0.67	0.05	0.06	0.08	1.07	12.73
NS-B50027-4, Поколение T5, Лето 2014-2015 (продолжение)												
1	0.14	0	0.83	0.33	0	0	0.32	0.8	0.16	0.13	0.71	8.43
NS-B50027-4, Поколение T4, Зима 2014 (продолжение)												
1		0.07	0.46	0.26	1.09	0	0.41				0.85	8.89
*Номер образца												
NS-B50027-4, Поколение T7, Лето 2015-2016 (продолжение)												
	Масло NMR	Сумма EPA, DPA, DHA		Общие Ω3	Общие Ω6	Ω3/Ω6	Общий насыщенный жир	Общий мононенасыщенный жир		Общие PUFA		
1*	39.3	10.94		35.39	8.39	4.22	7.74	44.74		43.78		
2	38.8	11.04		35.54	8.36	4.25	7.41	44.62		43.89		
3	39.2	11.12		35.79	8.41	4.26	7.64	44.41		44.20		
4	39.5	11.23		35.85	8.40	4.27	7.59	44.41		44.25		
5	39.4	11.10		35.85	8.40	4.27	7.68	44.19		44.25		
		11.09		35.68	8.39	4.25	7.67	44.48		44.07		
NS-B50027-4, Поколение T6, Зима 2015 (продолжение)												
1		11.66		35.58	6.91	5.15	7.85	46.40		42.48		
2		15.23		40.37	7.47	5.41	7.99	40.96		47.84		
3		15.95		42.42	6.93	6.12	8.11	39.19		49.35		
4		15.76		42.78	7.17	5.97	7.75	38.73		59.94		
5		13.75		39.27	7.12	5.52	8.49	41.98		46.38		
		14.47		40.08	7.12	5.63	8.04	41.45		47.20		
NS-B50027-4, Поколение T5, Лето 2014-2015 (продолжение)												
1		9.46		34.09	9.49	3.59	7.76	45.00		43.58		
*Номер образца												

Данные в табл. 9 подтверждают, что дополнительно к жирным кислотам LC- $\omega 3$ семена NS-B50027-4 также содержат значительно большее количество ALA по сравнению с обычными сортами канолы. См. также табл. 3. Хотя ALA не является LC-PUFA, она является жирной кислотой $\omega 3$. Отношение жирных кислот $\omega 3:\omega 6$ в масле семян NS-B50027-4 в табл. 9 находится в диапазоне от около 3,59 до около 6,12; отношение жирных кислот $\omega 3:\omega 6$ в обычном масле канолы составляет около 0,5. См. Patterson et al., J. Nutr. Metab, 2012:539426 (2012).

В табл. 10 представлены данные, относящиеся к процентному содержанию DHA и LC-PUFA в семенах от шестнадцати поколений элитного события NS-B50027-4, выращенных на экспериментальных площадках в Австралии. Дополнительные полевые испытания в Австралии позволили получить объемные семена с 9,6% DHA и 10,1% LC-PUFA.

Таблица 10

DHA% и LC-PUFA% в семенах от элитного события NS-B50027-4 на поколение

Покоче- ние		Образец семени	Среда	Сезон выращивания	Год в поле	Площад- ка	DHA% в семенах	LC-PUFA% в семенах
1	T1	Одно растение	Стекл. тепли- ца	Контролируемая среда		A	5.7	6.0
2	T2	Одно растение	Стекл. тепли- ца	Контролируемая среда		A	9.5	10.1
3	T3	Одно растение	Стекл. теплица	Контролируемая среда		A	12.6	13.1
4	T3-х	Объемные	Изолирую- щий тент	Зима/Весна	2014	B	8.9	10.2
5	T3-2х	Объемные	Открытое поле	Лето	2014-15	C	8.4	9.5
6	T3-3х	Объемные	Открытое поле	Зима/Лето	2015	D	9.0	10.6
7	T4	Одно растение	Стекл. теплица	Контролируемая среда		A	11.9	13.2
8	T5	Одно растение	Стекл. теплица	Контролируемая среда		A	13.4	14.6
9	T5-х	Объемные	Изолирую- щий тент	Зима/Весна	2015	B	12.7	14.5
10	T5-2х	Объемные	Открытое поле	Лето	2015-16	C	9.8	11.1
11	T5-3х	Объемные	Открытое поле	Зима/Весна	2016	D	9.6	10.6
12	T6	Одно растение	Стекл. теплица	Контролируемая среда		A	12.9	14.4
13	T6-х	Объемные	Изолирую- щий тент	Лето	2015-16	C	17.3	18.8
14	T6-2х	Объемные	Изолирую- щий тент	Зима/Весна	2016	E	10.1	12.1
15	T7	Одно растение	Стекл. теплица	Контролируемая среда		A	13.8	15.1
16	T7-х	Объемные	Изолирую- щий тент	Зима/Весна	2016	B	12.5	14.1

Кроме того, возможность выращивать NS-B50027-4 в Канаде тестировали в контролируемых экспериментальных условиях на двух различных площадках в 2016 г. В табл. 11 представлено сравнение агрономических данных и данных по выходу NS-B50027-4 т нескольких нетрансгенных линий канолы.

Таблица 11

Данные агрономических измерений для нетрансгенных культиваров канолы и экспериментальных трансгенных тестируемых линий, полученные на двух экспериментальных площадках в Канаде в 2016 г.

Признак:	Всхожесть	Высота раст. в сост. зрелости	Начало цветения	Окончание цветения	Длитель- ность цветения	Полетание в сост. зрелости	Трещущие семена	Кол-во раст. при сборе	Симптомы альтернариоза	Усть-ть к черной ножке	Мощность растения	Влажность зерна	% Garnet в зерне	Выход зерна
Название линии	Раст на м ²	см	День	День	Дни	Балл (1-9)	Кол- во	Раст на м ²	Балл (1-9)	Балл (1-9)	Балл (1-9)	%	%	т/га
ATR Bonito	23	90	49	75	26	8	3	24	2	6	6	8	76	1.9
ATR Gem	22	98	48	76	27	7	2	23	3	6	6	8	79	2.0
ATR Stingray	21	88	48	75	27	9	6	26	3	7	5	6	61	1.7
ATR Wahoo	22	98	48	75	27	7	4	26	2	7	6	10	87	2.2
AV Garnet	27	110	48	76	28	6	7	23	3	7	6	8	100	2.6
AV Jade	27	109	48	76	29	8	3	27	2	7	7	7	85	2.1
AV Zircon	14	125	50	76	26	8	9	18	1	7	5	8	101	2.6
Monola 515TT	26	79	47	73	27	8	13	25	2	6	6	6	60	1.6
DK 7444	21	112	47	72	25	7	4	23	2	7	7	5	113	2.8
LL 130	18	123	47	73	26	8	4	21	2	7	6	6	114	2.9
NS-B50027-4 T3	11	109	49	77	28	8	4	16	2	8	4	8	80	2.1
NS-B50027-4 T5	16	111	49	76	27	8	2	18	2	8	6	9	82	2.3
Мин значение для сорта	14	79	47	72	25	6	2	18	1	6	5	5	60	1.7
NS-B50027-4	14	110	49	76	28	8	3	18	2	8	5	8	81	2.2
Макс значение для сорта	27	125	50	76	29	9	13	26	3	7	7	10	114	2.9

Так как линия канолы NS-B50027-4 является по существу гомогенной, ее можно воспроизвести путем посева семян этой линии, выращивания полученных растений канолы в условиях самоопыления или

опыления сибсов в условиях надлежащей изоляции, и сбора полученных семян с использованием традиционных агрономических методов.

