

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042743**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.21

(21) Номер заявки
201892782

(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) **КАНОЛА С ЭЛИТНЫМ СОБЫТИЕМ NS-B50027-4**

(31) **62/351,246**

(32) **2016.06.16**

(33) **US**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/US2017/038047**

(87) **WO 2017/219006 2017.12.21**

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

(72) Изобретатель:
**Девайн Мальколм (СА), Леонфорте
Антонио, Гороро Нельсон, Бузза
Грег (AU), Тан Шуньсюэ (US), Петри
Джеймс, Сингх Суриндер (AU), Гао
Вэньсянь (US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) **US-A1-20150045569
US-A1-20100092640**

(57) Варианты выполнения изобретения относятся к элитному событию NS-B50027-4, семенам и маслам, полученным из NS-B50027-4, потомству, полученному из NS-B50027-4, генетическим и фенотипическим характеристикам NS-B50027-4, а также композициям и способам идентификации элитного события NS-B50027-4. В частности, NS-B50027-4 представляет собой трансгенную линию канолы, способную продуцировать по меньшей мере 5% ДНА в масле семян.

B1

042743

042743

B1

Связанная заявка

По этой заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 62/351,246, поданной 16 июня 2016 г., которая включена в настоящий документ в полном объеме для всех целей.

Список последовательностей

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

Область техники

Настоящие варианты выполнения изобретения относятся к области селекции канолы и сельскохозяйственным продуктам, конкретно к элитному событию NS-B50027-4.

Уровень техники

Канола является важной масличной культурой во многих регионах мира. Композиция жирных кислот масла канолы богата как мононенасыщенными, так и полиненасыщенными жирными кислотами, включая омега-3 с короткой цепью, но не содержит жирных кислот омега-3 с длинной цепью. Длинноцепочечные жирные кислоты омега-3 (LC- ω 3) доказали свою полезность для здоровья, но в настоящее время жирные кислоты LC- ω 3 получают главным образом непосредственно из водорослей или из морских рыб, питающихся водорослями. Признание пищевых жирных кислот LC- ω 3, особенно докозагексаеновой кислоты (22:6 n-3; DHA) и эйкозапентаеновой кислоты (20:5 n-3; EPA), способствовало резкому увеличению спроса на годный к потреблению рыбный жир. Таким образом, существует потребность в альтернативных, прямых источниках LC- ω 3 жирных кислот для потребления человеком. Кроме того, поскольку выращенная на ферме рыба, такая как атлантический лосось, накапливает жирные кислоты пропорционально пищевым жирным кислотам, необходимо поддерживать количество полиненасыщенных жирных кислот LC (LC-PUFA) в корме для рыб и, в свою очередь, обеспечивать присутствие этих жирных кислот в выращиваемой рыбе. Соответственно существует потребность в источниках, богатых LC-PUFA, которые можно применять в аквакультуре. Например, существует потребность в каноле, которая может продуцировать LC-PUFA, в частности LC- ω 3 жирные кислоты, такие как DHA, для применения в аквакультуре, а также для непосредственного употребления в пищу человеком. Тем не менее несмотря на достижения в области селекции растений и манипулирования с помощью молекулярной генетики, не существует коммерческих источников масла канолы, которое содержало бы LC-PUFA в количествах, близких к тем, которые вырабатываются у диких рыб. Кроме того, культивар канолы (не гибрид F1) должен быть гомогенным, гомозиготным и воспроизводимым, для того чтобы его можно было использовать для производства товарной культуры на надежной основе. Следовательно, остается потребность в линии канолы, которую можно выращивать как устойчивую культуру, семена которой обеспечивают коммерчески жизнеспособные количества LC- ω 3 жирных кислот, таких как DHA.

Сущность изобретения

Варианты выполнения изобретения, описанные в настоящем документе, обеспечивают инбредную рекомбинантную линию канолы, обозначенную NS-B50027-4, семена которой содержат выгодные уровни жирных кислот ω 3 и LC- ω 3, таким образом обеспечивая возобновляемую наземную систему для получения этих ценных масел. Репрезентативный образец семян канолы инбредной линии NS-B50027-4 был депонирован в соответствии с Будапештским Договором в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC®) (Manassas, VA) 9 июня 2016 г., и ему присвоен номер доступа РТА-123186 (см. приложение А). В настоящем документе также описаны клетки, ткани, семена и масло канолы инбредной линии NS-B50027-4. Комбинация отбора и селекции с трансгенными манипуляциями позволяет вариации у видов, где эта вариация не существует. Например, профиль жирных кислот канолы линии NS-B50027-4, описанной в настоящем документе, не существует у нативного *B. napus*; и признаки, описанные в настоящем документе, в частности предпочтительная черта продуцирования DHA, были разработаны при значительном техническом вмешательстве человека.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к семенам канолы (*Brassica napus* L.) линии NS-B50027-4, генетически модифицированной каноле культивара AV Jade, которую отобрали и вывели в стабильную, однородную линию скрещивания, которая накапливает в своих семенах высокую долю (процент) ω 3 и LC- ω 3 жирных кислот по отношению к общему содержанию жирных кислот. Инбредная линия NS-B50027-4 была разработана для получения растений канолы, которые производят семена, содержащие LC- ω 3 жирные кислоты, в частности DHA, на уровнях, приближающихся к тем, которые обнаружены в маслах некоторых диких рыб. Пищевое масло, полученное из NS-B50027-4, имеет значительно более высокое содержание DHA, чем другие растения *B. napus*. Новая однородная линия скрещивания NS-B50027-4 была разработана путем генетической трансформации с последующим тщательным отбором и селекцией по признаку высокой DHA в стабильной, высокоурожайной, морфологически подходящей линии канолы.

Соответственно по меньшей мере один вариант выполнения изобретения, описанный в настоящем документе, относится к семенам канолы инбредной линии NS-B50027-4; к растениям, выращенным из семян канолы инбредной линии NS-B50027-4, и их частям, таким как пыльца, яйцеклетка или семя; и к способам получения семени из растения канолы путем культивирования канолы инбредной линии

NS-B50027-4 или путем скрещивания канолы инбредной линии NS-B50027-4 с самой собой, или с другой линией канолы, или с линией Brassica с получением семени из культивируемого потомства.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к семени из популяции растений канолы, полученной описанным в настоящем документе способом, причем указанная популяция получает в среднем от 10 до 100% своих аллелей из канолы линии NS-B50027-4. Аналогичным образом настоящие варианты выполнения изобретения предусматривают применение канолы линии NS-B50027-4, подлинной NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинной, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением канолы или Brassica, для селекции или для выращивания растений для производства семян, масла, шрота или белка.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к семени масличного рапсового растения, такого как растение Brassica napus, содержащего в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к растению, такому как растение B. napus, содержащего в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к клетке масличного рапсового растения, такого как растение B. napus, содержащего в своем геноме по меньшей мере часть генома инбредной линии NS-B50027-4. В другом варианте выполнения изобретение относится к геномной ДНК масличного рапсового растения, такого как растение B. napus, содержащего по меньшей мере часть генома линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения дополнительно относится к семенам, клеткам, тканям, культурам тканей, потомству и потомкам растения, содержащего по меньшей мере часть генома NS-B50027-4, выращенного из семян, депонированных в АТСС®, имеющим номер доступа РТА-123186. Другой вариант выполнения изобретения дополнительно относится к растениям, которые можно получить из (например, путем размножения или скрещивания) растения канолы, содержащего по меньшей мере часть генома NS-B50027-4 (такого как растение, выращенное из семени, депонированного в АТСС®, имеющего номер доступа РТА-123186).

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к семени масличного рапсового растения, такого как растение B. napus, содержащего в своем геноме элитное событие линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к растению, такому как растение B. napus, содержащему в своем геноме элитное событие инбредной линии NS-B50027-4. Другой вариант выполнения изобретения относится к геномной ДНК масличного рапсового растения, такого как растение B. napus, содержащего элитное событие линии NS-B50027-4. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения дополнительно относится к семенам, клеткам, тканям, потомству и потомкам растения, содержащего элитное событие NS-B50027-4, выращенного из семени, депонированного в АТСС®, имеющего номер доступа РТА-123186. Другой вариант выполнения изобретения дополнительно относится к растениям, получаемым из (например, путем размножения или скрещивания) растения канолы, содержащего элитное событие (например, растение, выращенное из семени, депонированного в АТСС®, имеющего номер доступа РТА-123186). Варианты выполнения изобретения также относятся к растениям канолы, содержащим элитное событие NS-B50027-4.

Референсное семя инбредной линии NS-B50027-4 настоящих вариантов выполнения изобретения депонировано в АТСС® с номером доступа РТА-123186. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к семени NS-B50027-4, депонированному с номером доступа РТА-123186, которое вырастает в растение канолы, семена которого при обычном сборе 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, около 17% ДНА включительно или более ДНА, в мас.% от общего количества жирных кислот в семени.

По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения семя АТСС® с номером доступа РТА-123186 представляет собой партию семян, состоящую из по меньшей мере около 95% инбредных трансгенных семян, имеющих трансгены элитного события NS-B50027-4, которые вырастают в растение канолы, семя которого содержит 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, около 17% ДНА включительно или более ДНА, в мас.% от общего количества жирных кислот в семени. Семя депозита АТСС® с номером доступа РТА-123186 представляет собой партию семян, состоящую из по меньшей мере около 95% трансгенных семян, гомозиготных по трансгенной ДНК, содержащих элитное событие NS-B50027-4, которые вырастают в растение канолы, семя которого содержит 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% 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, около 21% LC-PUFA включительно или более LC-PUFA в виде суммы EPA, DPA и ДНА, в мас.% от общего количества жирных кислот в семени.

В другом варианте выполнения изобретения семя или семена потомства, получаемые или полученные из депонированного семени (например, после скрещивания с растением канолы или Brassica с таким

же или другим генетическим фоном), можно высевать и выращиваемые растения могут иметь по существу тот же фенотип, что и NS-B50027-4. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения при обычном сборе содержание жирных кислот в семени 4-потомства NS B50027 включает по меньшей мере 5% DHA, около 6%, 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 17% DHA, около 18% DHA, около 19% DHA, около 20% DHA, около 21% DHA, около 22% DHA, около 23% DHA, около 24% DHA включительно или более DHA, в мас.% от общего количества жирных кислот в семени. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения при обычном сборе содержание жирных кислот в семени потомства NS-B50027-4 включает 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% 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, 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.

Семя NS B50027-4 также содержит значительно больше $\omega 3$ ALA, чем обычные сорта канолы. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения при обычном сборе содержание жирных кислот в семени потомства NS-B50027-4 содержит по меньшей мере 15% ALA, около 16% 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 включительно или более ALA, в мас.% от общего количества жирных кислот в семени.

Другой аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к маслу с предпочтительными уровнями $\omega 3$ жирной кислоты и LC- $\omega 3$ жирной кислоты, в котором содержание жирных кислот включает более высокое соотношение $\omega 3:\omega 6$ жирной кислоты, чем масло обычной канолы. Например, AV Jade не имеет EPA/DPA/DHA($\omega 3$) по сравнению с LA ($\omega 6$); в одном варианте выполнения изобретения масло семян из NS-B50027-4 имеет соотношение EPA/DPA/DHA($\omega 3$):LA ($\omega 6$) от около 1 до около 7, например около 1,25. Соотношение $\omega 3:\omega 6$ жирной кислоты из NS-B50027-4 особенно предпочтительно в отношении пальмитиновой кислоты. Масло из родительской линии AV Jade не содержит DHA и, следовательно, не имеет соотношения DHA:пальмитат; масло из NS-B50027-4 имеет соотношение DHA:пальмитат, например, около 2,12; для сравнения масло из выращенного на ферме лосося имеет соотношение DHA:пальмитат 0,59; и масло из дикого лосося имеет зарегистрированное соотношение DHA:пальмитат 1,02. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения соотношение $\omega 3:\omega 6$ жирной кислоты в масле семян NS-B50027-4 составляет от около 3 до около 7, такое как соотношение около 6.

В другом аспекте настоящих вариантов выполнения изобретения масло, липид, $\omega 3$ -FA, LC-PUFA или DHA из семени инбредной линии NS-B50027-4 применяют в качестве пищевого продукта или в пищевом продукте (пищевой или съедобный материал, включая напитки) или в качестве нутрицевтических добавок (пищевых добавок) для людей или животных. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения масло, липид, $\omega 3$ -FA, LC-PUFA или DHA из семени NS-B50027-4 применяют для добавления в корм или в качестве кормовой добавки для использования в аквакультуре. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения, масло, липид, $\omega 3$ -FA, LC-PUFA, или DHA из семени с событием NS-B50027-4 применяют в качестве фармацевтической композиции или в фармацевтической композиции. По меньшей мере в одном другом варианте выполнения изобретения шрот или белок из семян, полученный концентрированным из семени NS-B50027-4 или его потомства, находится в виде пищевого продукта или в пищевом продукте (пищевой или съедобный материал) или в нутрицевтических добавках (пищевых добавках) для людей или животных. В конкретных вариантах выполнения изобретения масло, липиды, шрот или белки из семени NS-B50027-4 или его потомства применяются в качестве корма для аквакультуры.

Аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к способу увеличения LC-PUFA в растении путем предоставления (например, путем генетической трансформации или скрещивания) растения с множественными копиями генетических конструкций, экспрессирующих некоторые ферменты "переднего конца" биосинтетического пути LC-PUFA. Например, хотя не все ферменты из $\Delta 6$ -десатуразы, $\Delta 5$ -десатуразы, $\Delta 5$ -элонгазы и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы могут рассматриваться исключительно как ферменты переднего конца, в конкретных вариантах выполнения изобретения эти гены собраны в искусственный локус, который усиливает продукцию LC-PUFA, такого как DHA, в растении, которое продуцирует LC-PUFA. В конкретных вариантах выполнения изобретения искусственный локус, содержащий некоторые гены переднего конца, содержит $\Delta 6$ -десатуразу, полученную из *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазу, полученную из *Rugamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразу, полученную из *Pavlova salina* и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу, полученную из *Pichia pastoris*.

Аспект описанных вариантов выполнения изобретения относится к новой линии скрещивания канолы, обозначенной NS-B50027-4, и масличному рапсовому растению, такому как *Brassica napus* L., со-

держателю в своем ядерном геноме элитное событие NS-B50027-4. Растения Brassica, содержащие генетическое событие линии NS-B50027-4, способны к семенной специфической продукции жирных кислот, которые содержат больше ненасыщенных, более длинных цепей, чем жирные кислоты, продуцируемые в обычных растениях каноло. Инбредная линия NS-B50027-4 растений каноло обладает другими агрономическими характеристиками, которые по существу эквивалентны нетрансгенным изогенным линиям растения каноло; но такие признаки отличаются от других линий так, чтобы обеспечить независимую линию или культивар. Репрезентативный образец семян канолы инбредной линии NS-B50027-4 был депонирован в АТСС®, номер доступа РТА-123186.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к трансгенным семенам канолы, растениям или частям растения, их тканям или клеткам, имеющим стабильно интегрированную в геном по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии, содержащую шестнадцать гетерологичных генов, причем трансгены оптимизированы по кодонам для экспрессии растений и кодируют $\Delta 4$ -десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -элонгазу, полученную из *Ryamimonas cordata*, $\Delta 6$ -десатуразу, полученную из *Micromonas pusilla*, $\Delta 6$ -элонгазу, полученную из *Ryamimonas cordata*, $\Delta 12$ -десатуразу, полученную из *Lachancea kluyveri*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу, полученную из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один участок прикрепления к матриксу (MAR), полученный из *Nicotiana tabacum*, и селективируемый маркерный ген; и по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии четырех гетерологичных генов, причем трансгены оптимизированы по кодонам для экспрессии растений и кодируют трансгены $\Delta 6$ -десатуразу, полученную из *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазу, полученную из *Ryamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу, полученную из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один MAR, полученный из *Nicotiana tabacum*. Инбредная трансгенная линия NS-B50027-4 иллюстрирует этот вариант выполнения изобретения, и репрезентативный образец семян с этими гетерологичными генами был депонирован в АТСС®, номер доступа РТА-123186.