Пример 2. Сегреганты NS-B50027-4.

Как отмечено выше, NS-B50027-4 содержит вставку из шестнадцати генов (две инвертированные кассеты по восемь генов каждая) и вставку из четырех генов; каждая вставка представляет отдельный локус в геноме растения. Комбинация скрещивания, возвратного скрещивания и самоскрещивания отщепляла вставку из шестнадцати генов в хромосому A05 ("Локус A05 сегреганта") и вставку из четырех генов в хромосому A02 ("Локус A02 сегреганта"). Агрономические данные для этих сегрегантов сравнивали с NS-B50027-4 и нетрансгенными культиварами, выращенными на четырех различных экспериментальных площадках в Австралии. Обобщенные данные показаны в табл. 12, в которой представлены средние значения по четырем экспериментальным площадкам (анализ REML; $F_{pr} < 0,001$ Sig для всех признаков).

Таблица 12

Данные агрономического измерения для нетрансгенных культиваров канолы и экспериментальных трансгенных тестовых линий по четырем экспериментальным площадкам в 2016 г.

Признак:	Всхожесть	Всхожесть	Высота раст. в сост. зрелости	Начало цветения	Окончание цветения	Длительность цветения	Полетание в сост. зрелости	Тронувшие семена	Кол-во растений при сборе	Мощность растений
Название линии	Раст. на м ²	Балл (1-9)	см	День	День	Дни	Балл (1-9)	No.	Раст. на м ²	Балл (1-9)
ATR Bonito	15.7	7.5	110.7	102.1	146.9	44.8	4.6	30.6	12.8	6.1
ATR Gem	17.7	7.6	115.4	103.0	148.9	46.0	4.5	40.4	14.0	6.5
ATR Stingray	18.9	7.3	100.9	100.7	147.2	46.5	3.4	74.6	15.4	5.4
ATR Wahoo	17.4	7.7	119.3	104.9	149.8	44.9	4.3	34.6	13.0	6.2
AV Garnet	18.8	7.7	126.9	101.7	148.5	46.7	4.8	41.8	13.9	7.1
AV Jade	17.2	7.7	117.6	100.0	147.9	47.9	4.9	50.9	16.1	7.4
AV Zircon	14.3	7.4	119.8	102.7	147.3	44.6	4.8	71.4	12.5	7.2
Monola 515TT	21.7	7.9	115.4	105.9	149.5	43.6	3.3	92.1	17.3	5.7
NS-B50027-4 T3	12.8	6.3	120.7	106.5	149.6	43.2	2.8	45.0	10.7	5.2
NS-B50027-4 T5	17.2	7.6	111.3	106.5	149.2	43.1	1.8	40.2	12.9	5.9
Локус A05 сегреганта	15.7	7.2	94.9	102.3	150.1	47.7	1.9	27.6	15.1	4.8
Локус A02 сегреганта	16.5	7.7	123.9	103.5	148.8	45.3	3.3	38.3	14.5	6.9
Мин значение для сорта	14.8	7.3	100.9	100.0	146.9	43.6	3.3	30.6	12.5	5.4
NS-B50027-4	15.0	7.0	116.0	106.2	149.4	43.2	2.3	40.4	11.8	5.6
Макс значение для сорта	21.7	7.9	126.9	105.9	150.1	47.7	4.9	92.1	17.3	7.4

Дополнительно к мощности растения и другим агрономическим характеристикам, кроме того, характеризовали выход зерна (т/га), как показано в табл. 13, в которой процентное содержание масла определяли с помощью NMR, и сорт AV Garnet, используемый в качестве линии сравнения, принимали за 100% в отношении содержания масла в семенах.

Таблица 13

Выход зерна (т/га) и данные, характеризующие семена, для нетрансгенных культиваров канолы и экспериментальных трансгенных тестовых линий по четырем экспериментальным площадкам в 2016 г.

Признак:	Выход зерна	Влажность зерна при сборе	Масло семян	Масло при 6% влажности
Название линии:	т/га	%	%	%
ATR Bonito	3.46	8.3	86.8	46.8
ATR Gem	3.48	9.7	87.0	46.4
ATR Stingray	3.61	6.7	90.2	46.3
ATR Wahoo	3.76	10.9	93.8	46.6
AV Garnet	4.00	8.0	100.0	45.8
AV Jade	3.90	6.8	97.8	47.5
AV Zircon	3.73	6.8	93.1	47.8
Monola 515TT	3.16	9.3	79.2	45.2
NS-B50027-4 T3	2.96	10.0	74.1	42.8
NS-B50027-4 T5	2.83	9.8	70.7	41.4
Локус A05 сегреганта	3.10	11.6	77.1	42.2
Локус A02 сегреганта	4.21	10.0	105.2	46.8
Мин значение для сорта	3.26	6.8	79.2	45.2
NS-B50027-4	2.90	9.9	72.4	42.0
Макс значение для сорта	4.00	10.9	100.0	47.8

Среднее содержание DHA и LC-PUFA по площадкам для NS-B50027-4 T3 составило около 6,2% для DHA и около 7,1% для LC-PUFA, и среднее содержание DHA и LC-PUFA по площадкам для NS-B50027-4 T5 составило около 7,4% для DHA и около 8,6% для LC-PUFA, что свидетельствует о генетическом эффекте в поколениях от T3 до T5.

Кроме того, в отношении Локуса A02 сегреганта, эта трансгенная линия, происходящая из NS-B50027-4, содержит следующие четыре трансгена: $\Delta 6$ -десатуразу (происходящую из *M. pusilla*), $\Delta 5$ -элонгазу (происходящую из *P. cordata*), $\Delta 5$ -десатуразу (происходящую из *P. salina*) и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу (происходящую из *P. pastoris*). Хотя эта линия производит масло семян, в Локусе A02 сегреганта отсутствуют ферменты, необходимые для продукции LC-PUFA и DHA (см. фиг. 1). В частности, в нем отсутствует $\Delta 12$ -десатураза, которая обеспечивает ранний субстрат, LA, $\Delta 6$ -элонгазу, превращающую SDA в ETA, и $\Delta 4$ -десатураза, которая превращает DPA в DHA. Как ожидалось, нормативные полевые испытания показали, что Локус A02 сегреганта продуцировал менее 1% LC-PUFA (EPA+DPA+DHA). Для сравнения Локус A05 сегреганта содержит полный набор ферментов для биосинтеза DHA, и нормативные полевые испытания показали, что он продуцировал около 4% DHA в примерно 4,5% LC-PUFA. Удивительно, но в этом же нормативном полевом испытании линия NS-B50027-4 продуцировала около 7,4% DHA в примерно 8,4% LC-PUFA (это испытание показало неоптимальный сбор). То, что линия NS-B50027-4 продуцировала значительно больше DHA, чем Локус A05 сегреганта, является удивительным, так как, например, Локус A02 сегреганта не обеспечивает дополнительную $\Delta 4$ -десатуразу, которая превращает DPA в DHA. Локус A02 сегреганта обеспечивает потенциал для повышения урожая.

Локусы A02 и A05 могут быть сегрегированы из NS-B50027-4 и использованы для дальнейшего генерирования потомства, происходящего из NS-B50027-4. Например, сегрегированный локус A02 может быть пакетирован в другие линии, продуцирующие LC-PUFA, такие как линия "Full Single", содержащая одну вставку из семи трансгенов, для биосинтеза DHA для увеличения продукции LC-PUFA в этой линии. Действительно семена гомозиготного потомства F4, пакетированного путем интрогрессии локуса A02 в реципиент Full Single, показали 6% увеличение DHA по сравнению с реципиентной линией Full Single. Интересно, что это гомозиготное потомство, содержащее локус A02, продуцировало больше DHA, чем гомозиготная линия Full Single F4, пакетированная сегрегированным локусом A05. Следует учесть, что линия NS-B50027-4 продуцировала больше DHA, чем линия Full Single, и Full Single, пакетированная NS-B50027-4 (оба локуса), также показала увеличение продукции DHA по сравнению с Full Single.

Локус A02 NS-B50027-4 может быть интрогрессирован в рекуррентную Brassica или канолу, которая продуцирует другие LC-PUFA, такие как EPA или DPA, для увеличения продукции LC-PUFA в этой Brassica или каноле. Например, описано трансгенное растение *B. juncea*, которое продуцирует значительные количества DPA в семенах. WO 2015089587. Интрогрессия сегрегированного локуса A02 NS-B50027-4 в это растение *B. juncea* повысила количество DPA, продуцируемой в семенах. Аналогично растение Brassica, трансформированное биосинтетическим путем для выработки EPA (например, трансгенная вставка(и), не включающая ни $\Delta 5$ -элонгазу, ни $\Delta 4$ -десатуразу), продуцирует значительные количества EPA в семенах; и продукция EPA повысилась путем интрогрессивной гибридизации с локусом A02 NS-B50027-4.

Пример 3. Сравнительный аллель-специфический анализ методом PCR (KASP).

Фенотипическая экспрессия трансгенов в каноле определяется как структурой самой трансгенной кассеты, так и локализацией ее вставки в геноме растения: присутствие трансгенов в определенных локализациях в геноме растения может влиять на экспрессию трансгена и общий фенотип растения. Включение рекомбинантной молекулы ДНК в геном растения обычно происходит в результате трансформации клетки или ткани (или в результате другой генетической манипуляции). Конкретный(ые) сайт(ы) включения может(могут) быть случайным или предвременно определенным (если используется процесс таргетной интеграции). Агрономически или промышленно успешное введение представляющего коммерческий интерес признака в растение путем генетической манипуляции может представлять длительную процедуру, в зависимости от различных факторов. Фактическая трансформация и регенерация генетически трансформированных растений являются только первой в сериях стадий отбора, которые включают обширное генетическое исследование, разведение и оценку в полевых испытаниях, что в конечном итоге приводит к отбору элитного события.

Линия NS-B50027-4 была разработана после масштабной селекции и полевых испытаний и обеспечивает культивар канолы, который продуцирует около 7-15% DHA (мас.% от общего содержания жирных кислот) в масле семени. Генетический анализ показал, что линия NS-B50027-4 имеет трансгенную вставку на хромосоме A02 и еще одну трансгенную вставку на хромосоме A05. Вставка на A05 содержит две полные Т-ДНК-ограниченные кассеты по восемь генов (*Micru-Δ6D*, *Pugco-Δ5E*, *Pavsa-Δ5D*, *Pisra-ω3D*, *Pavsa-Δ4D*, *Lackl-Δ12D*, *Pugco-Δ6E* и маркер *PAT*) в ориентации "голова-к-голове" (RB-LB:LB-RB). Вставка на хромосоме A02 содержит набор из четырех генов *Micru-Δ6D*, *Pugco-Δ5E*, *Pavsa-Δ5D* и *Pisra-ω3D*. Удивительно, что скрещивание путем сегрегации показало, что вставки на хромосоме A02 и хромосоме A05 были необходимы для достижения продукции DHA, составляющей около 11%.

Около 1200 потомков из восьми различных BC и F₂ популяций ДНА-обогащенной канолы, полученных в результате разведения путем интрогрессии, использовали для выделения ДНК на основе стандартной операционной процедуры (SOP) фирмы LGC Ostorpure, разработанной в лаборатории Nuseed Molecular Lab в Woodland. Вкратце два диска лиофилизированных листьев диаметром 0,25 дюйма измельчали в 300 мкл буфера для выделения ДНК (100 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 25 мМ EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS, 1,5 М NaCl) при 1400 об/мин в течение 8 мин с помощью устройства GenoGrinder. После инкубации на водяной бане при 55°C в течение 45 мин и центрифугирования при 4500 об/мин в течение 30 мин, 50 мкл супернатанта переносили в 100 мкл связывающего буфера фирмы LGC с магнитными частицами sbeadex. После связывания и промывания ДНК элюировали в 80 мкл буфера для элюирования ДНК фирмы LGC.

Концентрацию ДНК измеряли на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Scientific), которая находилась в диапазоне 5,0-20,0 нг/мкл со средним значением 10,0 нг/мкл. Образцы ДНК разбавляли 1×. Для каждой реакции 2,0 мкл (~ 5,0 нг/мкл) образца геномной ДНК и 2 мкл мастер-микса с праймерами вносили в лунки 384-луночного планшета для генотипирования KASP.

Дополнительно к потомству из популяций ДНА-обогащенной канолы, полученных в результате интрогрессии, восемь контролей было включено в генотипирование. Они включали два контроля без ГМО (Dwarf и AV Jade), два гемизиготных контроля (2,5 нг Av Jade или 2,5 нг Dwarf + 2,5 нг B0050-027-18-20-12-19); два положительных по событию контроля (B0050-027-18-20-12-19) и четыре нетемплатных контроля (NTC). Положительный контроль (растение T5 B0050-027-18-20-12-19) ранее использовали для характеристики события ДНА канолы посредством секвенирования.

Анализы KASP были разработаны для обеспечения простых, экономически эффективных, высокопроизводительных и гибких способов обнаружения и мониторинга восьми трансгенов и четырех NS-B50027-4-специфических соединений, а также для дополнительного облегчения интрогрессии NS-B50027-4 в программах разведения. Химию генотипирования KASP™, дизайн анализа, генотипирование и оценку выполняли в соответствии со стандартным протоколом производителя (LGC Ltd., Middlesex, UK) с модификациями.