Другой аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к выделенной или очищенной геномной ДНК, полученной из инбредной линии NS-B50027-4 канолы или растений каноло, содержащих элитное событие линии NS-B50027-4, семена которых были депонированы как АТСС с номером доступа РТА-123186. Такую геномную ДНК можно использовать, например, в качестве референсного контрольного материала для описанных в настоящем документе анализов по идентификации. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к геному *Brassica napus* L., имеющему делецию в 3' UTR гена HPP, расположенного в chrUn_random референсного генома *B. napus* (2n=AACC, van Darmog) в положении 118589903-118591677 и в хромосоме A02 референсного генома *B. гара* (2n=AA, van Chiifu) в положении 18569298-18571066, где делеция представляет собой GTAGCACGACAAGTT (SEQ ID NO: 38). Делеция 15-bp расположена в chrUnrandom референсного генома *B. napus* в положении 118589927-118589941 и на хромосоме A02 референсного генома *B. гара* в положении 18569316-18569330. По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к растению *Brassica napus* L., имеющему делецию во втором экзоне гена, кодирующего Pto-взаимодействующий белок (PTI), расположенном на хромосоме A05 референсного (var. Darmog) генома *B. napus* в положении 17267746-17270700, делеция которого нарушает экспрессию PTI, где делеция представляет собой CACGGTGGAGGTCAC-CATGT (SEQ ID NO: 39). Эти делеции являются характеристикой генома инбредной линии NS-B50027-4 канолы и могут быть использованы для идентификации линии NS-B50027-4 и потомства, полученного из линии NS-B50027-4.

Соответственно настоящие варианты выполнения изобретения дополнительно относятся к способам идентификации трансгенного растения или его клеток или тканей, содержащих трансгенный аспект (элитное событие) инбредной линии NS-B50027-4 канолы, причем этот способ основан на идентификации присутствия характеризующих молекулы ДНК как имеющих конкретные нуклеотидные последовательности или кодирующих конкретные аминокислоты. Например, такие характеризующие молекулы ДНК содержат последовательности из 15 пар оснований (п.о.), по меньшей мере 15 п.о., 20 п.о., по меньшей мере 20 п.о., по меньшей мере 24 п.о., по меньшей мере 30 п.о. или более чем 30 п.о., которые содержат сайт границы вставки события, т.е. как часть вставленной чужеродной ДНК, содержащей гены синтеза жирных кислот LC- $\omega 3$ или ("гены", включающие регуляторные последовательности для экспрессии и т.д.), так и часть генома канолы или Brassica (фланкирующие области либо 5', либо 3' для каждой вставки), смежный с ними, что позволяет точно идентифицировать элитное событие. Например, граничные последовательности 5' конца вставки четырех генов в хромосоме A02 NS-B50027-4 содержат SEQ ID NO: 43; граничные последовательности 3' конца вставки четырех генов в хромосоме A02 содержат SEQ ID NO: 44; граничные последовательности 5' конца вставки шестнадцати генов в хромосоме A05 NS-B50027-4 содержат SEQ ID NO: 45; и граничные последовательности 3' конца вставки шестнадцати генов в хромосоме A05 содержат SEQ ID NO: 46. Варианты выполнения изобретения также относятся к растениям, содержащим элитное событие инбредной линии NS-B50027-4 канолы, идентифицированные такими способами.

Другой аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к молекулам нуклеиновой

кислоты (например, полинуклеотидам или ДНК), содержащим сайт вставки элитного события NS-B50027-4 и достаточную длину полинуклеотидов как геномной ДНК канолы, так и трансгенной ДНК, такие, чтобы быть полезными для обнаружения элитного события инбредной линии NS-B50027-4 и характеристики растений, содержащих элитное событие NS-B50027-4 или относящихся к инбредной линии NS-B50027-4. Такие молекулы могут содержать, например, по меньшей мере девять нуклеотидов геномной ДНК канолы и аналогичное количество нуклеотидов трансгенной ДНК на каждой стороне граничного сайта соответственно. Например, такие молекулы ДНК содержат по меньшей мере девять нуклеотидов геномной ДНК канолы и такое же количество нуклеотидов трансгенной (чужеродной) ДНК, содержащей генетические области, смежные с сайтом вставки в SEQ ID NO: 40 (например, нуклеотиды с 2081 по 2098 и нуклеотиды с 14193 по 14210), SEQ ID NO: 41 (например, нуклеотиды с 1151 по 1168 и нуклеотиды с 47765 по 47782). В одном аспекте изобретение относится к растениям канолы, содержащим такие специфические молекулы нуклеиновой кислоты.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к трансгенным семенам Brassica или канолы или к клеткам растений, растениям, частям растений или их тканям, имеющим стабильную интеграцию в геном по меньшей мере одной трансгенной вставки, содержащей кассету(ы) экспрессии, содержащую(ие) шестнадцать гетерологичных генов, причем трансгены являются растительными оптимизированными по кодонам $\Delta 6$ -десатуразой, полученной из *Micromonas pusilla*, $\Delta 6$ -элонгазой, $\Delta 5$ -элонгазой, полученной из *Ryamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразой, полученной из *Pavlova salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразой, полученной из *Pichia pastoris*, $\Delta 4$ -десатуразой полученной *Pavlova salina* и $\Delta 12$ -десатуразой, полученной из *Lachancea kluyveri*, по меньшей мере одного участка прикрепления к матриксу (MAR), полученному из *Nicotiana tabacum*, и селективируемого маркерного гена; вставку из шестнадцати трансгенов, характеризующуюся нуклеотидами с 1268 по 47773 SEQ ID NO: 41; и по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету(ы) экспрессии четырех гетерологичных генов, причем гены оптимизированы по кодонам для экспрессии растений и кодируют трансгены $\Delta 6$ -десатуразу, полученную из *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазу, полученную из *Ryamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу, полученную из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один MAR, полученный из *Nicotiana tabacum*; вставку из четырех генов, характеризующуюся нуклеотидами от 2090 до 14201 SEQ ID NO: 40. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения две кассеты экспрессии расположены в двух разных хромосомах в геноме растения.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле рекомбинантной нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 или их комплементы. В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле рекомбинантной нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты в положениях с 2090 по 14201 SEQ ID NO: 40 или ее комплемент. В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле рекомбинантной нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновых кислот в положениях с 1160 по 47773 SEQ ID NO: 41 или ее комплемент. Настоящие варианты выполнения изобретения также относятся к трансгенным семенам Brassica или канолы, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты с нуклеотидами с 2090 по 14201 SEQ ID NO: 40, или ее комплемент; и семенам Brassica или канолы, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность нуклеиновой кислоты с нуклеотидами 1160-47773 SEQ ID NO: 41, или ее комплемент. В другом варианте выполнения изобретение относится к семенам или клеткам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

- (a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 2747 до нуклеотида 6250;
- (b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 6257 до нуклеотида 8414;
- (c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 8415 до нуклеотида 10374;
- (d) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 10375 до нуклеотида 11544; и
- (e) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 11545 до нуклеотида 14049;
- (f) молекулу с по меньшей мере на 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности

по отношению к нуклеотидным последовательностям (a)-(e); или

- (g) их комплементы.

Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клеткам растений, растительным материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

- (a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 1268 до нуклеотида 5317;
- (b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 5324 до нуклеотида 7481;
- (c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 7482 до нуклеотида 9443;
- (d) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 9444 до нуклеотида 10611;
- (e) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 10612 до нуклеотида 13116;

(f) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 13117 до нуклеотида 17000;
 (g) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 17001 до нуклеотида 19606;
 (h) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 19607 до нуклеотида 29773;
 (i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 20783 до нуклеотида 22987;
 (j) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 23011 до 24370;
 (k) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 42561 до нуклеотида 25920;
 (l) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 25943 до нуклеотида 29324;
 (m) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 28157 до нуклеотида 29324;
 (n) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 29324 до нуклеотида 31830;
 (p) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 31831 до нуклеотида 35816;
 (q) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 35817 до нуклеотида 38319;
 (r) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 38320 до нуклеотида 39488;
 (s) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 39489 до нуклеотида 41449;
 (t) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 41450 до нуклеотида 43607;
 (u) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 43614 до нуклеотида 47662;
 (v) молекулу с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидным последовательностям (a)-(u), (a)-(j), (k)-(u); или

(w) их комплементы.

Соответствующий вариант выполнения относится к клеткам растений, материалам или семенам, содержащим этот искусственный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

(a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 2747 до нуклеотида 4141;
 (b) нуклеотидную последовательность комплемента нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 7259 до нуклеотида 8065;

(c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 8841 до нуклеотида 10121;

(d) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 12281 до нуклеотида 13531;

(e) молекулу с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидным последовательностям (a)-(d); или

(f) их комплементы,

где искусственный локус содержит регуляторные области (например, промоторы, лидерные последовательности, терминаторы) для обеспечения экспрессии от (a) до (d), или (e), или (f).

Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клетке растений, растительным материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

(a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 1820 до нуклеотида 3208;

(b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 6326 до нуклеотида 7126;

(c) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 7908 до нуклеотида 9192;

(d) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 11352 до нуклеотида 12596;

(e) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 15216 до нуклеотида 16556;

(f) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 17619 до нуклеотида 18866;

(g) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 21895 до нуклеотида 22647;

(h) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 25943 до нуклеотида 26283;

(i) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 30066 до нуклеотида 31313;

(j) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 31831 до нуклеотида 35816;

(k) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 36335 до нуклеотида 38319;

(l) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 39749 до нуклеотида 41023;

(m) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 41805 до нуклеотида 42605;

(n) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 45724 до нуклеотида 47111;

(o) молекулу с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидным последовательностям (a)-(u), (a)-(j), (k)-(u); или

(p) их комплементы,

где искусственный локус содержит регуляторные области (например, промоторы, лидерные последовательности, терминаторы) для обеспечения экспрессии от (a) до (n), или (o), или (p).

Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клетке растений, растительным материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный генетический локус.

В одном варианте выполнения изобретения трансгена инбредной линии NS-B50027-4, как описано в настоящем документе, имеют нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 из положений нуклеотидов с 2090 по 14201 или ее комплемент или содержат молекулу по меньшей мере с 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 40 от положения нуклеотида 2090 до положения нуклеотида 14201 или ее комплемент. В

одном варианте выполнения изобретения трансгена инбредной линии NS-B50027-4, как описано в настоящем документе, имеют нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 из положений нуклеотидов от 1268 до 47662 или ее комплемент или содержат молекулу по меньшей мере с 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 41 от положения нуклеотида 1268 до положения нуклеотида 47662 или ее комплемент.

Настоящее изобретение также относится к растению Brassica или канола, клетке растения, ткани или семени, содержащим в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 из положений нуклеотидов с 2090 по 14201, или ее комплемент, или содержащую молекулу с идентичностью последовательности по меньшей мере 95, 97, 98, 99 или 99,5% с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 40 от положения нуклеотида 2090 до положения нуклеотида 14201 или ее комплемент. В другом варианте выполнения изобретения предложено растение, клетка растения, ткань или семя Brassica или канолы, содержащие в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 из положений нуклеотидов с 1268 по 47662, или ее комплемент или содержащую молекулу с по меньшей мере на 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 41 от положения нуклеотида 1268 до положения нуклеотида 47662 или ее комплемент.

Другой аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к наборам и способам для определения, является ли растение канола, или относится к инбредной линии NS-B50027-4, или является растением канола, которое содержит по меньшей мере часть генетического элитного события линии NS-B50027-4. Композиции и способ для простых и однозначных методик идентификации элитного события NS-B50027-4 в биологических образцах описаны в настоящем документе. Например, набор включает по меньшей мере один набор смысловых (прямых) и антисмысловых (обратных) праймеров, специфичных для границы хромосомной ДНК Brassica и вставленного трансгена. Например, границы ДНК, содержащие последовательности SEQ ID NO: 43 (TGGAGGTGTTCAAACACT), SEQ ID NO: 44 (ATAGTATTAGTATACAGA), SEQ ID NO: 45 (GGCTAAGGTAACACTGAT) и SEQ ID NO: 46 (CAGTGTTTGAAGGACAGA), являются новыми последовательностями ДНК элитного события NS-B50027-4 и являются диагностическими для растения канола с NS-B50027-4 и его потомства. Более конкретно, граничные последовательности в SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 представляют собой девять полинуклеотидов на каждой стороне сайта вставки фрагмента трансгенной последовательности и геномной хромосомы A02 ДНК канолы; и граничные последовательности в SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 представляют собой девять полинуклеотидов на каждой стороне сайта вставки фрагмента последовательности трансгена и генома хромосомы A05 ДНК канолы. Более длинные или более короткие полинуклеотиды могут быть выбраны из фланкирующих областей, описанных в настоящем документе.

Настоящие варианты выполнения изобретения дополнительно относятся к способам идентификации элитного события инбредной линии NS-B50027-4 канолы в биологическом образце на основе праймеров или зондов, которые специфически распознают фланкирующие области 5' или 3' вставок чужеродных ДНК, содержащих генетическое событие элитного события NS-B50027-4. Более конкретно, типичный способ включает амплификацию нуклеиновой кислоты, присутствующей в биологическом образце, с помощью полимеразной цепной реакции по меньшей мере с двумя праймерами, один из которых распознает фланкирующие области 5' или 3' Brassica вставленных чужеродных ДНК (гетерологичные или трансгенные ДНК) элитного события NS-B50027-4, другой из которых распознает последовательность в чужеродной ДНК, включающую, например, чужеродные гены десатуразы или элонгазы, для получения фрагмента ДНК от 100 до 800 п.о. Праймеры или зонды могут идентифицировать NS-B50027-4 посредством распознавания последовательности в области 5' хромосомы A02, фланкирующей вставку: SEQ ID NO: 40 из положений с 1 по 2089 (или ее комплементы) или в пределах области 3' хромосомы A02, фланкирующей вставку: SEQ ID NO: 40 из положений с 14202 по 15006 (или ее комплементы); последовательность в пределах области 5' хромосомы A05, фланкирующей вставку: SEQ ID NO: 41 из положений с 1 по 1159 (или ее комплементы), или в пределах области 3' хромосомы A05, фланкирующей вставку: SEQ ID NO: 41 из положений с 47774 по 49789 (или ее комплементы); и по меньшей мере одну последовательность в чужеродной ДНК, содержащую, например, SEQ ID NO: 40 из положения с 2090 по 14201 (или ее комплемент) или SEQ ID NO: 41 из положения с 1160 по 47773 (или ее комплемент).

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения, кроме того, относится к композициям, пригодным для анализов PCR (KASP) с конкурентными аллелями (два аллель-специфических прямых праймера, распознают SNP), капельных цифровых PCR (ddPCR) анализов, количественных PCR (qPCR) анализов, паралог-специфических анализов или анализов на тестирование случайного присутствия (AP). Конкретные варианты выполнения праймеров, пригодных для проведения анализов KASP для выявления генетических признаков NS-B50027-4, особенно пригодных в исследованиях интрогрессии и гибридного развития, включают по меньшей мере десять смежных нуклеотидов праймеров SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26,

SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 или их комплементы. Предыдущие праймеры или их комплементы 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. Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к растительному материалу, идентифицированному такими праймерами.

Например, по меньшей мере один вариант выполнения относится к паре изолированных праймеров молекул ДНК, где первый праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов от нуклеотида 1 до 235 фланкирующей геномной области 5' канолы SEQ ID NO: 47 или ее полные комплементы, и второй праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов трансгенной области от нуклеотида 236 до 470 последовательности SEQ ID NO: 47 или ее полные комплементы, где пара праймеров молекул ДНК, когда они используются вместе в реакции амплификации ДНК, продуцирует диагностический ампликон, содержащий SEQ ID NO: 43 для события NS-B50027-4 канолы или его потомства.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к композиции, содержащей пару изолированных праймеров молекул ДНК, где первый праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов от нуклеотида 1 до 235 трансгенной области SEQ ID NO: 48 или ее полных комплементов и второй праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов фланкирующей геномной области 3' ДНК канолы от нуклеотида 236 до 470 последовательности SEQ ID NO: 48 или ее полного комплемента, где пара праймеров молекул ДНК, когда они используются вместе в реакции амплификации ДНК, продуцирует диагностический ампликон, содержащий SEQ ID NO: 44 для события NS-B50027-4 канолы или его потомства.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к паре изолированных праймеров молекул ДНК, где первый праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов от нуклеотида 1 до 235 фланкирующей геномной области 5' канолы SEQ ID NO: 49 или ее полных комплементов и второй праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов трансгенной области от нуклеотида 236 до 470 SEQ ID NO: 49 или их полных комплементов, где пара праймеров молекул ДНК, когда они используются вместе в реакции амплификации ДНК, продуцирует диагностический ампликон, содержащий SEQ ID NO: 45 для события NS-B50027-4 канолы или его потомства.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к паре изолированных праймеров молекул ДНК, где первый праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов от нуклеотида 1 до 235 трансгенной области SEQ ID NO: 50 или ее полных комплементов и второй праймер содержит по меньшей мере одиннадцать смежных нуклеотидов фланкирующей геномной области 3' ДНК канолы от нуклеотида 236 до 470 SEQ ID NO: 50 или ее полных комплементов, где пара праймеров молекул ДНК, когда они используются вместе в реакции амплификации ДНК, продуцирует диагностический ампликон, содержащий SEQ ID NO: 46 для события NS-B50027-4 канолы или его потомства.

Кроме того, пары праймеров события ДНК также могут быть использованы для создания ампликоновой диагностики для события NS B50027-4. Эти пары праймеров события включают, например, AATTGTTGGAGGTGTTCAAACACT (SEQ ID NO: 51) и CGGAATCACAATCCCTGAATGATT (SEQ ID NO: 52) или их комплементы. Ампликон, продуцируемый SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, содержит около 250 полинуклеотидов. В дополнение к этим парам праймеров любая пара праймеров, полученная из SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 50, или их комплементов, которая при использовании в реакции амплификации ДНК производит ампликонную диагностику для события NS-B50027-4, является аспектом настоящих вариантов выполнения изобретения.

В другом варианте выполнения изобретение относится к по меньшей мере одному набору праймеров для одной из $\Delta 4$ -десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, $\Delta 5$ -элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, из $\Delta 6$ -десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, $\Delta 6$ -элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, $\Delta 12$ -десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*; и по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной хромосомной A02 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 2033 по 2132 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 43 п.о. вставки и 57 п.о. хромосомной A02 ДНК Brassica или по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной хромосомной A02 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 14156 по 14255 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 46 п.о. вставки и 54 п.о. хромосомной A02 ДНК Brassica; по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной хромосомной A05 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 1110 по 1209 последовательности SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., содержащая 50 п.о. вставки и 50 п.о. хромосомной A05 ДНК Brassica, или по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной хромосомной A05 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 47724 по 47823 SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., содержащая 50 п.о. вставки и 50 п.о. хромосомной A05 ДНК Brassica.

В другом варианте выполнения изобретение относится к праймерам, которые распознают последовательность в чужеродной ДНК NS-B50027-4, включающим, например, по меньшей мере один праймер ДНК Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 или их комплементы; Δ5-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 или их комплементы; Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или их комплементы; Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 или их комплементы; Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 или их комплементы; Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 или их комплементы; или Δ6-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, имеющей последовательность SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 или их комплементы. Соответственно настоящие варианты выполнения изобретения относятся к конкретным праймерам и конкретной ДНК, амплифицированной с использованием таких праймеров, и праймерам, которые могут быть получены из информации о последовательности, представленной в настоящем документе.

В соответствии со способами идентификации NS-B50027-4 и его потомства в дополнение к праймеру, который специфически распознает фланкирующую область 5' или 3' элитного события NS-B50027-4, наборы могут содержать второй праймер, который специфически распознает последовательность в чужеродной ДНК, включающий по меньшей мере одну из Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ6-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, или Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*, для применения в протоколе идентификации PCR. Наборы могут содержать по меньшей мере два специфических праймера, один из которых распознает последовательность в фланкирующей области 5' элитного события NS-B50027-4, а другой из которых распознает последовательность в чужеродной ДНК, включающих по меньшей мере одну из Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, или Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*.

Изобретение также относится к набору для идентификации элитного события NS-B50027-4 в биологических образцах, причем указанный набор содержит праймеры для PCR, содержащие или состоящие (по существу) из нуклеотидных последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 37 или их комплементов, для применения в протоколе идентификации элитного события NS-B50027-4, описанного в настоящем документе.

По меньшей мере один вариант выполнения изобретения относится к трансгенным семенам канолы, растениям или частям растения, их тканям или клеткам, имеющих стабильно интегрированную в геном по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии, содержащую шестнадцать гетерологичных генов, причем трансгены представляют собой оптимизированные по кодонам Δ6-десатуразу, полученную из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазу, полученную из *Rugamimonas cordata*, Δ5-десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразу, полученную из *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразу, полученную из *Pavlova salina*, Δ6-элонгазу, полученную из *Rugamimonas cordata*, и Δ12-десатуразу, полученную из *Lachancea kluyveri*, по меньшей мере один участок прикрепления к матриксу (MAR), полученный из *Nicotiana tabacum*, и селективируемый маркерный ген; и по меньшей мере одну трансгенную вставку, содержащую кассету экспрессии четырех гетерологичных генов, причем гены оптимизированы по кодонам для экспрессии растений и кодирования трансгенов Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, и по меньшей мере один MAR, полученный из *Nicotiana tabacum*, кассету экспрессии из четырех генов, характеризуемую как нуклеотиды с 2090 по 14201 SEQ ID NO: 40. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения две кассеты экспрессии расположены в двух разных хромосомах в геноме растения.

В другом варианте выполнения изобретение относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты по фиг. 5 (SEQ ID NO: 40) или ее комплемент. В другом варианте выполнения изобретение относится к рекомбинантной молекуле нуклеиновой кислоты, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты по фиг. 6 (SEQ ID NO: 41) или ее комплемент. В одном варианте выполнения изобретения трансгены инбредной линии NS-B50027-4, как описано в настоящем документе, имеют нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 из положений нуклеотидов с 2090 по 14201 или ее комплемент, или содержат молекулу по меньшей мере с 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 40 от положения нуклеотида 2090 до положения нуклеотида 14201 или ее комплемент. Настоящее изобретение также относится к растению канолы, клетке растения, ткани или семени, содержащим в своем геноме молекулу

нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 40 из положений нуклеотидов с 2090 по 14201, или ее комплемент, или содержащим молекулу с по меньшей мере на 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 40 из положения нуклеотида 2090 до положения нуклеотида 14201 или ее комплемента. В другом варианте выполнения изобретения трансгена инбредной линии NS-B50027-4, как описано в настоящем документе, имеют нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 из положений нуклеотидов от 1268 до 47662 или ее комплемент, или содержат молекулу по меньшей мере с 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 41 от положения нуклеотида 1268 до положения нуклеотида 47662 или ее комплемента. Изобретение также относится к растению канола, клетке растения, ткани или семени, содержащим в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41 из положений нуклеотидов с 1268 по 47662, или ее комплемент, или содержащим молекулу с по меньшей мере 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 41 от положения нуклеотида 1268 до положения нуклеотида 47662 или ее комплемента.

Другой аспект вариантов выполнения настоящего изобретения относится к наборам и способам для определения, является ли растение канола, или относится ли к инбредной линии NS-B50027-4, или содержит ли растение канола по меньшей мере часть генетического элитного события линии NS-B50027-4. В настоящем документе описаны композиции и способ для простых и однозначных методик идентификации элитного события NS-B50027-4 в биологических образцах. Например, набор включает по меньшей мере один набор смысловых (прямых) и антисмысловых (обратных) праймеров, специфичных для границы хромосомной ДНК Brassica и вставленного трансгена. Граничные последовательности SEQ ID NO: 43 (TGGAGGTGTTCAAACACT), SEQ ID NO: 44 (ATAGTATTAGTATACAGA), SEQ ID NO: 45 (GGCTAAGGTAACACTGAT) и SEQ ID NO: 46 (CAGTGTTTGAAGGACAGA) являются новыми последовательностями ДНК в событии NS-B50027-4 и являются диагностическими для растения канола с NS-B50027-4 и его потомства. Граничные последовательности в SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 представляют собой девять полинуклеотидов на каждой стороне сайта вставки фрагмента последовательности трансгена и геномной хромосомной A02 ДНК канолы; и граничные последовательности в SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 представляют собой девять полинуклеотидов на каждой стороне сайта вставки фрагмента последовательности трансгена и геномной хромосомной A05 ДНК канолы. Более длинные или более короткие полинуклеотиды могут быть выбраны из фланкирующих областей, описанных в настоящем документе.

Кроме того, пары праймеров события ДНК также могут быть использованы для создания ампликоновой диагностики для события NS B50027-4. Эти пары праймеров события включают, например, AATTGTTGGAGGTGTTCAAACACT (SEQ ID NO: 51) и CGGAATCACAATCCCTGAATGATT (SEQ ID NO: 52) или их комплементы. Ампликон, продуцируемый SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, содержит около 250 полинуклеотидов. В дополнение к этим парам праймеров любая пара праймеров, полученная из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, или SEQ ID NO: 46, или их комплементов, которые при использовании в реакции амплификации ДНК производят ампликоновую диагностику для события NS-B50027-4, является аспектом настоящего изобретения.

В другом варианте выполнения изобретение относится к по меньшей мере одному набору праймеров для одной из $\Delta 6$ -десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазы, полученной из *Rygamimonas cordata*, $\Delta 6$ -элонгазы, полученной из *Rygamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразы, полученной из морской микроводоросли *Pavlova salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Pichia pastoris*, $\Delta 4$ -десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, или $\Delta 12$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Lachancea kluyveri*; по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной хромосомной A02 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 2033 по 2132 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 43 п.о. вставки и 57 п.о. хромосомной A02 ДНК Brassica, или по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной хромосомной A02 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 14156 по 14255 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 46 п.о. вставки и 54 п.о. хромосомной A02 ДНК Brassica; по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной хромосомной A05 ДНК Brassica, такой как граница от нуклеотидов с 1110 по 1209 SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., содержащая 50 п.о. вставки и хромосомной A05 ДНК Brassica; или по меньшей мере одному набору праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной хромосомной A05 ДНК Brassica, такой как граница нуклеотидов с 47724 по 47823 SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., содержащая 50 п.о. вставки и 50 п.о. хромосомной A05 ДНК Brassica.

В дополнительном аспекте вариантов выполнения изобретения, описанных в настоящем документе, предлагаются наборы для идентификации элитного события NS-B50027-4 в биологических образцах, причем указанные наборы содержат по меньшей мере один праймер или зонд, который специфически распознает области 5' или 3' Brassica, которые фланкируют чужеродную ДНК, и по меньшей мере один праймер или зонд, который специфически распознает по меньшей мере одну ДНК-вставку

Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, которая может содержать нуклеотидную последовательность GAGCACCTTGTAGTTGAGTCC (SEQ ID NO: 57), AGTCTGAGGATGCTCCTATGC (SEQ ID NO: 58) или их комплементы; Δ5-элонгазы, полученной из *Pyramimonas cordata*, которая может содержать нуклеотидную последовательность TGCTGGAACTCTTGGATACG (SEQ ID NO: 63), CTGGGTGATGTACTTCTTCC (SEQ ID NO: 64) или их комплементы; Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, которая может содержать нуклеотидную последовательность GCTACCGATGCTTACAAGCA (SEQ ID NO: 61), TAGTGAAGTCCGTGCTTCTC (SEQ ID NO: 62) или их комплементы; Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, которая может содержать нуклеотидную последовательность GACGSTATCCCTAAGCACTGT (SEQ ID NO: 55), GTCCACTCTTGAGCATCGTA (SEQ ID NO: 56) или их комплементы; Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, которая может содержать нуклеотидную последовательность GGCTTTCAGATCTGAGCATC (SEQ ID NO: 65), CTCAGCCTTAACAAGAGGAG (SEQ ID NO: 66) или их комплементы; Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*, которая может содержать нуклеотидную последовательность TGGAGCTATCCCTCATGAGT (SEQ ID NO: 53), GATCCTAGAACAGTAGTGGTG (SEQ ID NO: 54) или их комплементы; Δ6-элонгазы, полученной из *Pyramimonas CS0140*, которая может содержать нуклеотидную последовательность TGTTGCTATGGCTCAAGAGC (SEQ ID NO: 59), CTAGCGTGGTGCTTCATGTA (SEQ ID NO: 60) или их комплементы.

Набор этого варианта выполнения изобретения может содержать в дополнение к праймеру, который специфически распознает по меньшей мере одну из фланкирующих областей 5' или 3' элитного события NS-B50027-4; и в праймере, который специфически распознает последовательность в чужеродной ДНК, включающую по меньшей мере одну из Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы, полученной из *Pyramimonas cordata*, Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ6-элонгазы, полученной из *Pyramimonas cordata*, или Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*, для применения в протоколе идентификации PCR. Набор может содержать по меньшей мере два специфических праймера, один из которых распознает последовательность в фланкирующей области 5' элитного события NS-B50027-4, а другой распознает последовательность в чужеродной ДНК, включающую по меньшей мере одну из Δ6-десатуразы, полученной из *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы, полученной из *Pyramimonas cordata*, Δ5-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы, полученной из *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ6-элонгазы, полученной из *Pyramimonas cordata*, или Δ12-десатуразы, полученной из *Lachancea kluyveri*.

Связанный аспект относится к геномной ДНК, полученной или выделяемой из растений, включающей по меньшей мере часть элитного события линии NS-B50027-4. Такая геномная ДНК может быть использована в качестве референсного контрольного материала в описанных в настоящем документе анализах идентификации.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схема (карта) кассеты для трансформации GA7-modB.

На фиг. 2 представлена плазмидная карта бинарного вектора, rJP3416.

На фиг. 3 изображена урожайность зерен в зависимости от прогнозируемой ДНА в кг/га на восьми участках культивирования. ♦ относится к ДНА, кг/га; - относится к линейной ДНА кг/га; $y=29,296x+2,8315$; $R^2 = 0,8567$.

На фиг. 4 изображена урожайность зерен в зависимости от прогнозируемой LC-PUFA (EPA, DPA и ДНА) в кг/га на восьми участках. ♦ относится к LC-PFU кг/га; - относится к линейной LC-PUFA кг/га; $y=34,043x+3,4049$; $R^2 = 0,8636$.

На фиг. 5 показана последовательность ДНК трансгенной вставки четырех генов и фланкирующие ее последовательности *B. parus* (полужирный) (SEQ ID NO: 40).

На фиг. 6 показана последовательность ДНК вставки шестнадцати генов и ее фланкирующие последовательности *B. parus* (полужирный) (SEQ ID NO: 41).

Подробное описание

Следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами и т.д., описанными в настоящем документе, и они могут варьироваться. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов выполнения изобретения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

Все указанные патенты и другие публикации включены в настоящий документ посредством ссылки с целью описания и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением, но не должны быть источником определений терминов, несовместимых с таковыми из настоящего документа. Эти публикации включены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не должно быть истолковано как признание того, что изобретатели не имеют права ссылаться на такое раскрытие в силу предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления относительно даты или представления относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителю.

лям, и не представляют собой какого-либо признания в отношении правильности дат или содержания этих документов.

Используемые в настоящем документе и в формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылку на множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Во всем этом описании, если не указано иное, "содержат", "содержит" и "содержащий" используются включительно, а не исключительно, так что указанное целое число или группа целых чисел могут включать в себя одно или несколько других неуказанных целых чисел или группы целых чисел.

Термин "или" используется включительно, если не изменен, например, на "либо". Таким образом, если контекст не указывает на иное, слово "или" означает любого одного члена конкретного списка, а также включает в себя любую комбинацию членов этого списка.

Все значения являются приблизительными, так как есть некоторые колебания в составе жирных кислот из-за условий окружающей среды. Значения, как правило, выражаются в процентах по массе общей жирной кислоты или по массе всего семени. Соответственно, кроме как в рабочих примерах или где указано иное, все числа, выражающие количества или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать, как измененные во всех случаях термином "около".

Методики рекомбинантной ДНК могут быть выполнены в соответствии со стандартными протоколами, известными в данной области. См. Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (2nd ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, NY (1989); Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS MOLEC. BIOL. (1994 и обновления); DNA CLONING: PRACTICAL APPROACH, vol. 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 настоящем документе, имеют то же значение, что и общепринятые для специалиста в данной области техники. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов выполнения изобретения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения. Для того чтобы настоящее раскрытие могло быть более легко понято, сначала даются определенные термины. Дополнительные определения излагаются по тексту подробного описания изобретения.

"Линия" представляет собой группу растений, которые демонстрируют очень незначительные общие различия среди отдельных представителей, подпадающих под это обозначение. "Линия" также относится к гомогенной совокупности растений, несущих по существу один и тот же генетический материал, который демонстрирует незначительные генетические различия или не демонстрирует их между отдельными представителями для по меньшей мере одного признака. "Сорт" или "культурвар" могут использоваться взаимозаменяемо с "линией", но в целом первые два термина относятся к линии, которая подходит для коммерческого производства. "Генетически полученный", используемый, например, во фразе "генетически полученный из родительских линий", означает, что рассматриваемая характеристика полностью или частично продиктована аспектом генетической структуры рассматриваемого растения.