Информацию о последовательности загружали в LGC Kraken Workflow Manager, и анализы KASP разрабатывали с использованием его программы для разработки анализа Primer Picker. Типичный анализ KASP включает два аллель-специфических праймера (Primer_Allele X для трансгенного аллеля и Primer_Allele Y для нетрансгенного аллеля дикого типа) и один общий локус-специфический праймер (PrimerCommon). Primer_Allele X связан с флуоресцентным красителем FAM, и Primer_Allele Y с флуоресцентным красителем HEX.

Большинство анализов, нацеленных на участки соединения, представляли собой этот тип анализов с тремя праймерами (табл. 14). Для детекции ДНА-обогащенной канолы также были разработаны анализы с четырьмя праймерами в дополнение к обычным анализам с тремя праймерами, упомянутым выше. Анализы с четырьмя праймерами включали трансгенный аллель-специфический Primer_Allele X, аллель-специфический PrimerAllele Y дикого типа, PrimerCommon, специфичный для гена Омега 3 и специфичный для дикого типа PrimerCommon 2 в реакции. Для детекции восьми генов в кассете Омега 3 в каждом анализе использовали только два праймера, Primer_Allele X и Primer_Common (анализ с двумя праймерами); оба праймера были специфичными для гена Омега-3 (табл. 14).

Таблица 14

Последовательности праймеров из 28 анализов KASP для детекции и отбора с помощью маркера (MAS) ДНА-обогащенной канолы

ID	Мишень	Название праймера	SEQ ID NO	Последовательность праймера (5'-3')
NBN01	Micpu-Δ6D	Primer_Allele X	NO:1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAGCA CCGTAGTAAGAGAGCA
		Primer_Common	NO:2	GCTAAGAAGTGGGACTCAACTACAA
NBN02	Pyrco-Δ5E	Primer_Allele X	NO:3	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTCTTGC TGGAACCTCTTGG
		Primer_Common	NO:4	GGGTAGCCACATTGTAGGTAACGTA
NBN03	Pavsa-Δ5D	Primer_Allele X	NO:5	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAAGAGA CACCTTGGTGGAAAGA
		Primer_Common	NO:6	TAGCATCAGTTCCAACCTTGGTAAGCAAT
NBN04	Picpa-ω3D	Primer_Allele X	NO:7	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAACACG TAAGCAGACCAAGCAG
		Primer_Common	NO:8	CCCTCTTCTCCCTAACGAATTCCTT
NBN05	Pavsa-Δ4D	Primer_Allele X	NO:9	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGGAAC CTGTTGCTGCTGATGA
		Primer_Common	NO:10	GCGATCCTAGCACAAAGTTGAAGGTA
NBN06	Lackl-Δ12D	Primer_Allele X	NO:11	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATGGA TCGCTTACCTCTTCGT
		Primer_Common	NO:12	CAGGGTAAGGTTGTCTGTAAACGTT
NBN07	Pyrco-Δ6E	Primer_Allele X	NO:13	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTATTGGA TGGGGACTCAAGC
		Primer_Common	NO:14	GGGAGATCCTTAGTAGCAGAAGAGAT
NBN08	PAT	Primer_Allele X	NO:15	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGAGA GGCGTCTGTGAAAT
		Primer_Common	NO:16	AACAGCAGCCATATCAGCAGCAGTA
NBN57	Область соединения апстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:17	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTCAG TTTAAACTATCAGTGTTTGA
		Primer_Allele Y	NO:18	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGTTCTGTA TACAACTTGTCGTGCTAC
		Primer_Common	NO:19	GGGTGTGTGAAAACGTGTGAGCAA
NBN68	Область соединения апстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:20	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAACTATC AGTGTGTTGAACACCTC
		Primer_Allele Y	NO:21	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTACAACTT GTCGTGCTACACACCT
		Primer_Common	NO:22	GACAAGTGAATCTGTTTGGGGTTG
NBN58	Область соединения апстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:23	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTCAG TTTAAACTATCAGTGTTTGA
		Primer_Allele Y	NO:24	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGTTCTGTA TACAACTTGTCGTGCTAC
		Primer_Common	NO:25	GAAAACGTGTGAGCAATTGTTGGAGGT
NBN85	Область соединения апстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:26	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTCAG TTTAAACTATCAGTGTTTGA
		Primer_Allele Y	NO:27	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGTTCTGTA TACAACTTGTCGTGCTAC
		Primer_Common	NO:28	GACAAGTGAATCTGTTTGGGGTTG
NBN14	Область соединения апстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:29	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACAACTTG TCGTGCTACACACCT
		Primer_Allele Y	NO:30	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTAACTAT CAGTGTGTTGAACACCTCC
		Primer_Common	NO:31	GGTGTGTGAAAACGTGTGAGC
NBN15	Область соединения	Primer_Allele X	NO:83	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTTAGC TAAATAAGAGGTTCTGTATACT

	апстрим вставки A02	Primer_Allele Y	NO:84	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTTTAGC TAAATAAGAGGTTCTGTATACA
		Primer_Common	NO:85	GATTGTGATTCCGGGCAGT
		Primer_Common2	NO:86	GTGTGAAAACGTGTGAGCAAT
NBN16	Область соединения даунстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:32	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGTGAGCA ATTGTTGGAGGT
		Primer_Allele Y	NO:33	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGTGATT CCGGGCAGTAG
		Primer_Common	NO:34	TCTTATCAACATTAAGAACATAATCTTTT AG
NBN62	Область соединения даунстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:35	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTAGCTA AATAAGAGGTTCTGTATACT
		Primer_Allele Y	NO:36	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTTTAGC TAAATAAGAGGTTCTGTATACA
		Primer_Common	NO:37	CAGGGATTGTGATTCCGGGCAGTA
		Primer_Common2	NO:38	GTGTGAGCAATTGTTGGAGGTGTGTA
NBN64	Область соединения даунстрим вставки A02	Primer_Allele X	NO:39	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGGGCA GTAGTAATTAATAATATAGTATTA
		Primer_Allele Y	NO:40	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGGTG TGTAGCACGACAAGTT
		Primer_Common	NO:41	CTCAAACTTCTTATCAACATTAAGAACAT A
NBN52	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:42	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTCAG TTTAAACTATCAGTGTTTG
		Primer_Allele Y	NO:43	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACGGTG GAGGTCACCATGT
		Primer_Common	NO:44	CACGGAGATAGGCTGCATCTGAAT
NBN51	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:45	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCTTCAG TTTAAACTATCAGTGTTTG
		Primer_Allele Y	NO:46	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACGGTG GAGGTCACCATGT
		Primer_Common	NO:47	GCTGCATCTGAATGACTGGTGTGTT
NBN09	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:48	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTTCTT GGGTGGGTCTGTCCTTA
		Primer_Allele Y	NO:49	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTTCTTG GGTGGGTCTGTCCTTC
		Primer_Common	NO:50	GTTGGCTAAGGTCACGGTGGAG
		Primer_Common2	NO:51	ATCCACTAGCAGATTGTCGTTTCCC
NBN50	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:52	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTGGGT GGGTCTGTCCTTC
		Primer_Allele Y	NO:53	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTCTTGG GTGGGTCTGTCCTTA
		Primer_Common	NO:54	GATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTT
		Primer_Common2	NO:55	CGTTGGCTAAGGTCACGGTGGA
NBN48	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:56	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTGGGT GGGTCTGTCCTTC
		Primer_Allele Y	NO:57	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTTCTTGG GTGGGTCTGTCCTTA
		Primer_Common	NO:58	CCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTT

		Primer_Common2	NO:59	CGTTGGCTAAGGTCACGGTGGA
NBN10	Область соединения апстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:60	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCACG GTGGAGGTCACCA
		Primer_Allele Y	NO:61	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGCCTTC AGTTTAACTATCAGTGT
		Primer_Common	NO:62	GGTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG
NBN83	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:63	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAGTTTA AACTATCAGTGTACCT
		Primer_Allele Y	NO:64	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACATGGT GACCTCCACCGTG
		Primer_Common	NO:65	GTACTTTAAGCTTATAACCCCTTTGTC
NBN82	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:66	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGATC CACTAGCAGATTGTCGTT
		Primer_Allele Y	NO:67	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTGGGT GGGTCTGTCCTTAC
		Primer_Common	NO:68	GCAGGAGGTACTTTAAGCTTATA
NBN84	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:69	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATTGTCG TTCCCGCCTTCAGTTT
		Primer_Allele Y	NO:70	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTCCTTAC ATGGTGACCTCCAC
		Primer_Common	NO:71	GTACTTTAAGCTTATAACCCCTTTGTC
NBN66	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:72	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGATTGTCG TTCCCGCCTTCAGTTT
		Primer_Allele Y	NO:73	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTCCTTAC ATGGTGACCTCCAC
		Primer_Common	NO:74	GCAGGAGGTACTTTAAGCTTATA
NBN41	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:75	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTTTATT CAACCGTTGGCTAAGGTA
		Primer_Allele Y	NO:76	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTTTATTC AACCGTTGGCTAAGGTC
		Primer_Common	NO:77	GATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTT
		Primer_Common2	NO:78	TTCTTGGGTGGGTCTGTCCTTACAT
NBN43	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:79	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTTTATT CAACCGTTGGCTAAGGTA
		Primer_Allele Y	NO:80	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTTTATTC AACCGTTGGCTAAGGTC
		Primer_Common	NO:81	GGAGATCCACTAGCAGATTGTCGTT
		Primer_Common2	NO:82	TTCTTGGGTGGGTCTGTCCTTACAT
NBN11	Область соединения даунстрим вставки A05	Primer_Allele X	NO:87	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTTTTTT TTCAACTGTGGCTAAGGTA
		Primer_Allele Y	NO:88	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACTTTTTT TTCAACTGTGGCTAAGGTC
		Primer_Common	NO:89	GTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG
		Primer_Common2	NO:90	GTCGTTTCCCGCCTTCAGTTT

Для системы генотипирования KASP требуется два компонента: Assay mix и Master mix (мастер-микс). Assay mix представляет собой смесь требуемых праймеров, и мастер-микс содержит все другие необходимые компоненты, включая буфер PCR, универсальную флуоресцентную систему получения информации и Taq-полимеразу.

Реакцию KASP проводили в объеме 4,0 мкл, состоящем из 2,0 мкл (10,0 нг) геномной ДНК, 2,0 мкл 2× мастер-микса KASP и 0,06 мкл Assay mix (праймеры). Assay mix (праймеры) представляют собой комбинацию 12 мкМ аллель-специфического Primer_Allele X и 12 мкМ Primer_Common для анализа с двумя праймерами, комбинацию 12 мкМ аллель-специфического Primer_Allele X, 12 мкМ аллель-специфического Primer_Allele Y и 30 мкМ Primer_Common для анализов с тремя праймерами, и комбинацию 12 мкМ аллель-специфического Primer_Allele X, 12 мкМ аллель-специфического Primer_Allele Y, 12 мкМ Primer_Common и 12 мкМ Primer_Common2 для анализов с четырьмя праймерами.

Реакции проводили в 384-луночном планшете в LGC Hydrocycler 16, используя следующие параметры циклов: 1 цикл при 94°C в течение 15 мин, затем восемь циклов при 94°C в течение 30 с и при 64°C-57°C (падение на 1,0°C за цикл) в течение 60 с, а затем тридцать циклов при 94°C в течение 30 с и при 57°C в течение 60 с. Если четкие кластеры генотипирования не были получены, планшет дополнительно подвергали температурному циклу, используя три дополнительных цикла при 94°C в течение 30 с и при 57°C в течение 60 с.

После завершения реакций KASP трансгенный аллель метили FAM посредством Primer_Allele X, и нетрансгенный аллель дикого типа метили HEX посредством Primer_Allele Y. Флуоресцентные сигналы считывали на микропланшетном считывающем устройстве PheraStar при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 520 нм для FAM и при 535/556 нм для HEX. Данные анализировали с использованием базы данных LGC Kraken.

Восемь ген-специфических доминантных анализов (NBN01-NBN08; один анализ/ген) было разработано для детекции восьми генов в кассете конструкции. Всего двадцать специфичных для вставки ко-доминантных анализов KASP, нацеленных на апстрим (NBN57, NBN68, NBN58, NBN85 и NBN14) и да-

унстрим (NBN16, NBN62 и NBN64) области соединения вставки на A02, и апстрим (NBN52, NBN51, NBN09, NBN50, NBN48 и NBN10) и даунстрим (NBN83, NBN82, NBN84, NBN66, NBN41 и NBN43) области соединения вставки на A05, было разработано и подтверждено с использованием 1200 потомков полученных путем интрогрессии популяций NS-B50027-4 (табл. 14). Более 10000 образцов было генотипировано с помощью этих маркеров.

Было разработано и подтверждено тридцать анализов методом конкурентной аллель-специфической PCR (KASP), нацеленных на восемь генов и четыре области соединения двух вставок события NS-B50027-4 DHA-обогащенной канолы. Эти анализы обеспечили простой, экономически эффективный, высокопроизводительный и гибкий подход к обнаружению и мониторингу NS-B50027-4 в программе разведения.

Пример 4. Подробное сравнение NS-B50027-4 и нетрансгенной канолы.

Данные, касающиеся производства семян канолы на опытных полевых участках за 2014-2016 гг., сведены в таблицу. Диапазон DHA и общее содержание EPA+DPA+DHA основаны на нескольких наблюдениях в полевых условиях. Содержание основных жирных кислот как в NS-B50027-4, так и в нетрансгенной "Контрольной" каноле может варьироваться на несколько процентных пунктов в зависимости от условий выращивания. В следующей табл. 15 "0,0" может относиться к следовому количеству, которое определяется как количество, меньше необходимого для точного определения количества компонента.