Растение "Brassica" в контексте настоящего описания 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 виду, происходящему от скрещивания этих видов Brassica, такого как B. napo campestris, или от искусственного скрещивания одного из этих видов Brassica с другим видом Cruciferaeae. Пloidность относится к тому, является ли число хромосом, демонстрируемых культурваром, диплоидным или тетраплоидным. Поскольку Brassica napus является аллотетраплоидом (амфидиплоидом), что возникает в результате скрещивания и удержания обоих геномов Brassica rapa (ранее B. campestris) и B. oleracea, растение B. napus, содержащее трансгенное событие NS-B50027-4, можно использовать с методами селекции для введения события NS-B50027-4 и, таким образом, "признака" продуцирования жирных кислот LC- ω 3, как описано в настоящем документе, в другие члены рода Brassica. Соответственно примеры представителей рода Brassica, пригодные для практической реализации настоящих вариантов выполнения изобретения, включают без ограничения B. juncea, B. napobrassica, B. oleracea, B. carinata, B. napus, B. rapa и B. campestris, а также любые другие растения, принадлежащие к роду Brassica, которые позволяют скрещивание между видами Brassica. Обычно "масличное растение" относится к любому из видов B. napus, B. rapa (или campestris) или B. juncea.

Brassica napus широко известен как рапс или масличный рапс, а конкретные культурвары могут называться канола. Используемый в настоящем документе термин "канола" или "растение канола" относится к растению Brassica, которое можно использовать для производства масла канолы (т.е. масла, отвечающего определенному качественному обозначению по содержанию менее 2% эруковой кислоты), и включает разновидности Brassica napus, B. napo Brassica, B. rapa, B. juncea и B. campestris. Канола - это амфидиплоид (также называемый аллотетраплоидом), межвидовой гибрид, имеющий полный набор диплоидных хромосом от каждой родительской формы с геномом AACC.

"Канола" и "растение канола", как правило, относится к Brassica napus, но включают в себя все сор-

та растений, которые могут быть выведены с помощью канолы. "Канола" и "растение канолы" также включают части растений. "Масло канолы" должно содержать менее чем 2% эруковой кислоты; и один грамм высушенного воздухом, не содержащего масла твердого семени канолы, должен содержать менее 30 мкмоль 3-бутенилглюкозинолата, 4-пентенилглюкозинолата, 2-гидрокси-3-бутенилглюкозинолата, 2-гидрокси-4-пентенилглюкозинолата или их смеси. См., например, CODEX ALIMENTARIUS: FATS, OILS & RELATED PRODUCTS, vol. 8 (2nd ed., Food & Agriculture Org. United Nations, Rome, Italy, 2001).

"Часть растения" включает в себя клетки растений, органы растений, протопласты растений, культуры тканей клеток растений, из которых можно регенерировать растения, калли растений, клубны растений и клетки растений, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как эмбрионы, пыльца, яйцеклетки, семена, стручки, листья, цветы, ветви, плоды, стебли, корни, кончики корней, пыльники, семядоли, гипокотили, корешки, отдельные клетки, гаметы, культуры клеток, культуры тканей и т.п. Семядоля представляет собой разновидность семенного листа; маленький листок, содержащийся на зародыше растения. Семядоля содержит ткани для хранения пищи семени. Эмбрион представляет собой небольшое растение, содержащееся в зрелом семени. "Клетки растений" также включают не-регенерируемые растительные клетки. Потомство, производные, варианты и мутанты регенерированных растений также включены в объем настоящих вариантов выполнения изобретения при условии, что эти части содержат молекулы нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4. Настоящие варианты выполнения изобретения также направлены на применение трансгенов с элитным событием NS-B50027-4 в культуре клеток растений и культуре ткани. Варианты выполнения изобретения включают растения и части растений из линии с элитным событием NS-B50027-4, а также другие растения, полученные описанными способами.

"Аллель" представляет собой любую из одной или нескольких альтернативных форм гена, которые относятся к одному признаку или характеристике. В диплоидной клетке или организме два аллеля данного гена занимают соответствующие локусы на паре гомологичных хромосом.

"Локус" придает один или несколько признаков, таких как, например, метаболизм модифицированных жирных кислот, метаболизм модифицированной фитиновой кислоты, метаболизм модифицированных углеводов, мужское бесплодие, устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к болезням или метаболизм модифицированных белков. Этот признак может быть, например, обусловлен наличием встречающегося в природе гена, введенного в геном линии путем обратного скрещивания, естественной или индуцированной мутации, или трансгена, введенного с помощью методик генетической трансформации. Локус может содержать один или несколько аллелей, интегрированных в одном хромосомном месте. Локусы количественных признаков (QTL) относятся к генетическим локусам, которые контролируют по меньшей мере до некоторой степени численно представимые признаки, которые обычно непрерывно распределены.

"Событие" представляет собой искусственный генетический локус, который в результате генетических манипуляций несет чужеродную ДНК, содержащую по меньшей мере одну копию интересующих генов. Типичными аллельными состояниями события являются наличие или отсутствие чужеродной ДНК. Событие может быть фенотипически охарактеризовано экспрессией одного или нескольких трансгенов. На генетическом уровне событие является частью генетической структуры растения. На молекулярном уровне событие характеризуется рестрикционной картой (например, как определено Саузерн-блоттингом) или фланкирующими последовательностями трансгена выше или ниже, или молекулярной конфигурацией трансгена. Обычно, трансформация растительных клеток или частей растения с помощью трансформирующей ДНК приводит к множеству событий, каждое из которых уникально.

Термин "ген" относится к молекуле ДНК, обычно содержащей несколько функционально связанных областей ДНК, таких как промотор и 5' нетранслируемая область (5'UTR или 5' некодирующие последовательности), которые вместе образуют область промотора; кодирующая область (которая может кодировать или не кодировать белок); и нетранслируемая 3' область (3'UTR или 3' некодирующие последовательности), содержащая сайт полиаденилирования. Как правило, в растительных клетках области 5'UTR, кодирующая, и 3'UTR транскрибируются в молекулу РНК, которая в случае кодирующего белок гена транслируется в белок. "Кодирующая последовательность", таким образом, относится к последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, обеспечивающей кодоны, которые транслируют определенную последовательность аминокислот. Ген может содержать дополнительные области ДНК, такие как, например, интроны. "Генотип" относится к генетическому строению клетки или организма. "Генетический локус" представляет собой, как правило, положение данного гена в геноме растения.

Термин "трансген" относится к интересующему гену, который включен в геном растения. Соответственно "трансгенное растение" содержит по меньшей мере один трансген в геноме всех его клеток. Трансгены по настоящему варианту выполнения изобретения содержат по меньшей мере одну копию представляющего интерес гена, более конкретно по меньшей мере одну копию: Δ4-десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, Δ5-десатуразы, полученной из морской микроводоросли *Pavlova salina*, Δ5-элонгазы, полученной из микроводоросли *Rugamimonas cordata*, Δ6-десатуразы, полученной из микроводоросли *Micromonas pusilla*, Δ6-элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, Δ12-десатуразы из

дрожжей *Lachancea kluyveri* и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Pichia pastoris*; и по меньшей мере одну дополнительную копию $\Delta 6$ -десатуразы, полученной из микроводоросли *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазы, полученной из *Rugamimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразы, полученной из морской микроводоросли *Pavlova salina*, и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Pichia pastoris*. Трансгены расположены в бинарной форме в кассетах экспрессии, которые включают соответствующие регуляторные области. Описанные выше трансгены являются искусственными в том смысле, что они были разработаны с применением стратегии оптимизации кодонов, и, таким образом, трансгены иным образом не существуют в природе. Трансгенная кассета экспрессии может включать по меньшей мере один участок прикрепления к матриксу (MAR) из *Nicotiana tabacum*. Трансгенная кассета может также включать селективируемый маркерный ген. См. патент США № 8816111.

"Чужеродный" или "гетерологичный", когда он относится к гену или молекуле ДНК в отношении видов растений, указывает на то, что ген или молекула ДНК или их часть (например, конкретный участок) не обнаружены в этом виде растения в естественной среде или не встречаются в этом генетическом локусе у этого вида растений в естественной среде. Термин "чужеродная ДНК" также относится к молекуле ДНК, которая будет или была включена в геном растения в результате трансформации. В контексте этого раскрытия трансген, трансгенная кассета или трансгенная кассета экспрессии содержат по меньшей мере одну чужеродную или гетерологичную ДНК.

Термин "химерный", когда он относится к гену или молекуле ДНК, используется для обозначения того, что ген или молекула ДНК содержит по меньшей мере две функционально значимые области ДНК (такие как промотор, 5'UTR, кодирующая область, 3'UTR, интрон), которые не связаны друг с другом в естественной среде и имеют происхождение из разных источников, так что по меньшей мере одна область ДНК чужеродна другой области ДНК в химерной молекуле.

Термины "плазмида" и "вектор" относятся к внехромосомному элементу, часто несущему гены, которые не являются частью центрального метаболизма клетки и обычно находятся в форме кольцевых фрагментов двухцепочечной ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, интегрирующимися геном последовательностями, фаговыми или нуклеотидными последовательностями, линейными или кольцевыми одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, полученными из любого источника, в котором ряд нуклеотидных последовательностей был присоединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, которая способна вводить фрагмент промотора и последовательность ДНК для выбранного генного продукта вместе с подходящей 3' нетранслируемой последовательностью в клетку. В отношении трансгенных растений такие плазмиды или векторы могут содержать участки Т-ДНК для облегчения встраивания трансгена(ов) в геном растения.

"Кассета экспрессии" относится к генетической конструкции, содержащей трансген и имеющей элементы в дополнение к чужеродному гену, которые позволяют экспрессировать этот ген в чужеродном хозяине, и может относиться к кассете до и после вставки в геном растения. Другими словами, трансгенная вставка содержит кассету экспрессии.

"Трансформирующая ДНК" относится к молекуле рекомбинантной ДНК, используемой для трансформации, например к вектору экспрессии. Трансформирующая ДНК обычно содержит по меньшей мере один "представляющий интерес ген" (например, химерный ген), который способен придавать одну или несколько специфических характеристик трансформированному растению.

"Трансформация" относится к переносу молекулы нуклеиновой кислоты в организм хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой плазмиду, которая реплицируется автономно, например, или она может интегрироваться в геном организма хозяина. Организмы хозяина, содержащие фрагменты трансформированной нуклеиновой кислоты, называют "трансгенными", или "рекомбинантными", или "трансформированными" организмами.

Термин "молекула рекомбинантной ДНК" используется для иллюстрации и, таким образом, может включать в себя выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, которая может быть ДНК и которая может быть получена с помощью рекомбинантных или других процедур, таких как синтез синтетической ДНК или PCR. PCR (полимеразная цепная реакция) представляет собой реакцию, в которой реплицированные копии полинуклеотида-мишени создаются с использованием праймеров, состоящих из "восходящего" и "нисходящего" праймеров, и катализатора полимеризации, такого как ДНК-полимераза, и обычно термически стабильного фермента полимеразы. Способы PCR известны в данной области техники. См., например, PCR (McPherson & Moller, eds., BIOS Sci. Publ. Ltd., Oxford, 2000). PCR можно проводить на геномной ДНК или кДНК.

"Вставка ДНК" относится к гетерологичной ДНК, введенной в растительный материал посредством процесса трансформации, и включает ДНК, которая отличается от исходной ДНК, использованной для такой трансформации, как объяснено в настоящем документе. Вставка ДНК обычно представляет собой трансгенную кассету экспрессии. "Вставка нуклеиновой кислоты элитного события NS-B50027-4" и "вставка ДНК события "NS-B50027-4" относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, характеризующейся как состоящая из последовательности нуклеотидов с 2090 по 14201 SEQ ID NO: 1 или ее комплементам; и

молекуле нуклеиновой кислоты, характеризующейся тем, что она содержит последовательность нуклеотидов в положениях с 987 по 1894 SEQ ID NO: 2 или с 1 по 910 SEQ ID NO: 3 или их комплементарам.

"Подходящие регуляторные последовательности" относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (например, 5'UTR), внутри или ниже (3'UTR) кодирующей последовательности, которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК или стабильность либо трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, энхансерные элементы, лидерные трансляционные последовательности, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффектора и структуры "петля-на-стебле".

"Промотор" относится к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Как правило, кодирующая последовательность расположена в положении 3' относительно промоторной последовательности. Промоторы могут быть полностью получены из нативного гена или состоять из разных элементов, полученных из разных промоторов, встречающихся в природе, или даже содержать синтетические сегменты ДНК. Специалистам в данной области понятно, что разные промоторы могут направлять экспрессию гена в разных типах тканей или клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды или физиологические условия. Промоторы, которые вызывают экспрессию гена в большинстве типов клеток в большинстве случаев, обычно называют "конститутивными промоторами". Кроме того, признается, что, поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей не были полностью определены, фрагменты ДНК различной длины могут обладать идентичной промоторной активностью.

Термины "3' некодирующие последовательности" и "терминатор транскрипции" относятся к последовательностям ДНК, расположенным ниже кодирующей последовательности. Они включают последовательности распознавания полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на процессинг мРНК или экспрессию генов. Сигнал полиаденилирования обычно характеризуется влиянием добавления трактов полиадениловой кислоты к концу 3' прекурсора мРНК. Область 3' может влиять на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности.

Термин "функционально связанный" относится к ассоциации последовательностей нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, так что на функцию одной влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

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

Ссылка на клетку включает растительную клетку независимо от того, выделена она в культуре ткани или включена в растение или часть растения, если не указано иное или не ясно из контекста.

"Потомство" означает всех потомков, включая потомство и производные растения или растений, и включает в себя первое, второе, третье и последующие поколения, а также может быть получено путем самоопыления или скрещивания с растениями с одинаковыми или разными генотипами и может быть модифицировано с помощью ряда подходящих методик генной инженерии. Культиген обычно относится к растениям, которые были преднамеренно изменены и селекционированы человеком. "T0" относится к первому поколению трансформированного растительного материала, "T1" относится к семенам, полученному на растениях T0, семена T1 вырастают в растения, которые производят семена T2, и т.д. до последующего потомства T_x.

"Селекция" включает в себя все способы развития или размножения растений и включает как внутривидовые и межвидовые, так и внутри- и межлинейные скрещивания, а также все подходящие традиционные методики селекции и искусственного разведения. Желаемые признаки (например, признак NS-B50027-4 DHA) могут быть перенесены в другие линии, сорта или культивары канолы или *B. napus* с помощью традиционных способов размножения и также могут быть перенесены в другие виды *Brassica*, такие как *B. juncea* и *B. cara* путем межвидового скрещивания. Обычные способы селекции и способы межвидового скрещивания, а также другие способы переноса генетического материала между растениями хорошо известны в данной области техники.

"Обратное скрещивание" представляет собой процесс, в котором селекционер многократно скрещивает гибридное потомство обратно в родительскую линию, например гибрид F1 первого поколения с одним из родительских генотипов гибрида F1.

"Композиция жирных кислот" или "содержание жирных кислот" обычно относится к массовым процентам различных жирных кислот, присутствующих в эндогенно образованном масле зрелых, цельных, частично высушенных семян. В обычной отраслевой практике состав жирных кислот в процентах относят к площади (нормализованной площади), а не представляют в абсолютных величинах. Процент

площади легко подсчитать и легко сравнить с результатами многих других в данной отрасли, о которых сообщают аналогичным образом. Процент площади не равен абсолютному массовому проценту, но приближается к нему. Абсолютные результаты могут быть рассчитаны с использованием индивидуальных эталонных стандартов известной концентрации и внутреннего стандарта для расчета результатов в мг/кг. Также можно использовать поправочные коэффициенты для расчета массы жирных кислот без использования индивидуальных стандартов жирных кислот, хотя внутренний стандарт все еще может быть необходим. Обычно содержание жирных кислот определяют путем дробления семян и экстракции жирных кислот в виде метиловых эфиров жирных кислот (FAME), которые можно анализировать на содержание жирных кислот с помощью различных методик, в которых генерируются данные в виде процента площади или из которых может быть получен процент площади. Примеры аналитических подходов включают газовую хроматографию (GC), GC-масс-спектрометрию (GC-MS), жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (LC-MS), ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или спектроскопию отражения в ближней инфракрасной области спектра. Все содержание липида может быть отделено методиками, известными в данной области, для очистки фракций, например такой, как фракция TAG. Специалистам в данной области техники известны другие способы характеристики композиций жирных кислот. 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.