Таблица 15

Подробное сравнение содержание жирных кислот в NS-B50027-4 с контролем

Жирная кислота		NS-B50027-4 (%)	Контрольная канола (%)
Миристиновая	C14:0	0.1	0.1
Пальмитиновая	C16:0	4.3	3.9
Пальмитолеиновая	C16:1	0.2	0.2
Стеариновая	C18:0	2.2	1.6
Олеиновая	C18:1n9c	38.7	63.6
Цис-вакценовая	C18:1n7c	4.2	3.5
Линолевая	C18:2n6c	7.8	13.1
GLA	C18:3n6	0.6	0.0
ALA	C18:3n3	21.7	10.3
Арахидоновая	C20:0	0.6	0.6
SDA	C18:4n3	2.2	0.0
Гондоевая	C20:1n9c	1.3	1.5
Генэйкозановая	C21:0	0.0	0.0
DGLA	C20:3n6	0.0	0.0
ETE	C20:3n3	0.7	0.0
Бегеновая	C22:0	0.3	0.3
ETA	C20:4n3	0.0	0.0
Эруковая	C22:1n9c	0.0	0.0
EPA	C20:5n3	0.4	0.0
Лигноцериновая	C24:0	0.2	0.1
DPA6	C22:5n6	0.0	0.0
Невроновая	C24:1n9c	0.1	0.2
DPA3	C22:5n3	0.9	0.0
DHA	C22:6n3	9.8 (8-10)	0.0
Другие		3.8	1.3
Сумма: EPA+DPA+DHA		11.1 (10-12)	0.0
Всего Омега 3		35.7	10.4
Всего Омега 6		8.4	11.3
ω3/ω6		4.3	0.9
Всего насыщенных		7.7	6.7
Всего		44.5	68.9
мононенасыщенных			
Всего		44.1	23.5
полиненасыщенных			

Семена, собранные в результате экспериментального культивирования NS-B50027-4, измельчали, и масло получали посредством холодного отжима. Семена, собранные от родительской изогенной линии, AV Jade, обрабатывали аналогичным образом, и состав каждого масла сравнивали, как показано в табл. 16.

Таблица 16

NS-B50027-4 Состав масла

Компонент (единицы)	NS-B50027-4	AV Jade
Насыщенные TAG (%)		
C4:0 Масляная	< 0.1	< 0.1
C6:0 Капроновая	< 0.1	< 0.1
C8:0 Каприловая	< 0.1	< 0.1
C10:0 Каприновая	< 0.1	< 0.1
C12:0 Лауриновая	< 0.1	< 0.1
C14:0 Миристиновая	< 0.1	< 0.1
C15:0 Пентадекановая	< 0.1	< 0.1
C16:0 Пальмитиновая	4.3	3.9
C17:0 Маргариновая	< 0.1	< 0.1
C18:0 Стеариновая	2.9	2.5
C20:0 Арахидоновая	0.8	0.5
C22:0 Бегеновая	0.4	0.2
C24:0 Лигноцериновая	0.1	0.1
Все насыщенных	8.7	7.3
Мононенасыщенные TAG (%)		
C14:1 Миристолеиновая	<0.1	<0.1
C16:1 Пальмитолеиновая	0.2	0.1
C17:1 Гептадеценовая	<0.1	<0.1
C18:1 Олеиновая	44.9	58.8
C20:1 Эйкозеновая	1.3	1.0
C22:1 Докозеновая	<0.1	<0.1
C24:1 Нервоновая	<0.1	<0.1
PUFA TAG (%)		
C18:2ω6 Линоленовая	7.6	18.9
C18:3ω6 гамма-Линоленовая	0.5	<0.1
C18:3ω3 альфа-Линоленовая	20.9	10.5
C20:2ω6 Эйкозодиеновая	<0.1	<0.1
C20:3ω6 Эйкозатриеновая	<0.1	<0.1
C20:3ω3 Эйкозатриеновая	0.6	<0.1
C20:4ω6 Арахидоновая	<0.1	<0.1
C20:5ω3 Эйкозапентаеновая	0.4	<0.1
C22:2ω6 Докозодиеновая	<0.1	<0.1
C22:4ω6 Докозатетраеновая	<0.1	<0.1
C22:5ω3 Докозапентаеновая	1.0	<0.1
C22:6ω3 Докозагексаеновая	9.4	0.2
Всего PUFA (%)	40.6	29.9
Всего моно транс-жирных кислот	0.1	0.2
Всего поли транс-жирных кислот	0.8	0.2
Соотношение P : M : S	4.7 : 5.4 : 1	4.1 : 8.2 : 1
PUFA (%)		
Омега 3 жирные кислоты	32.3	10.9
Омега 6 жирные кислоты	8.2	19.0
ω3:ω6	3.94	0.57
Витамины		
бета-Каротин (мкг/100г)	110	82
альфа-токоферол (мг/100г)	19	15
бета-токоферол (мг/100г)	<0.1	<0.1
дельта-токоферол (мг/100г)	0.6	0.8
гамма-токоферол (мг/100г)	43	42
Астаксантин (мг/кг)	<0.05	<0.05
Витамин K1 (мкг/100г)	17	15
Фитостерины (мг/100г)		
Холестерин	<5.0	<5.0
Брассикастерин	29	67
Кампестерин	250	170
Кампестанол	<5.0	<5.0
Стигмастерин	<5.0	<5.0
бета-Ситостерин	370	320
бета-Ситостанол	34	27
Всего фитостеринов	690	600

В соответствии с Будапештским договором о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры (1977 г.) заявители депонировали по меньшей мере 2500 семян Канолы NS-B50027-4 в Американской коллекции типовых культур (ATCC®), Manassas, VA., 20110-2209, США, 9 июня 2016 г. под номером доступа РТА-123186. Во время рассмотрения данной заявки доступ к изобретению может быть предоставлен Уполномоченному Бюро по патентам и товарным знакам США по запросу; все ограничения на доступ для общественности безвозвратно отменяются при выдаче патен-

та; депозит линии NS-B50027-4 будет храниться в депозитарии ATCC®, который является публичным депозитарием, в течение 30 или 5 лет после самого последнего запроса на семена или в течение срока действия патента, в зависимости от того, какой срок является более длинным; и семена будут заменены на жизнеспособные, если депонированные семена станут нежизнеспособными за этот период. Жизнеспособность семян тестировали на момент внесения. В Приложении А указана дата депонирования, номер доступа и подтверждение жизнеспособности. Заявители выполнили все требования 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809. Заявители не накладывают никаких ограничений на доступность депонированного материала от ATCC®; однако Заявитель не имеет права отменять какие-либо ограничения, установленные законом в отношении передачи биологического материала или его транспортировки в торговле. Заявитель не отказывается от каких-либо нарушений своих прав, предоставляемых патентом, выданным по этой заявке, или Законом об охране сортов растений (7 U.S.C. § 2321 et seq.).

Хотя вышеизложенные варианты осуществления описаны подробно путем иллюстрации и примеров для ясности и понимания, для специалиста в данной области очевидно, что определенные изменения и модификации, такие как единичные генные модификации и мутации, соматоклональные варианты, варианты индивидов, выбранных из больших популяций растений данной инбредной линии и т.п., могут быть осуществлены в пределах объема изобретения, которое ограничено исключительно прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ *in vitro* детекции присутствия трансгенного локуса в образце, содержащем ДНК растения, при этом указанный способ включает

(а) приведение в контакт указанного образца с

по меньшей мере одной первой парой праймеров, которая связывается с первой фланкирующей трансген областью соединения указанного трансгенного локуса, при этом указанный по меньшей мере один первый праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 17-31 и SEQ ID NO: 83-86, последовательности которых нацелены на расположенную выше область соединения трансгенного локуса хромосомы A02; или

по меньшей мере одной второй парой праймеров, которая связывается со второй фланкирующей трансген областью соединения указанного трансгенного локуса, при этом указанный по меньшей мере один второй праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 32-41, последовательности которых нацелены на расположенную ниже область соединения трансгенного локуса хромосомы A02; или

по меньшей мере десятью смежными нуклеотидами любого из указанных праймеров или их комплементами;

(b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и

(c) оценку ампликонов, генерированных между указанными праймерами,

причем указанные генерированные ампликоны идентифицируют трансгенный locus хромосомы A02 растения канолы, полученного из NS-B50027-4, или его части, причем репрезентативное семя указанной инбредной линии канолы NS-B50027-4 депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186.

2. Способ *in vitro* по п.1, причем указанный способ представляет собой анализ генотипирования на основании конкурентной аллель-специфической ПЦР.

3. Способ *in vitro* по п.1, в котором указанный трансгенный locus хромосомы A02 содержит одну копию каждого гена из *M. pusilla* Δ6-десатуразы, *P. cordata* Δ5-элонгазы, *P. salina* Δ5-десатуразы и *P. pastoris* Δ15/ω3-десатуразы, причем указанный трансгенный locus расположен в хромосоме A02.

4. Способ *in vitro* по п.1, дополнительно содержащий стадию приведения в контакт указанного образца с по меньшей мере одним третьим праймером, который связывается с трансгенной последовательностью для генерирования ампликона, который идентифицирует трансгенный locus хромосомы A02, причем указанный по меньшей мере один третий праймер выбран из группы праймеров, состоящей из тех, что приведены в SEQ ID NO: 1-8, последовательности которых нацелены на гены *M. pusilla* Δ6-десатуразы, *P. cordata* Δ5-элонгазы, *P. salina* Δ5-десатуразы и *P. pastoris* Δ15/ω3-десатуразы, или их по меньшей мере десяти последовательных нуклеотидов, или их комплементов.

5. Способ детекции присутствия ДНК соответствующего сегреганта A02 объекта Brassica NS-B50027-4 в образце, содержащем ДНК растения, включающий следующие стадии:

(а) приведение в контакт указанного образца с парой праймеров, которая при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из сегреганта A02 объекта Brassica NS-B50027-4 продуцирует ампликон, который является диагностическим для сегреганта A02 объекта Brassica, причем указанная пара праймеров выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-41 и SEQ ID NO: 83-86, последовательности которых нацелены на расположенную выше область соединения трансгенного локуса хромосомы A02;

(b) осуществление реакции амплификации нуклеиновой кислоты с продуцированием тем самым ампликона; и

(с) детекция ампликона, причем детектируемый ампликон идентифицирует фланкирующую трансгенный locus хромосомы A02 область соединения сегреганта A02, которая является диагностической для объекта Brassica NS-B50027-4, типичное семя которого было депонировано в ATCC под номером доступа PTA-123186.

6. Способ по п.5, причем указанный способ представляет собой анализ генотипирования на основании конкурентной аллель-специфической ПЦР.

7. Способ по п.5, дополнительно включающий на стадии (а) приведение указанного образца в контакт с парой праймеров, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-8, с генерированием ампликона, который идентифицирует сегрегант A02.

8. Сегрегант, полученный из трансгенного сорта канолы NS-B50027-4, депонированного под номером доступа ATCC PTA-123186, содержащей фланкирующие трансгенный locus хромосомы A02 NS-B50027 области соединения, идентифицированный в способе *in vitro* по любому из пп.1-7.

9. Способ увеличения продукции длинноцепочечной полиненасыщенной жирной кислоты (LC PUFA) в Brassica, которое продуцирует LC-PUFA, включающий стадии

(а) сегрегации генома NS-B50027-4 с получением сегреганта, содержащего указанный locus NS-B50027-4 A02; и

(b) интрогрессии сегреганта с реципиентным Brassica, которое содержит гены биосинтеза LC-PUFA, с получением интрогрессированного потомства Brassica, содержащего гены биосинтеза реципиентной LC-PUFA и locus NS-B50027-4 A02,

при этом указанное интрогрессированное потомство Brassica продуцирует повышенное количество LC-PUFA, и

причем указанное интрогрессированное потомство Brassica идентифицировано способом по п.1.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что LC-PUFA представляет собой по меньшей мере одну из эйкозапентаеновой кислоты (EPA), докозапентаеновой кислоты (DPA) или докозагексаеновой кислоты (DHA).

11. Растение Brassica или семя Brassica, содержащие трансгенный locus A02 объекта NS B50027-4, депонированного под номером доступа ATCC PTA-123186, причем его потомство характеризуется фланкирующей трансген A02 областью соединения, содержащей SEQ ID NO: 17-41 или SEQ ID NO: 83-86.

12. Растение Brassica или семя Brassica, содержащие трансгенный locus A02 объекта NS B50027-4, депонированного под номером доступа ATCC PTA-123186, причем его потомство идентифицировано с использованием праймеров, содержащих SEQ ID NO: 17-41 или SEQ ID NO: 83-86, последовательности которых нацелены на расположенную выше область соединения трансгенного локуса хромосомы A02, или их по меньшей мере десяти последовательных нуклеотидов, или их комплементов.

13. Сегрегант инбредной линии канолы NS-B50027-4, репрезентативное семя указанной инбредной линии канолы депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186,

причем указанный сегрегант содержит в своем геноме трансгенный locus, содержащий одну копию каждого из гена *M. pusilla* $\Delta 6$ -десатуразы, *P. cordata* $\Delta 5$ -элонгазы, *P. salina* $\Delta 5$ -десатуразы и *P. pastoris* $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, и

причем указанный сегрегант характеризуется нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 1-8, и SEQ ID NO: 17-41, и SEQ ID NO: 83-86, последовательности которых нацелены на расположенную выше область соединения трансгенного локуса хромосомы A02.