Аналогично "содержание масла" представляет собой типичное процентное содержание масла, присутствующего в зрелых, цельных, частично высушенных семенах (обычно содержащих около 6 или 7% влаги). Процент масла рассчитывается как масса масла, деленная на массу семян при влажности 0%. Содержание масла может быть характеристикой разных сортов. Оно может быть определено с использованием различных аналитических методик, таких как ЯМР (MQC, Oxford Instruments), NIR и экстракция по Сокслету. Например, содержание масла канолы может быть измерено методиками ядерного магнитного резонанса (Rossell & Pritchard, ANALYSIS OF OILSEEDS, FATS & FATTY FOODS 48-53 (Elsevier Sci. Pub. Ltd, London, 1991), с помощью импульсной волны NMS 100 Minispec (Balker Pty Ltd Scientific Instruments, Germany), при одновременном измерении содержания влаги. Содержание масла из семян также может быть измерено с помощью спектроскопии отражения в ближней инфракрасной области спектра (NIR). Li et al., 67, Phytochem., 904 (2006).

Фразы "экстрагированный растительный липид", "выделенный растительный липид", "экстрагированный липид" и т.п. относятся к композициям, содержащим липиды, которые были экстрагированы, например, из измельченных растений или частей растений, таких как семена. Экстрагированный липид может быть относительно сырой композицией, полученной, например, путем измельчения растительного материала, такого как семена; или более очищенной композицией, в которой большинство, если не все, из воды, нуклеиновых кислот, белков или углеводов, полученных из растительного материала, были удалены из масла. Примеры способов очистки известны в данной области. В некоторых вариантах выполнения изобретения 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, последний считается "маслом". В некоторых вариантах выполнения изобретения экстрагированный липид не смешивали с другим липидом, таким как ДНА, получаемым из другого источника (например, ДНА из рыбьего жира). В некоторых вариантах выполнения изобретения после экстракции соотношение олеиновой кислоты к ДНА, пальмитиновой кислоты к ДНА, линолевой кислоты к ДНА или общего количества $\omega 6$ жирных кислот к общему количеству $\omega 3$ жирных кислот существенно не изменилось (например, изменения не более 10 или 5%) по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Другими словами, экстрагированный липид не был обогащен конкретной жирной кислотой, например ДНА. В других вариантах выполнения изобретения экстрагированный растительный липид не подвергался процедуре, такой как гидрирование или фракционирование, которая изменяет соотношение олеиновой кислоты к ДНА, пальмитиновой кислоты к ДНА, линолевой кислоты к ДНА или общего количества $\omega 6$ жирных кислот к общему количеству $\omega 3$ жирных кислот по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке. Другими словами, экстрагированный липид не был обогащен конкретной жирной кислотой, например ДНА. Когда экстрагированный растительный липид по настоящему изобретению представляет собой масло, масло может дополнительно содержать молекулы нежирных кислот, такие как стерин.

Как отмечено выше, фразы "экстрагированное растительное масло" и "выделенное растительное масло" относятся к композициям, содержащим экстрагированный растительный липид или выделенный растительный липид, который является жидкостью при комнатной температуре. Масло получают из растения или его части, такой как семя. Экстрагированное или выделенное масло может быть относительно сырой композицией, полученной, например, путем измельчения семян растений, или более очищенной композицией, в которой большинство, если не все, из воды, нуклеиновых кислот, белков или углеводов, полученных из растительного материала, были удалены из масла. Композиция может содержать другие

компоненты, которые могут быть липидными или нелипидными, например молекулы нежирных кислот, такие как стеролы. В одном варианте выполнения изобретения 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 выполнения изобретения экстрагированное масло по изобретению не смешивали с другим маслом или жирной кислотой, такой как ДНА, полученной из другого источника (например, ДНА из рыбьего жира). В одном варианте выполнения изобретения после экстракции соотношения жирных кислот существенно не изменились (например, изменение не более чем на 10 или 5%) по сравнению с соотношением в интактном семени или клетке; кроме того, экстрагированное растительное масло не подвергалось такой процедуре, как гидрирование или фракционирование, которая значительно изменяет соотношение жирных кислот в экстракте по сравнению с соотношениями в интактном семени или клетке. Другими словами, экстрагированное масло не было обогащено конкретной жирной кислотой, например ДНА.

Как используется в настоящем документе, "масло" представляет собой композицию, содержащую преимущественно липид, которая представляет собой жидкость при комнатной температуре. Например, масло по 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) от массы липида в масле. В масле могут присутствовать незначительные компоненты масла, такие как диацилглицерины (DAG), свободные жирные кислоты (FFA), фосфолипиды или стеролы.

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 цепь со связями углерод-углерод длиной по меньшей мере 8 атомов углерода, например по меньшей мере 12 атомов углерода, 16 атомов углерода, 18 атомов углерода, 20 атомов углерода или 22 атома углерода в длину. Большинство природных жирных кислот имеют четное число атомов углерода, потому что их биосинтез включает в себя ацетат, который имеет два атома углерода. Жирные кислоты могут находиться в свободном состоянии (неэтерифицированные); в этерифицированной форме, такой как часть триглицерида (TAG), диацилглицерида (DAG), моноацилглицерида; или быть связанными с ацил-СоА (тиоэфир)-связь или в другой связанной форме. Жирная кислота может быть этерифицированной в виде фосфолипида, такого как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит или дифосфатидилглицерин.

"Насыщенные жирные кислоты" не содержат углерод-углеродных двойных связей (алкенов) или других функциональных групп в цепи. "Насыщенный" относится к присутствию водорода при всех возможных атомах углерода (кроме группы карбоновой кислоты [-COOH]). Другими словами, в насыщенной жирной кислоте конец омега (ω) (также называемый n-конец) жирной кислоты содержит три атома водорода (-CH₃) и каждый углерод в цепи содержит два атома водорода (-CH₂-).

"Ненасыщенные жирные кислоты" имеют сходную основную цепь с насыщенными жирными кислотами за исключением того, что они содержат по меньшей мере одну алкеновую группу (-CH=CH-) в углеродной цепи. Два фланкирующих атома углерода (связанных с любой стороной 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 имеют 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 алкеновых 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. Атомы в боковых группах исключаются из числа атомов углерода, если углеродная цепь является разветвленной.

В одном варианте выполнения изобретения LC-PUFA представляет собой ω 3 жирную кислоту: она имеет десатурацию (алкеновую группу) в третьей углерод-углеродной связи от метильного конца жирной кислоты. В другом варианте выполнения изобретения LC-PUFA представляет собой ω 6 жирную кислоту: она имеет десатурацию (алкеновая группа) в шестой углерод-углеродной связи от метильного конца жирной кислоты. Положение алкена (двойная связь) в цепи жирной кислоты также указывается с использованием Δ (или дельта), где положение алкена пронумеровано относительно карбоксильного конца жирной кислоты. Например, линолевую кислоту также можно обозначить как "цис- Δ 9, цис- Δ 12 октадекадиеновая кислота" или " Δ ^{9,12} октадекадиеновая кислота". Жирные кислоты также могут быть идентифицированы со ссылкой на липидное число "C:D", в котором C представляет собой число атомов углерода, а D представляет собой число двойных связей в основной углеродной цепи. Например, для арахидиновой кислоты может быть указано 20:4^{5,8,11,14}, что означает углеродную цепь из двадцати атомов с че-

тырьмя алкеновыми группами, расположенными у атомов углерода 5, 8, 11 и 14 от карбоксильного конца жирной кислоты. Это название также указывает на то, что арахидовая кислота представляет собой $\omega 6$ жирную кислоту, потому что, если имеется двадцать атомов углерода и алкен на C14 от карбоксильного конца, первый алкен на метильном конце должен быть на C6.

В дополнительном варианте выполнения изобретения LC-PUFA выбрана из группы, состоящей из арахидовой 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, 20:20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$; $\omega 3$), 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 быть дигомо- γ -линолевой кислотой (DGLA) или эйкозатриеновой кислотой (ETrA, 20:3 $\Delta^{11,14,17}$; $\omega 3$). LC-PUFA, полученные в соответствии с настоящими вариантами выполнения изобретения, могут представлять собой смесь любого из или всего вышеперечисленного и могут включать другие LC-PUFA или производные любой из этих LC-PUFA. Однако LC-PUFA, производимые в канале с элитным событием, обычно чище, чем полученные из рыбьего жира. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения $\omega 3$ жирные кислоты представляют собой по меньшей мере одну из DHA; DPA и DHA; или EPA, DPA и DHA.

Кроме того, как указано выше, LC-PUFA и VLC-PUFA могут быть свободной жирной кислотой (неэтерифицированной), этерифицированной или находиться в другой связанной форме. Таким образом, LC-PUFA по настоящему варианту выполнения изобретения могут присутствовать в виде смеси форм в липиде клетки, экстрагированном липиде или очищенном масле. По меньшей мере в одном варианте выполнения изобретения масло содержит по меньшей мере 75% или по меньшей мере 85% триацилглицеринов, причем остаток присутствует в виде других форм липидов, таких как упомянутые, с триацилглицеринами, содержащими по меньшей мере одну LC-PUFA. Затем масло может быть дополнительно очищено или обработано, например, гидролизом с сильным основанием для высвобождения свободных жирных кислот, или перегонкой, или т.п.

Соответственно "общее количество $\omega 3$ жирных кислот", "общее содержание $\omega 3$ жирных кислот" и т.п. относится к сумме всех $\omega 3$ жирных кислот, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, и обычно выражается в процентах от общего содержания жирных кислот. Эти $\omega 3$ жирные кислоты включают ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA или DHA и исключают любые $\omega 6$ жирные кислоты или мононенасыщенные жирные кислоты. "Новые $\omega 3$ жирные кислоты", "содержание новых $\omega 3$ жирных кислот" и т.п. относятся к сумме всех $\omega 3$ жирных кислот за исключением ALA, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженной в процентах от общего содержания жирных кислот. Эти новые $\omega 3$ жирные кислоты представляют собой жирные кислоты, которые продуцируются в клетках, растениях, частях растений и семенах по настоящему варианту выполнения изобретения посредством экспрессии трансгенных конструкций с элитным событием и, если они присутствуют, включают SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA или DHA, но за исключением ALA, любых $\omega 6$ жирных кислот или мононенасыщенных жирных кислот. Приблизительное общее содержание $\omega 3$ жирных кислот и новое содержание $\omega 3$ жирных кислот может быть определено путем конверсии жирных кислот в образце в FAME и анализа с помощью GC с использованием способов, известных в данной области техники. См., например, American Oilseed Chemists' Society (AOCS) method Celd-91.

Аналогично "общее количество $\omega 6$ жирных кислот", "общее содержание $\omega 6$ жирных кислот" и т.п. относится к сумме всех $\omega 6$ жирных кислот, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени в зависимости от контекста, и выражается в процентах от общего содержания жирных кислот. "Общее содержание $\omega 6$ жирных кислот", если они присутствуют, может включать LA, GLA, DGLA, ARA, EDA или $\omega 6$ -DPA и исключает любые $\omega 3$ жирные кислоты или мононенасыщенные жирные кислоты. "Новые $\omega 6$ жирные кислоты", "содержание новых $\omega 6$ жирных кислот" и т.п. относится к сумме всех $\omega 6$ жирных кислот за исключением LA, этерифицированных и неэтерифицированных, в экстрагированном липиде, масле, рекомбинантной клетке, части растения или семени, как определяется контекстом, выраженной в процентах от общего содержания жирных кислот. Эти новые $\omega 6$ жирные кислоты представляют собой жирные кислоты, которые продуцируются в клетках, растениях, частях растения или семенах, как описано в настоящем документе, посредством экспрессии трансгенов с элитным событием и могут включать GLA, DGLA, ARA, EDA или $\omega 6$ -DPA, но за исключением LA, любых $\omega 3$ жирных кислот или мононенасыщенных жирных кислот.

"Анализ полусемян" представляет собой процедуру, в которой анализ жирных кислот проводится на одной из двух семядолей (полусемени), а оставшийся проросток, несущий вторую семядолу, образует растение.

"Содержание белка" представляет собой типичный массовый процент белка в безмасляном шроте зрелых цельных высушенных семян, определяемый способами, известными в данной области техники. См., например, Daun et al., 2011, AOCS Official Meth. Ba 4e-93 Combustion Meth. Determination Crude Protein.

Зрелые семена, выращиваемые коммерческими производителями для целей, отличных от выращивания или размножения вида, иногда называют "зерном".

Генетические события.

Фенотипическая экспрессия трансгенов в канале определяется как структурой самой трансгенной кассеты, так и местоположением ее вставки в геноме растения: присутствие трансгенов в определенных местах в геноме растения может влиять на экспрессию трансгена и общий фенотип растения. Агрономически или промышленно успешное введение коммерчески интересного признака в растение путем генетической манипуляции может быть длительной процедурой, зависящей от различных факторов. Фактическая трансформация и получение генетически трансформированных растений являются лишь первыми в серии этапов селекции, которые включают обширную генетическую характеристику, селекцию и оценку в полевых испытаниях, что в конечном итоге приводит к селекции элитного события.

Аспект варианта выполнения настоящего изобретения относится к неожиданному количеству копий экспрессируемых трансгенов в геноме растения. "Экспрессируемый" означает, что первичная структура молекулы ДНК, т.е. кодирующая последовательность трансгена, указывает на то, что ген кодирует активный белок. Однако экспрессируемые кодирующие последовательности могут не быть экспрессированными, потому что "выключение генов" происходит посредством различных механизмов гомологичной инактивации трансгена *in vivo*. Гомологичная инактивация трансгена была описана на растениях, в которых трансген вставлен в смысловой ориентации, с неожиданным результатом, когда и ген, и трансген были подавлены. Napoli et al., 2 Plant Cell, 279 (1990). Возможные механизмы для инактивации гомологичных генетических последовательностей включают инактивацию транскрипции посредством метилирования, при котором дублированные участки ДНК сигнализируют об эндогенных механизмах выключения генов и посттранскрипционного выключения, при котором объединенные уровни мРНК как от эндогенного гена, так и от трансгена, инициируют индуцированную порогом деградацию обоих сообщений, 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 демонстрирует синергетическую экспрессию ДНА.

Элитное генетическое событие может характеризоваться расположением(ями) и конфигурацией в месте(ах) включения молекулы(молекул) рекомбинантной ДНК в геном растения. Сайт в геноме растения, в который была вставлена кассета рекомбинантной ДНК, также называется "сайтом вставки" или "сайтом-мишенью". "Фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность" представляет собой область ДНК, например, по меньшей мере 20 пар оснований, по меньшей мере 50 пар оснований или вплоть до 5000 пар оснований генома растения, расположенных непосредственно вверх и смежно или непосредственно вниз и смежно с трансгенной кассетой. Трансформация, которая приводит к случайной интеграции чужеродной ДНК, приводит к трансформантам с различными фланкирующими областями, которые характерны и уникальны для каждого трансформанта (элитное событие).

Как правило, когда трансген вводится в растение путем традиционного скрещивания, его сайт вставки в геном растения и его фланкирующие области не изменяются. "Область вставки" относится к области, соответствующей области по меньшей мере из 40 пар оснований, такой как по меньшей мере 100 пар оснований или вплоть до более чем 10000 пар оснований, охватываемых выше и ниже фланкирующими областями трансгена в (нетрансформированном) геноме растения и включающей сайт вставки (и возможную делецию сайта-мишени). Принимая во внимание незначительные различия из-за мутаций в пределах вида, область вставки может сохранять по меньшей мере 85%, такую как 90, 95 или 100% идентичность последовательности с фланкирующими участками вверх и вниз по чужеродной ДНК в данном растении этого вида. Однако вставка трансгенной кассеты в геном растения иногда может быть связана с делецией ДНК растения, называемой "делецией сайта-мишени".

Экспрессия представляющих интерес генов относится к тому факту, что трансгены наделяют растение одним или несколькими фенотипическими признаками (например, продуцированием LC- ω 3 жирных кислот), которые были предназначены для их придания путем введения трансформирующей ДНК (на основе структуры и функции некоторых или всех генов, представляющих интерес). В вариантах выполнения настоящего изобретения несколько трансгенов обеспечивают биосинтетический путь для продуцирования LC- ω 3 жирных кислот в трансформированном растении.

"Элитное событие", как используется в настоящем документе, представляет собой событие, выбранное из группы событий, полученных путем трансформации с помощью одной и той же трансформирующей ДНК или путем обратного скрещивания с растениями, полученными в результате такой трансформации, на основе экспрессии и стабильности трансгенной конструкции(конструктов), его совместности с оптимальными агрономическими характеристиками растения, его содержащего, и реализации желаемого фенотипического признака. Таким образом, критериями выбора элитных событий являются по меньшей мере одно, а преимущественно все из следующего:

- (a) присутствие трансгена не ставит под угрозу другие желательные характеристики растения, такие как характеристики, относящиеся к агрономическим характеристикам или коммерческой ценности;
- (b) событие характеризуется четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно

наследуется и для которой могут быть разработаны соответствующие диагностические инструменты для контроля идентичности;

(с) гены, представляющие интерес в трансгенной кассете, показывают правильную, подходящую и стабильную пространственную и временную фенотипическую экспрессию, как в гетерозиготном (или гемизиготном), так и в гомозиготном состоянии события, на коммерчески приемлемом уровне в ряде условий окружающей среды, при которой растения, несущие событие, могут быть подвержены обычному агрономическому использованию. Чужеродная ДНК также может быть связана с положением в геноме растения, которое позволяет интрогрессировать в дальнейшие желательные коммерческие генетические фоны.