14. Способ получения инбредной линии канолы, включающий

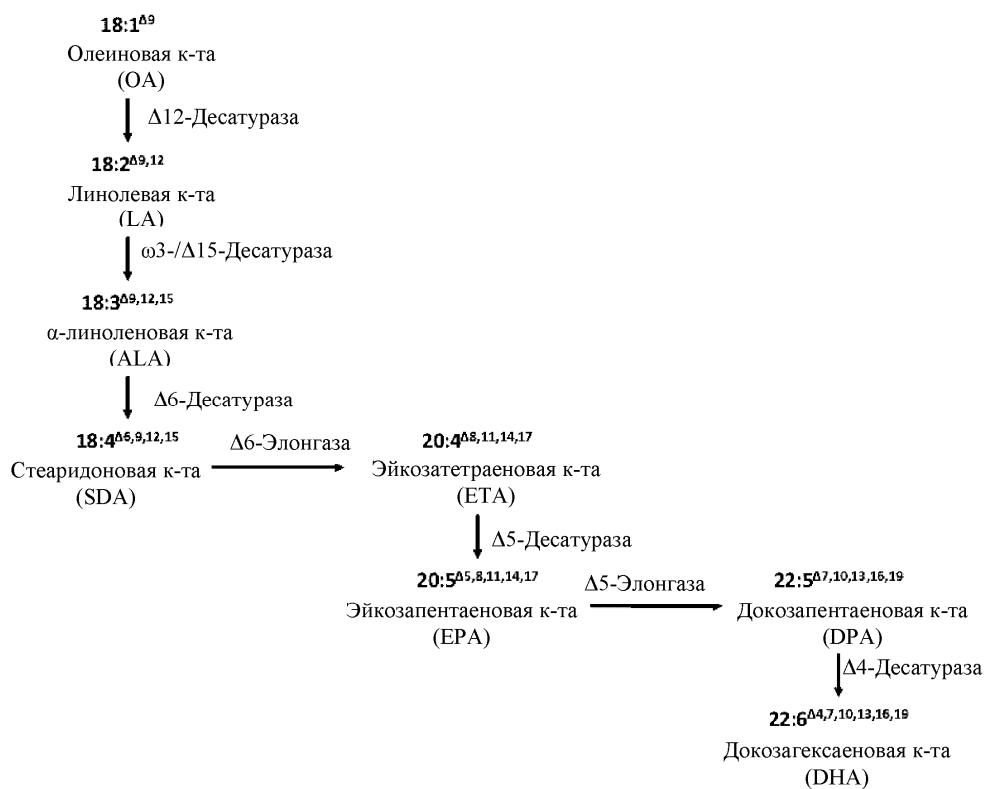
(а) получение гибридного растения путем скрещивания (i) первого сегрегантного растения, выращенного из семени инбредной линии канолы NS-B50027-4, причем репрезентативное семя указанной инбредной линии канолы депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186, причем указанный сегрегант содержит в своем геноме трансгенный locus, содержащий одну копию каждого из гена *M. pusilla* $\Delta 6$ -десатуразы, *P. cordata* $\Delta 5$ -элонгазы, *P. salina* $\Delta 5$ -десатуразы и *P. pastoris* $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, с (ii) растением второй линии канолы, причем указанное гибридное растение содержит трансгенный locus сегреганта;

(b) скрещивание указанного гибрида с растением второй линии канолы; и

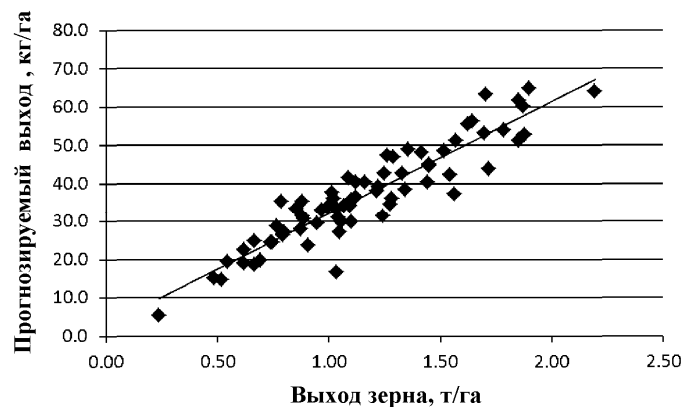
(с) повторение стадии (b) по меньшей мере один раз с получением указанной инбредной линии канолы, причем указанная инбредная линия канолы содержит по меньшей мере один из указанных трансгенных локусов,

причем полученная инбредная линия канолы характеризуется SEQ ID NO: 1-8, SEQ ID NO: 17-41 и SEQ ID NO: 83-86.

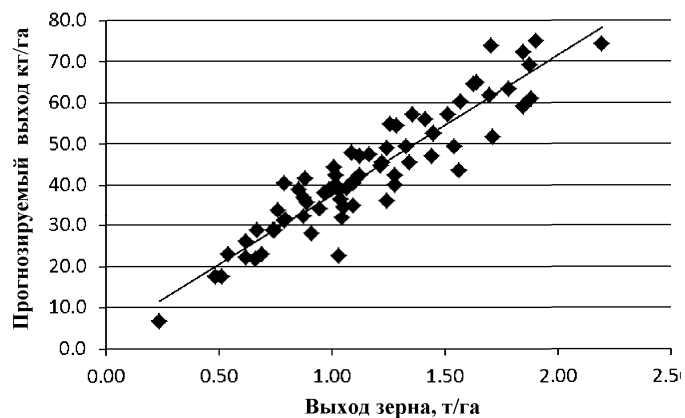
15. Инбредная линия канолы, полученная способом по п.14, причем указанная инбредная линия канолы содержит по меньшей мере один признак, выбранный из устойчивости к гербицидам, устойчивости к насекомым, устойчивости к бактериальным заболеваниям, устойчивости к грибковым заболеваниям, устойчивости к вирусным заболеваниям или стерильности.



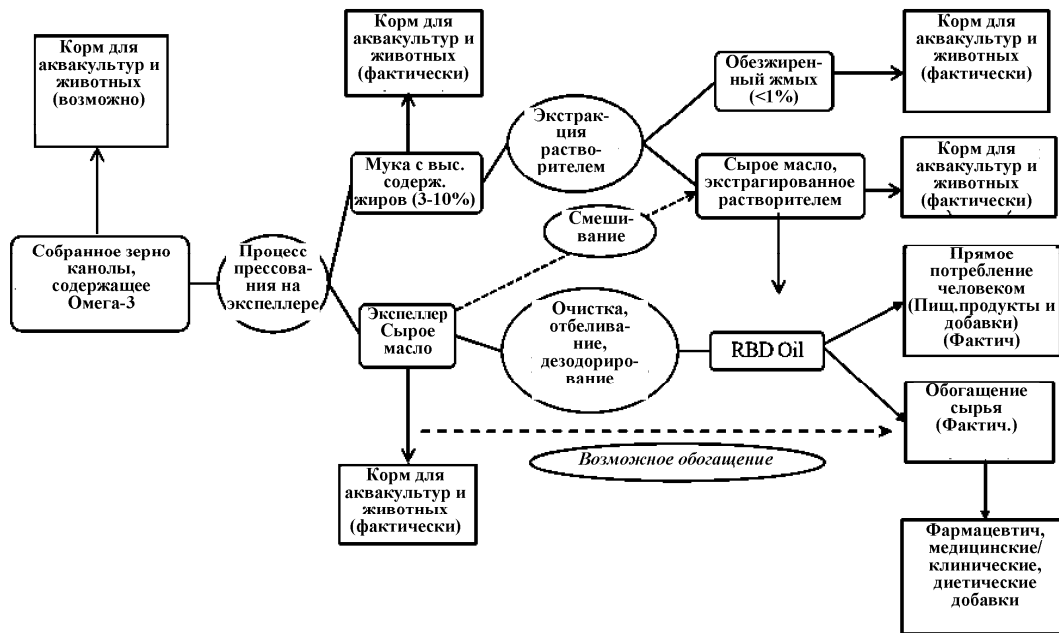
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



Фиг. 4