Статус события как элитного события может быть подтвержден интрогрессией элитного события в различных соответствующих генетических фонах и наблюдением соответствия по меньшей мере одному из критериев, например (а), (b) и (с) выше. Кроме того, выбор элитных событий также может быть определен по совместимости, более конкретно тем, что потомство, полученное в результате скрещивания между растением, несущим элитное событие NS-B50027-4, и растением, несущим по меньшей мере одно другое событие, так что потомство несет оба события. Соответственно "элитное событие" относится к генетическому локусу, содержащему трансгенную кассету, которая отвечает вышеописанным критериям. Растение, семена, растительный материал или потомство могут включать одно или несколько элитных событий в своем геноме.

Элитное событие NS-B50027-4 было выбрано в качестве элитного события в разработке канолы, которая продуцирует LC-PUFA, в частности LC- ω 3 жирные кислоты и, в частности, ДНА. Включение молекулы рекомбинантной ДНК в геном растения обычно происходит в результате трансформации клетки или ткани (или в результате других генетических манипуляций). Конкретный(ые) сайт(ы) инкорпорации может быть случайным или predetermined (если используется процесс нацеленной интеграции). Линия NS-B50027-4 канолы является стабильной и однородной линией размножения, как описано в настоящем документе. Она была выращена с осторожным вниманием к однородности типа растений. Линия была увеличена при постоянном наблюдении за однородностью. Линия NS-B50027-4 канолы не является родителем какого-либо другого культивара канолы, коммерциализированного на момент подачи патента на линию NS-B50027-4.

Появление новых молекулярно-биологических методик позволило выделить и охарактеризовать генетические элементы со специфическими функциями, такими как кодирование специфических белковых продуктов. Ученые в области биологии растений проявили большой интерес к разработке генома растений с содержанием и экспрессией чужеродных генетических элементов, или дополнительных, или модифицированных версий нативных или эндогенных генетических элементов для изменения признаков растения специфическим способом. Любые молекулы ДНК, будь то из другого вида или из одного и того же вида, которые встраиваются в геном вида с использованием трансформации, называются в настоящем документе в совокупности "трансгены". Процесс "трансформации" представляет собой вставку ДНК в геном. Было разработано несколько способов получения трансгенных растений, и настоящее изобретение в конкретных вариантах выполнения также относится к трансформированным вариантам заявленной линии NS-B50027-4 канолы.

Были разработаны многочисленные способы трансформации растений, включая биологические и физические протоколы трансформации растений. Кроме того, доступны векторы экспрессии и методы культивирования *in vitro* для трансформации растительных клеток или тканей и регенерации растений. См., например, Miki et al., Procedures for introducing foreign DNA into plants, в *METH. PLANT MOLEC. BIOL. & BIOTECHNOL.* на 63 (Glick & Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, 1993); Gruber et al., Vectors for plant transformation, *id.* на R 89; Genetic transformation for the improvement of Canola, *PROC. WORLD CONF. BIOTECHNOL. FATS & OILS INDUS.* на 43-46 (Am. Oil. Chem. Soc, Champaign, IL, 1988).

Наиболее распространенные типы трансформации растений включают конструирование вектора экспрессии. Такой вектор содержит молекулу ДНК, которая содержит кодирующую область под контролем регуляторной области или оперативно связанную с ней, например, промотором. Вектор может содержать один или несколько генов и один или несколько регуляторных элементов. По меньшей мере одна из областей кодирования и их соответствующие регуляторные элементы могут быть расположены в противоположной ориентации внутри вектора, обеспечивая двоичный вектор. Теоретически расположение генов, восприимчивых к выключению генов в бинарной форме, может минимизировать выключение генов.

Например, первоначальная трансформационная кассета, pJP3416_GA7-modB, включала семь генов, способных стимулировать накопление омега-3 жирных кислот в семени канолы, и один селективируемый маркерный ген для облегчения отбора предполагаемых трансгенных растений *in vitro*. См. WO 2013/185184; патентную публикацию США 2015/0374654; патенты США № 8816111 и № 8946460; Petrie et al., 6, *Plant Meth.*, 8 (2010).

Все экспрессируемые гены были синтетическими - оптимизированными по кодонам и синтезированными - следовательно, трансгенные молекулы ДНК не обнаруживаются ни в одном природном орга-

низме. Были описаны сходные последовательности, которые использовались в качестве шаблона для оптимизации кодонов. 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 хорошо известно в данной области, функциональные генные промоторы представляют собой участки ДНК, которые важны для транскрипции генов, но не кодируют функциональные продукты, такие как пептиды. Например, общий промотор для конститутивной экспрессии происходит от Cauliflower Mosaic Virus. Kay et al., 236, *Science*, 1299 (1987); Coutu et al., 16, *Transgenic Res.*, 771 (2007). Терминационные области, которые включают сигналы полиаденилирования, необходимы для производства полных и стабильных молекул мРНК. Например, терминатор нопалинсинтазы *A. tumefaciens* (NOS) относится к пригодным терминаторам. Bevan, 12, *Nucl. Acid Res.*, 8711 (1984); Rogers et al., в *BIOTECHNOL. PLANT SCI.*, 219 (Acad. Press, Inc., New York, NY, 1985); Sanders et al., 15, *Nucl. Acids Res.*, 1543 (1987). Ряд регуляторных последовательностей использовали в комбинации для запуска и завершения транскрипции различных каскад экспрессии. 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 2001/016340); и усеченный промотор *B. napus napin* (Stalberg et al., 23, *Plant Molec. Biol.*, 671 (1993)). См. также патент США № 8816111.

Более подробное описание трансгенов, содержащих открытые рамки считывания 5' и 3' регуляторных областей и других некодирующих областей трансгенных каскад экспрессии, используемых для введения путей LC-PUFA в канолу, приведено в табл. 1.

Таблица 1

Генетические элементы в элитном событии NS-B50027-4

Промотор (PRO)		Кодирующая последовательность (CDS)		Терминация (TER)		MAR
Название	Источник	Название	Источник	Название	Источник	
PRO Linus-Cnl2	промотор конлина2 <i>Linum usitatissimum</i> c/ энхансерный лидер 5' UTR вирус табачной мозаики (TMV)	CDS Micpu-d6D	$\Delta 6$ -десатураза <i>Micromonas pusilla</i>	TER Linus-Cln2	терминатор конлина2 <i>Linum usitatissimum</i>	-
PRO Arath-FAE1	промотор элонгазы жирных кислот TMV лидер <i>Arabidopsis thaliana</i>	CDS Purgc delta-5 elongase	$\Delta 5$ -элонгаза <i>Pyramimonas cordata</i>	TER Glyma - Lectin	терминатор лектина <i>Glycine max</i>	-
PRO Brana-FP1	промотор напина TMV лидер <i>Brassica napus</i>	CDS Pavsad5D	$\Delta 5$ -десатураза <i>Pavlova salina</i>	TER Agrtu-NOS	терминатор нопалинсинтазы <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	MAR Nicta-RB7
PRO Linus-Cnl1	промотор конлина1 TMV лидер <i>L. usitatissimum</i>	CDS Picpa-w3D	$\Delta 15/\omega 3$ -десатураза <i>Pichia pastoris</i>	TER Linus-Cnl1	терминатор конлина1 <i>L. usitatissimum</i>	-

PRO Linus- Cnl2	промотор конлинина2 <i>L.</i> <i>usitatissimum</i>	CDS Pavsa- d4D	Δ 4- десатураза <i>Pavlova</i> <i>salina</i>	TER Linus- Cnl2	терминатор конлинина2 <i>L.</i> <i>usitatissimu</i> <i>m</i>	–
PRO Linus- Cnl1	промотор конлинина1 <i>L.</i> <i>usitatissimum</i>	CDS Lackl- d12D	Δ 12- десатураза <i>Lachancea</i> <i>khyveri</i>	TER Linus- Cnl1	терминатор конлинина1 <i>L.</i> <i>usitatissimu</i> <i>m</i>	MAR Nicta- RB7
PRO Arath- FAE1::E NHANC ER TMV Leader	промотор элонгазы жирных кислот TMV лидер <i>A.</i> <i>thaliana</i>	CDS Purco delta-6 elongase	Δ 6-элонгаза <i>Pyramimona</i> <i>s cordata</i>	TER Glyma - Lectin	терминатор лектина <i>G.</i> <i>max</i>	–
PRO 35S x2	Вирус Мозаики Цветной Капусты	CDS phosphino -thricin <i>N</i> -acetyl transferase	<i>Streptomyce</i> <i>s viridochro-</i> <i>mogenes</i>	TER Agrtu- NOS	терминатор нопалин- синтазы <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	–

Соответственно, чтобы определить, содержит ли биологический образец по меньшей мере часть пути LC-PUFA, присутствующего в NS-B50027-4, можно использовать праймеры и зонды для обнаружения трансгенов. Конкретные праймеры, пригодные для обнаружения трансгенов, показаны в табл. 2, в которой каждый праймер имеет температуру ренатурирования 62, а размер (п.о.) относится к числу пар оснований в продукте PCR.

Таблица 2

Пример наборов праймеров PCR для детектирования кассеты экспрессии генов

Целевой ген	смысловой праймер	антисмысловой праймер
Δ 12 десатураза	TGGAGCTATCCCTCATGAGT (SEQ ID NO: 53)	GATCCTAGAACAGTAGTGGTG (SEQ ID NO: 54)
Δ 15/ ω 3 десатураза	GACGCTATCCCTAAGCACTGT (SEQ ID NO: 55)	GTCCACTCTTGAGCATCGTA (SEQ ID NO: 56)
Δ 6 десатураза	GAGCACCTTGTAGTTGAGTCC (SEQ ID NO: 57)	AGTCTGAGGATGCTCCTATGC (SEQ ID NO: 58)
Δ 6 Элонгаза	TGTTGCTATGGCTCAAGAGC (SEQ ID NO: 59)	CTAGCGTGGTGCTTCATGTA (SEQ ID NO: 60)
Δ 5 десатураза	GCTACCGATGCTTACAAGCA (SEQ ID NO: 61)	TAGTGAAGTCCGTGCTTCTC (SEQ ID NO: 62)
Δ 5 элонгаза	TGCTGGAACCTTGGATACG (SEQ ID NO: 63)	CTGGGTGATGTACTTCTTCC (SEQ ID NO: 64)
Δ 4 десатураза	GGCTTTTCAATCTGAGCATC (SEQ ID NO: 65)	CTCAGCCTTAACAAGAGGAG (SEQ ID NO: 66)

Исходные трансформанты, культивируемые из зародышевой линии *Brassica napus L.* (van AV Jade), показали широкий разброс в уровнях производства жирных кислот, особенно в уровнях EPA и DHA. Для второго и третьего поколений отбор основывался, главным образом, на содержании DHA и EPA в трансгенных семенах. В некоторых случаях, особенно в поколениях T2 или T3, сегрегационные паттерны (определенные путем выращивания от двадцати до сорока отдельных семян от одного растения до двадцати-сорока потомков, а затем измерения содержания DHA и EPA в отдельных семенах этих потомков) также показали рассеянные результаты, указывающие на имеющие место комплексные или мультикопийные вставки. Таким образом, многие из первоначальных поколений T2 или T3 растений были отброшены. Первоначально был сделан вывод, что множественные копии трансгенной вставки будут давать

нестабильные трансформанты, а также демонстрировать классическое выключение генов, наблюдаемое у гомозиготных генотипов. Следовательно, если анализ PCR трансформированных растений показывал число копий >1, эти трансформанты часто отбрасывали.

Удивительно, но было обнаружено, что элитное событие NS-B50027-4 содержало мультикопийное событие: вставку из шестнадцати генов, включающую две кассеты, граничащие с восемью генами-Т-ДНК, расположенными в двоичном (перевернутом) виде левая-граница-к-левой-границе (аналогично массивному палиндрому); и отдельную меньшую кассету с четырьмя генами; и эта комбинация трансгенных вставок действует синергетически в продуцировании ДНА в инбредной линии NS-B50027-4. Более конкретно, комбинация скрещивания, обратного 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 селекции каждого сегреганта для получения чистых гомозиготных линий каждого события. Например, в одном эксперименте сегрегант, включающий вставку из шестнадцати генов, продуцировал около 4% ДНА; а сегрегант, содержащий вставку из четырех генов, не продуцировал ДНА; но когда сегреганты были селекционированы для объединения локуса трансгенной хромосомы A02 и локуса трансгенной хромосомы A05, комбинация двух трансгенных вставок дала 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, линия оказалась стабильной и постоянной в производстве жирных кислот.

Что касается меньшей вставки из четырех генов, расположенной на A02, эта вставка заменила около 15 п.о. области 3' UTR гена неизвестной функции (ген HPP).

Частичная вставка и ее фланкирующие последовательности *V. parus* хорошо описаны в настоящем документе. Вставка из четырех генов включает трансгены Δ6-десатуразы, Δ5-элонгазы, Δ5-десатуразы и Δ15/ω3-десатуразы; но не включает гены Δ4-десатуразы, Δ12-десатуразы, Δ6-элонгазы и маркер генетического отбора PAT. Поскольку Δ4-десатураза необходима для продуцирования ДНА в клетке семян растений, было неожиданным и удивительным, что вставка из четырех генов синергетически способствовала продуцированию ДНА в трансгенной линии NS-B50027-4. Вставка из четырех генов и ее фланкирующие области *V. parus* на A02 показаны на фиг. 5 (SEQ ID NO: 40). В частности, нуклеотиды с 1 по 2089 SEQ ID NO: 40 представляют собой фланкирующую область 5' (верхнюю) сайта вставки небольшой вставки; нуклеотиды с 2090 по 14201 SEQ ID NO: 40 относятся к гетерологичной нуклеиновой кислоте из трансгенной кассеты; и нуклеотиды с 14202 по 15006 SEQ ID NO: 40 представляют собой область 3' (нижнюю) сайта вставки площадью 808 п.о. Нуклеотиды с 1 по 2089 и с 14202 по 15006 SEQ ID NO: 40 являются нативными для хромосомы *V. parus* A02. Генетический анализ, сравнивающий нативную последовательность *V. parus* и сайт вставки, выявил делеционную вставку: трансгенная вставка заменила 15-п.о.-фрагмент (GTAGCACGACAAGTT; SEQ ID NO: 38), который в противном случае находился бы на chrUn_random в референсном культиваре Darmog *V. parus* (2n=AACC) в положении 118589927-118589941 и на хромосоме A02 референсного генома из культивара Chiifu *V. para* (2n=AA) в положении 18569316-18569330. См. Chalhoub et al., 345, Sci., 950 (2014); NCBI Ref. Seq. NC_024796.1; Wang et al., 43, Nat. Genet., 1035 (2011); NCBI Ref. Seq. XM_009130638.

Было подтверждено, что вставка из шестнадцати генов находится в гене Brassica, кодирующем Pto-взаимодействующий белок (PTI), серин-треонинкиназу, которая в противном случае была бы вовлечена в передаче сигналов, опосредованную гиперчувствительным ответом. Ген PTI расположен на хромосоме A05 референсного генома *V. parus* (культивар Darmog) в положении 17267746-17270700. Эта более крупная вставка также связана с делеционной вставкой, заменяющей отрезок ДНК длиной 20 п.о. (CACGGTGGAGGTCACCATGT; SEQ ID NO: 39) во втором экзоне белка PTI; и тем самым нарушается экспрессия PTI. Эта делеция длиной 20 п.о. была расположена на хромосоме A05 референсного генома в положении 17269790-17269809. Последовательность ДНК вставки из шестнадцати генов и ее фланкирующих областей *V. parus* на A05 показана на фиг. 6 (SEQ ID NO: 41). В частности, нуклеотиды с 1 по 1159 SEQ ID NO: 41 представляют собой фланкирующую область 5' (верхнюю) сайта вставки большой вставки; нуклеотиды с 4774 по 49789 из SEQ ID NO: 41 представляют собой фланкирующую область 3' (нижнюю) сайта инсерции. Нуклеотиды с 1 по 1159 SEQ ID NO: 41 и с 4774 по 49789 SEQ ID NO: 41 являются нативными для хромосомы A05 Brassica parus.

Соответственно в другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный бинарный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности (стрелки указывают направление транскрипции по отношению к референсной последовательности ДНК 5'-3'):

(a) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 2747 до нуклеотида 6250 (Micru-d6D ← включая PRO, лидер, TER);

b) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 6257 до нуклеотида 8414 (→ Pугco-d5E, включая PRO, лидер, TER);

(c) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 8415 до нуклеотида 10374

(→ Pavsa-d5D, включая PRO, лидер, TER);

(d) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 10375 до нуклеотида 11544 (→ MAR); и

(e) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 11545 до нуклеотида 14049 (Pisra-w3/d15D ← включая PRO, лидер, TER);

(f) молекулы с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидным последовательностям (a)-(e); или

(g) их комплементы.

Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клеткам растений, растительным материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный бинарный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный бинарный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

(a) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 1268 до нуклеотида 5317 (Cnl2 PRO через лидера через кодирующую область для Micru-d6D ← через TER);

(b) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 5324 до нуклеотида 7481 (PRO через → Purgco-d5E через TER);

(c) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 7482 до нуклеотида 9443 (PRO через лидера и → Pavsa-d5D через TER);

(d) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 9444 до нуклеотида 10611 (→ MAR);

(e) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 10612 до нуклеотида 13116 (PRO через лидера и Pisra-w3/d15D ← через TER);

(f) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 13117 до нуклеотида 17000 (PRO через → Pavsa d4D через TER);

(g) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 17001 до нуклеотида 19606 (PRO через → Lack-d12D через TER);

(h) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 19607 до нуклеотида 29773 (→ MAR);

(i) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 20783 до нуклеотида 22987 (PRO через → Purgco-d6E через TER);

(j) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 23011 до 24370 (PRO через → PAT через TER);

(k) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 42561 до нуклеотида 25920 (PRO через PAT ← через TER);

(l) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 25943 до нуклеотида 29324 (PRO через Purgco-d6E ← через TER);

(m) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 28157 до нуклеотида 29324 (MAR ←);

(n) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 29324 до нуклеотида 31830 (PRO через Lack-d12D ← через TER);

(o) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 31831 до нуклеотида 35816 (PRO через Pavsa d4D ← через TER);

(p) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 35817 до нуклеотида 38319 (PRO через лидера и → Pisra-w3/d15D через TER);

(q) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 38320 до нуклеотида 39488 (MAR ←);

(r) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 39489 до нуклеотида 41449 (PRO через Pavsa-d5D ← через TER);

(s) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 41450 до нуклеотида 43607 (PRO через Purgco-d5E ← через TER);

(t) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 43614 до нуклеотида 47662 (PRO → Micru-d6D через TER);

(u) молекула с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидным последовательностям (a)-(u), (a)-(j), (k)-(u); или

(v) их комплементы.

Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клеткам растений, материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный бинарный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный бинарный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

сти:

(a) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 2747 до нуклеотида 4141 (Mісru-d6D ←);

(b) нуклеотидная последовательность комплемента нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 7259 до нуклеотида 8065 (→ Pугco-d5E);

(c) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 8841 до нуклеотида 10121 (→ Pavsa-d5D);

(d) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 40 от нуклеотида 12281 до нуклеотида 13531 (Pісpa-w3/d15D ←);

(e) молекула с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидным последовательностям (a)-(d); или

(f) их комплементы,

где искусственный локус включает регуляторные области (например, промоторы, лидерные последовательности, терминаторы) для обеспечения экспрессии с (a) по (d), или (e), или (f). Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к растительным клеткам, растительным материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный бинарный генетический локус.

В другом варианте выполнения изобретение относится к молекуле ДНК, содержащей искусственный бинарный генетический локус, содержащий по порядку следующие нуклеотидные последовательности:

(a) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 1820 до нуклеотида 3208 (Mісru-d6D ←);

(b) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 6326 до нуклеотида 7126 (→ Pугco-d5E);

(c) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 7908 до нуклеотида 9192 (→ Pavsa-d5D);

(d) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 11352 до нуклеотида 12596 (Pісpa-w3/d15D ←);

(e) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 15216 до нуклеотида 16556 (→ Pavsa d4D);

(f) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 17619 до нуклеотида 18866 (→ Lack-d12D);

(g) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 21895 до нуклеотида 22647 (→ Pугco-d6E);

(h) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 25943 до нуклеотида 26283 (Pугco-d6E ←);

(i) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 30066 до нуклеотида 31313 (Lack-d12D ←);

(j) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 31831 до нуклеотида 35816 (Pavsa-d4D ←);

(k) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 36335 до нуклеотида 38319 (→ Pісpa-w3/d15D);

(l) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 39749 до нуклеотида 41023 (Pavsa-d5D ←);

(m) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 41805 до нуклеотида 42605 (Pугco-d5E ←);

(n) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 41 от нуклеотида 45724 до нуклеотида 47111 (→ Mісru-d6D);

(o) молекула с по меньшей мере 80, 95, 97, 98, 99 или 99,5% идентичностью последовательности нуклеотидным последовательностям (a)-(u), (a)-(j), (k)-(u); или

(p) их комплементы,

где искусственный локус включает регуляторные области (например, промоторы, лидерные последовательности, терминаторы) для обеспечения экспрессии (a)-(n), или (o), или (p). Соответствующий вариант выполнения изобретения относится к клеткам растений, материалам или семенам растений, содержащим этот искусственный бинарный генетический локус.

Генетический признак, такой, который был внедрен в конкретное растение канолы с применением методик трансформации, таких как описанные в настоящем документе, может быть перенесен в другую линию канолы или Brassica с применением традиционных методик селекции, хорошо известных в области селекции растений. Например, растения, несущие элитное событие NS-B50027-4, могут, например, быть получены из семян, депонированных в ATCC. Такие растения могут быть далее размножены и/или использованы в традиционной схеме размножения для введения элитного события NS-B50027-4 в другие

культивары того же вида растений. Депонированные семена относятся к виду *Brassica napus*. Тем не менее способы введения аллелей или трансгенов, расположенных в А-геноме или С-геноме от *B. napus* до *B. juncea*, хорошо известны в данной области и включают повторяемое обратное скрещивание. Подход обратного скрещивания может применяться для перемещения трансгена из трансформированного растения канола в элитную инбредную линию, и полученное потомство включает трансген. Кроме того, если для трансформации применяется инбредная линия, то трансгенные растения могут быть скрещены с другой линией для получения трансгенного гибридного растения канола. Используемый в настоящем документе термин "скрещивание" может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу обратного скрещивания в зависимости от контекста. Различные генетические элементы могут быть дополнительно введены в геном растения с применением трансформации. Эти элементы включают, но без ограничения, гены; кодирующие последовательности; индуцибельные, конститутивные и тканеспецифичные промоторы; энхансерные последовательности; и сигнальные и нацеливающие последовательности.

Инбредная линия NS-B50027-4 канолы.

Линия NS-B50027-4 канолы является стабильной и однородной линией размножения, как описано в настоящем документе. Она была выведена с особым вниманием к однородности типа растения, и линия была увеличена при постоянном наблюдении за однородностью. NS-B50027-4 отличается, в частности, продуцированием в своих семенах LC-PUFA, в частности, LC- ω 3 жирных кислот и, более конкретно, ДНА. Линия NS-B50027-4 канолы не является родителем какого-либо другого культивара канолы, коммерциализированного на момент подачи патента на линию NS-B50027-4.

Инбредная трансгенная линия NS-B50027-4 канолы имеет следующие морфологические и физиологические характеристики (на основе данных, собранных и усредненных по восьми различным местам в Австралии в течение 2015 г.).

Таблица 3

Описательная информация: NS-B50027-4 и AV Jade

	NS-B50027-4	Компаратор: AV Jade
Вид	<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica napus</i>
Лист: Зеленый цвет	средне	средне
Лист: Доли	есть	есть
Лист: Число долей	средне	средне
Лист: Зубчатость края	средне	средне
Лист: Длина	средне	средне
Время цветения	от среднего до позднего	средне
Цветок: Цвет лепестков	желтый	желтый
Цветок: Ширина лепестков	средне	средне
Цветок: Выработка пыльцы	есть	есть
Растение: Мощность проростков	от среднего до высокого	средне
Растение: Высота при полном цветении	средне	средне
Растение: Полегание в состоянии зрелости	низко	низко
Устойчивость к заболеванию Черная ножка	есть	есть
Стручок: Длина	от среднего до длинного	от среднего до длинного
Стручок: Длина носика	средне	средне
Стручок: Длина ножки	от среднего до длинного	от среднего до длинного
Разрушение зерен	низко	низко

Разрушение зерен	низко	низко
Зерна: Выход	высоко	высоко
Зерна % Масла	умеренно	умеренно
Зерна: % Эруковой Кислоты	отсутствует	отсутствует
Зерна: % EPA C20:5n3	есть	нет
Зерна: % DPA C22:5n3	есть	нет
Зерна: % DHA C22:6n3	есть	нет

В другом аспекте изобретение относится к способу получения растения *Brassica napus*, полученного из NS-B50027-4, или его частей, таких как семена, включающему скрещивание растения *B. napus* или его частей, описанного выше, включающему получение растения *Brassica*, описанного выше, и выращивание растения при условиях выращивания растения *Brassica*. В другом аспекте изобретение относится к способу выращивания *B. napus* линии NS-B50027-4, репрезентативные семена которой были депонированы с номером доступа ATCC PTA-123186, подлинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4, или подлинии, или растения, полученного скрещиванием NS-B50027-4 со вторым растением канолы или *Brassica*, включающему получение семян *Brassica*, описанных выше, и выращивание растения в условиях выращивания растения *Brassica*. В другом аспекте изобретение относится к способу получения растения *Brassica napus*, полученного из NS-B50027-4, или его частей, таких как семена, включающему скрещивание растения *Brassica napus* или его частей.

Жирные кислоты LC-ω3.

В растениях канолы линии NS-B50027-4 согласно настоящим вариантам выполнения изобретения LC-ω3 жирные кислоты могут быть получены в промышленных количествах из семян канолы NS-B50027-4. Таким образом, методики селекции и размножения трансформированных растений дают множество растений с преимущественными признаками NS-B50027-4, которые собирают обычным способом и выделяют жирные кислоты из интересующей ткани, например семян.

Как отмечалось выше, "содержание жирных кислот" или "состав жирных кислот" обычно относится к процентам по массе различных жирных кислот, присутствующих в эндогенно образованном масле зрелых, цельных, частично высушенных семян (обычно содержащих около 6 или 7% влаги), рассчитываемым как процент конкретной жирной кислоты в виде нормализованной площади; или по отношению к известному стандарту; или в виде массового отношения жирной кислоты на грамм семян (например, мг ДНА/г семян).

В общепринятой отраслевой практике состав жирных кислот представлен в процентах площади (нормализованной площади), а не в абсолютных величинах. Например, в хроматографии часто получают данные в виде пиков, и площадь под каждым пиком интегрируется и представляется как процент от общей площади под всеми пиками для жирных кислот на хроматограмме. Процент площади легко рассчитать и сравнить с результатами, представленными другими в этой отрасли, которые также сообщают процент площади. Процент площади не является абсолютным, но обеспечивает приемлемое приближение. Абсолютные результаты в мг/кг могут быть рассчитаны, например, путем включения эталонных стандартов известной концентрации и внутреннего стандарта. Для расчета массовых количеств жирных кислот также могут быть использованы поправочные коэффициенты.

Например, при определении содержания жирных кислот семена можно измельчать, экстрагировать масляные триацилглицериды (TAG) с последующим омылением и метилированием метанолом и метоксидом натрия или путем реакции с 1,25% 3-(трифторметил)фенилтриметиламмоний гидроксидом в метаноле (Meth Prep II™, Fischer Scientific Cat #AT18007) для образования метиловых эфиров жирных кислот. Полученные метиловые эфиры жирных кислот (FAME) могут быть проанализированы газожидкостной хроматографией (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, ЯМР или спектроскопии отражения в ближней инфракрасной области спектра. Состав жирных кислот также можно определить из цельных семян, например, путем разрушения оболочки семян и подвергания разбитых семян прямому метилированию. Общее содержание липидов может быть отделено методиками, 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 состава жирных кислот, в частности TAG. Можно применять ряд других аналитических методик, известных специалистам в данной области техники. 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.

В следующем варианте выполнения изобретения экстрагированный растительный липид может быть обработан для повышения уровня ДНА в процентах от общего содержания жирных кислот. Например, обработка включает гидролиз этерифицированных жирных кислот с получением свободных жирных

кислот или переэтерификацию. Например, масло канолы может быть обработано для превращения жирных кислот в масле в алкиловые эфиры, такие как метиловые или этиловые эфиры, которые затем могут быть очищены или фракционированы для обогащения липида или масла ДНА. В вариантах выполнения изобретения композиция жирных кислот липида после такой обработки включает 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% ДНА.

Настоящие варианты выполнения изобретения также относятся к потомству и потомкам этих новых линий *B. napus* из линии NS-B50027-4. Потомство или потомки могут быть получены способами селекции или тканевой культуры, которые известны специалистам в данной области техники. Например, потомство или потомки могут содержать профиль жирных кислот канолы, разработанный в этих линиях.

Соответственно потомки или потомство могут иметь любое количество генов из разработанных линий. Потомки или потомство могут содержать только те гены, которые обеспечивают фенотип жирных кислот канолы, представленный в настоящем документе, или дополнительные гены. Это может быть определено молекулярным анализом, как известно специалистам в данной области техники.

В одном аспекте изобретение относится к способу получения семян *Brassica napus*, имеющих тот же фенотип, что и NS-B50027-4. Например, содержание жирной кислоты ДНА в семенах NS-B50027-4 составляет по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 8%, по меньшей мере около 9%, по меньшей мере около 10% ДНА, по меньшей мере около 11% ДНА, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15% или более ДНА (% жирных кислот). Например, содержание LC-PUFA жирных кислот в семенах NS-B50027-4 составляет по меньшей мере около 10% LC-PUFA, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18% или более LC-PUFA (сумма EPA, DPA, ДНА в % жирных кислот).

В другом аспекте изобретение относится к гомогенной совокупности измельченных семян *Brassica napus*, полученных из растений, описанных в настоящем документе, где измельченные семена *B. napus* имеют по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, такое как от около 36% до около 40% включительно по массе общего содержания жирных кислот (мас.% семян). В конкретных вариантах выполнения изобретения, например, содержание жирных кислот в гомогенной совокупности измельченных семян *B. napus* включает по меньшей мере около 7% ДНА, по меньшей мере около 8% ДНА, по меньшей мере около 9% ДНА, по меньшей мере около 10% ДНА, по меньшей мере около 11% ДНА, по меньшей мере около 12% ДНА, по меньшей мере около 13% ДНА, по меньшей мере около 14% ДНА, по меньшей мере около 15% ДНА или более ДНА (% жирных кислот). В конкретных вариантах выполнения изобретения, например, содержание жирных кислот в гомогенной совокупности измельченных семян *B. napus* включает по меньшей мере около 8% LC-PUFA, по меньшей мере около 9% LC-PUFA, по меньшей мере около 10% LC-PUFA, по меньшей мере около 11% LC-PUFA, по меньшей мере около 12% LC-PUFA, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14% LC-PUFA, по меньшей мере около 15% LC-PUFA, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18% или более LC-PUFA (сумма EPA, DPA, ДНА в % жирных кислот). Изобретение также относится к маслу и шроту из таких измельченных семян.

Изобретение также относится к гомогенной совокупности измельченных семян линии NS-B50027-4 или гомогенной совокупности измельченных семян *B. napus* от потомства или потомка NS-B50027-4, где измельченные семена имеют содержание ДНА по меньшей мере около 7% ДНА, по меньшей мере около 8% ДНА, по меньшей мере около 9% ДНА, по меньшей мере около 10% ДНА, по меньшей мере около 11% ДНА, по меньшей мере около 12% ДНА, по меньшей мере около 13% ДНА, по меньшей мере около 14% ДНА, по меньшей мере около 15% ДНА или более ДНА (% жирных кислот). Например, гомогенная совокупность измельченных семян *Brassica napus* NS-B50027-4 или гомогенная совокупность измельченных семян *B. napus* из потомства или потомка NS-B50027-4, где гомогенная совокупность измельченных семян содержит по меньшей мере около 8% LC-PUFA, по меньшей мере около 9% LC-PUFA, по меньшей мере около 10% LC-PUFA, по меньшей мере около 11% LC-PUFA, по меньшей мере около 12% LC-PUFA, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14% LC-PUFA, по меньшей мере около 15% LC-PUFA, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18% или более LC-PUFA (сумма EPA, DPA, ДНА в виде % жирных кислот). Изобретение также относится к маслу и шроту из таких измельченных семян.

В другом аспекте, описанном в настоящем документе, изобретение относится к способу получения масла или шрота из линии *Brassica napus* NS-B50027-4, репрезентативные семена которой были депонированы под номером доступа ATCC PTA-123186, подлинии NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинии, или растения, полученного скрещиванием NS-B50027-4 со вторым растением канолы или *Brassica*, включающему выращивание растения, описанного выше, в условиях выращивания растения *Brassica*; сбор семян; и экстракцию масла или шрота.

В другом аспекте, описанном в настоящем документе, описан способ получения масла из линии NS-B50027-4 *Brassica napus*, репрезентативные семена которой были депонированы под номером доступа

АТСС РТА-123186, подлинный NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинный, или растения, полученного путем скрещивания NS-B50027-4 со вторым растением Brassica, включающему дробление семян линии NS-B50027-4, репрезентативные семена которой были депонированы под номером доступа АТСС РТА-123186, подлинный NS-B50027-4, потомства NS-B50027-4 или подлинный, или растения, полученного скрещиванием NS-B50027-4 со вторым растением канолы или Brassica; и экстракцию масла из указанных семян.

В другом аспекте изобретение относится к шроту и белку, а также маслу из семени NS-B50027-4 или семени, полученному от потомства NS-B50027-4. Извлечение белка из растительной биомассы может быть осуществлено известными способами. См., например, Непеу & Отг, 114 Anal. Biochem., 92 (1981). Шрот из NS-B50027-4 может оказаться особенно предпочтительным, поскольку он содержит по меньшей мере некоторое количество ДНА и других $\omega 3$ жирных кислот. Аналогично белковая фракция из NS-B50027-4 содержит по меньшей мере некоторые полезные ДНА и другие $\omega 3$ жирные кислоты.

Несмотря на более низкое содержание олеиновой кислоты, чем в маслах, в которых, как утверждается, есть устойчивость к ДНА и другим LC-PUFA благодаря высокому содержанию олеиновой кислоты, масло LC-PUFA $\omega 3$ жирных кислот из семян NS-B50027-4 демонстрирует неожиданную стабильность. Более конкретно, LC-PUFA $\omega 3$ жирные кислоты являются общеизвестно нестабильными и особенно подвержены окислению. В данной области техники специалистам понятно, что инкапсулирование, смешивание с другими маслами, в частности маслами с высоким содержанием олеиновой кислоты, или добавление антиоксидантов необходимы для продления срока годности LC-PUFA и пищевых продуктов, содержащих LC-PUFA. Однако несмотря на отсутствие такой обработки некоторые данные свидетельствуют о том, что сырое масло, извлеченное из измельченного семени NS-B50027-4, сохраняет свежесть в течение нескольких месяцев при комнатной температуре.

В другом аспекте настоящие варианты выполнения изобретения относятся к источнику ДНА и LC-PUFA для применения в пищевых добавках и продуктах питания для людей и животных, не являющихся людьми. В частности, масло из семян NS-B50027-4 обеспечивает устойчивый источник ДНА и LC-PUFA для применения в аквакультуре. Из-за высокого мирового спроса на рыбу и, как следствие, чрезмерного вылова рыбы в море, морская и пресноводная аквакультура приобретают все большее значение. Betancor et al., 4, Sci. Rep., 8104 (2014). Например, выращивание и потребление лососевых рыб резко возросло за последние 20 лет. Однако рацион диких рыб сильно отличается от рациона таковых видов в аквакультуре. Фактически аквакультура все еще в значительной степени зависит от морского рыболовства, которое обеспечивает ключевые питательные вещества, такие как рыбная мука и рыбный жир. Действительно рыбная мука и рыбный жир являются основными источниками $\omega 3$ -LC PUFA в аквакультуре. Поскольку рыбный жир содержит ограничивающий фактор для быстро растущей рыбной отрасли (от 5 до 10% в год), диеты для аквакультуры содержат широкий спектр альтернативных растительных ингредиентов, таких как семена бобовых, маслосеменной жмых, жмых листьев и увеличение порции растительного масла. Замена рыбьего жира растительными маслами с традиционно низким содержанием LC-PUFA означает, что в рационе рыб доступно меньше LC-PUFA, хотя некоторые масла, такие как льняное масло, содержат некоторое количество ALA, которое может быть преобразовано, хотя только в ограниченной степени, в метаболиты LC у рыб. В целом существующие растительные масла в кормах для рыб могут оказывать вредное влияние на распределение FA в рыбе и могут изменять соотношение $\omega 3/\omega 6$.

Например, типичные растительные масла содержат большое количество $\omega 6$ PUFA, главным образом, в виде линолевой кислоты (C18:2 $\omega 6$; LA). Масло из родительской линии AV Jade не содержит ДНА, следовательно, нет соотношения ДНА:LA; масло из NS-B50027-4 имеет соотношение ДНА:LA 1,048; по сравнению с маслом из выращенного на ферме лосося, имеющего соотношение ДНА:LA 0,908. Strobel et al., 11, Lipids Health Dis., 144 (2012). Интересно, что соотношения $\omega 3$ FA из NS-B50027-4 особенно выгодны в отношении пальмитиновой кислоты, насыщенной жирной кислоты, ассоциируемой 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 имеет ДНА и, следовательно, не имеет отношения ДНА:пальмитат; масло из NS-B50027-4 имеет соотношение ДНА:пальмитат 2,122; для сравнения масло лосося, выращенного на ферме, имеет соотношение ДНА:пальмитат 0,591; и масло дикого лосося имеет соотношение ДНА:пальмитат 1,018. Strobel et al., 2012. Получение кормов для аквакультуры, включающих LC-PUFA, в данной области техники известно. См. Betancor et al., 2014; Petrie et al., 9 PLOS ONE, 1, 2014; Tocher, Aquaculture (2015). Следовательно, объем настоящих вариантов выполнения изобретения охватывает применение масла из NS B50027-4 в качестве источника $\omega 3$ жирных кислот для корма для аквакультуры и корма для аквакультуры, содержащего масло, полученное из NS-B50027, и его потомства.

Идентификация NS-B50027-4 и его потомства.

Элитное генетическое событие может характеризоваться расположением(ями) и конфигурацией в месте(ах) включения молекулы(молекул) рекомбинантной ДНК в геном растения. Сайт в геноме расте-

ния, в который была вставлена кассетой рекомбинантной ДНК, также называется "сайтом вставки" или "сайтом-мишенью". "Фланкирующая область" или "фланкирующая последовательность" представляет собой область ДНК, например по меньшей мере 20 пар оснований, по меньшей мере 50 пар оснований или вплоть до 5000 пар оснований генома растения, расположенных как непосредственно перед, так и смежно или непосредственно ниже и смежно с трансгенной кассетой. Трансформация, которая приводит к случайной интеграции чужеродной ДНК, приводит к трансформантам с различными фланкирующими областями, которые характерны и уникальны для каждого трансформанта (элитное событие).

В другом аспекте изобретение относится к способу получения растения *Brassica napus*, полученного из NS-B50027-4, или его частей, включающему

скрещивание растения *Brassica napus* или его частей, описанных выше, со вторым растением для получения потомства первого поколения;

выращивание указанного потомства первого поколения для получения растения поколения F1;

необязательно повторение этапов скрещивания и выращивания для получения последовательных дочерних поколений указанного семени для получения линии размножения семян, растения или их частей, полученных из NS-B50027-4 *Brassica napus*.

Растение или части растения (включая любой гибрид), полученные этим способом, также являются предметом изобретения. В одном варианте выполнения изобретения генетический признак, который был встроен в геном конкретного растения канолы, может быть перемещен в геном другого культивара с применением традиционных методик селекции, которые хорошо известны в области селекции растений. Например, подход обратного скрещивания может применяться для перемещения трансгена из трансформированного культивара канолы в уже разработанный культивар канолы и полученное в результате обратного скрещивания растение будет содержать трансген(ы).

Соответственно в другом аспекте настоящие варианты выполнения изобретения относятся к композиции, способам и наборам для обнаружения NS-B50027-4. Было бы полезно иметь возможность обнаруживать присутствие определенного события, чтобы определить, содержит ли потомство полового скрещивания интересующий трансген. Кроме того, способ обнаружения конкретного события будет полезен для соблюдения правил, требующих, например, предпродажного одобрения и маркировки пищевых продуктов, полученных из рекомбинантных сельскохозяйственных культур. Присутствие трансгена можно обнаружить любым известным способом обнаружения нуклеиновых кислот, таким как полимеразная цепная реакция (PCR) или гибридизация ДНК с использованием зондов нуклеиновых кислот. Эти способы обнаружения обычно фокусируются на часто используемых генетических элементах, таких как промоторы, терминаторы, маркерные гены и т.д. В результате такие способы могут оказаться бесполезными для различения между различными событиями, особенно теми, которые получены с использованием одной и той же конструкции ДНК, если только последовательность хромосомной ДНК, примыкающая к вставленной ДНК ("фланкирующая ДНК"), известна. Были описаны анализы PCR для конкретных событий. См., например, Windels et al. (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent, 64/5b: 459-462, 1999) (идентификация события, толерантного к глифосату соевых бобов, с помощью PCR с использованием набора праймеров, охватывающего границу между вставкой и фланкирующей ДНК, в частности одного праймера, который включал последовательность из вставки, и второго праймера, который включал последовательность из фланкирующей ДНК). Кроме того, вставка из шестнадцати генов NS-B50027-4 нарушала экспрессию гена *Brassica*, кодирующего Pto-взаимодействующий белок (PTI), серин-треонинкиназу, участвующую в передаче сигнала, опосредованного гиперчувствительным ответом, расположенную на хромосоме A05. Хотя никаких фенотипических изменений не наблюдалось, это изобретение обеспечивает еще один маркер для идентификации NS-B50027-4 или потомства, полученного от NS-B50027-4.

Способы и наборы по настоящему документу пригодны для идентификации присутствия в биологических образцах растительного материала, включающего, 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 можно охарактеризовать с помощью профиля генетического маркера, который может идентифицировать растения того же культивара или родственного культивара или применяться для определения или подтверждения родословной. Профили генетического маркера могут быть получены такими методиками, как полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), случайно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (AP-PCR), отпечаток амплификации ДНК (DAF), амплифицированные области с характеристикой последовательности (SCAR), амплифицированные полиморфизмы длины фрагментов (AFLP), простые повторы последовательности (SSR), которые также называют микросателлитами, и одиночные нуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Например, элитное событие NS-B50027-4, описанное в настоящем документе, может быть идентифицировано путем создания генетической карты из образца растительного материала. Генетическая карта может быть сгенерирована обычным RFLP, анализом полимеразной цепной реакции (PCR) или SSR, в котором идентифицируется приблизительное хромосомное положение интегрированной молекулы ДНК, кодирующей чужеродный белок. См. Glick & Thompson, METHODS IN PLANT MOLEC. BIOL. & BIO-

TECHNOL. 269 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1993). Информация на карте, касающаяся расположения хромосом, полезна для патентной защиты рассматриваемого трансгенного растения. Например, карту области интеграции можно сравнить с аналогичными картами для подозрительных растений, чтобы определить, имеют ли последние общее происхождение с рассматриваемым растением. Сравнение карт может включать в себя гибридизацию, RFLP, PCR, SSR и секвенирование, которые все являются традиционными методиками.

В другом аспекте настоящие варианты выполнения изобретения относятся к наборам и способам для определения, является ли растение канолой или относится ли оно к инбредной линии NS-B50027-4, 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 простых и однозначных методик 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. См. табл. 2. Конкретные варианты выполнения праймеров включают следующие праймеры, применяемые в наборах для проведения анализов KASP для выявления генетических признаков NS-B50027-4, особенно полезных для исследований интрогрессии и гибридного развития. См. пример 2. Эти праймеры могут состоять из молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере десять последовательных нуклеиновых кислот следующей последовательности:

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO:1, Micopu-Δ6D); GCTAAGAAGTGGGGACTCAACTACAA (SEQ ID NO:2, Micopu-Δ6D); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTCTTGCTGGAACCTTGG (SEQ ID NO:3, Pyrcο-Δ5E); GGGTTAGCCACATTGTAGGTAACGTA (SEQ ID NO:4, Pyrcο-Δ5E); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAAGAGACACCCTGGTGAAAGA (SEQ ID NO:5, Pavsa-Δ5D); TAGCATCAGTTCCAACCTGGTAAGCAAT (SEQ ID NO:6, Pavsa-Δ5D); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAACACGTAAGCAGACCAAGCAG (SEQ ID NO:7, Picpa-ω3D); CCTCTTCTCCCTAACGAATTCCTT (SEQ ID NO:8, Picpa-ω3D); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGGAACCTGTTGCTGCTGATGA (SEQ ID NO:9, Pavsa-Δ4D); GCGATCCTAGCACAAAGTTGAAGGTA (SEQ ID NO:10, Pavsa-Δ4D); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATGGATCGCTTACCTCTTCGT (SEQ ID NO:11, Lackl-Δ12D); CAGGGTAAGGTTGCTGTAACGTT (SEQ ID NO:12, Lackl-Δ12D); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTATTGGATGGGGACTCAAGC (SEQ ID NO:13, Pyrcο-Δ6E); GGGAGATCCTTAGTAGCAGAAGAGAT (SEQ ID NO:14, Pyrcο-Δ6E); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGAGAGGCGCTCTGTTGAAAT (SEQ ID NO:15, PAT); AACAGCAGCCATATCAGCAGCAGTA (SEQ ID NO:16, PAT); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGTCTTGGGTGGGTCTGTCCTTC (SEQ ID NO:17; A05 Инсерционная граница 1); GAAGGTGGAGTCAACGGATTGTGTTCTTGGGTGGGTCTGTCCTTA (SEQ ID NO:18, A05 Инсерционная граница 1); ATCCACTAGCAGATTGTCGTTTCCC (SEQ ID NO:19, A05 Инсерционная граница 1); GTTGGCTAAGGTCACGGTGGAG (SEQ ID NO:20, A05 Инсерционная граница 1); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGCCTCAGTTTAAACTATCAGTGTT (SEQ ID NO:21, A05 Инсерционная граница 1); GAAGGTGGAGTCAACGGATTGGTCACGGTGGAGGTCACCA (SEQ ID NO:22, A05 Инсерционная граница 1); GGTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG (SEQ ID NO:23, A05 Инсерционная граница 1); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTTTTTTTTCAACTGTTGGCTAAGGTA (SEQ ID NO:24, A05 Инсерционная граница 2); GAAGGTGGAGTCAACGGATTACTTTTTTTTCAACTGTTGGCTAAGGTC (SEQ ID NO:25, A05 Инсерционная граница 2); GTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG (SEQ ID NO:26, A05 Инсерционная граница 2); GTCGTTTCCCGCCTCAGTTT (SEQ ID NO:27, A05 Инсерционная граница 2);

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAACTATCAGTGTTTGAACACCTCC (SEQ ID NO:28, A02 Инсерционная граница 1); GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTACAACCTTGTCTGCTACACACCT (SEQ ID NO:29, A02 Инсерционная граница 1); GGTTGTGTGAAAACGTGTGAGC (SEQ ID NO:30, A02 Инсерционная граница 1); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTAGCTAAATAAGAGGTTCTGTATACT (SEQ ID NO:31, A02 Инсерционная граница 2); GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTCTTTAGCTAAATAAGAGGTTCTGTATACA (SEQ ID NO:32, A02 Инсерционная граница 2); GATTGTGATCCGGGCAGT (SEQ ID NO:33, A02 Инсерционная граница 2); GTGTGAAAACGTGTGAGCAAT (SEQ ID NO:34, A02 Инсерционная граница 2); GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGTGATCCGGGCAGTAG (SEQ ID NO:35, A02 Инсерционная граница 2); GAAGGTCCGGAGTCAACGGATTTGTGAGCAATTGTTGGAGGT (SEQ ID NO:36, A02 Инсерционная граница 2); TCTTATCAACATTAAGAACATAATCTTTAG (SEQ ID NO:37, A02 Инсерционная граница 2); или их комплементы.

В настоящем изобретении также предлагаются способы идентификации элитного события NS-B50027-4 растения канола, включающие

(a) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК растения канола и первый и второй праймер нуклеиновой кислоты, способные амплифицировать специфическую молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновых кислот амплифицировать специфическую молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4; и

(c) обнаружение присутствия амплифицированного фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты, где присутствие специфической молекулы нуклеиновой кислоты с элитным событием NS-B50027-4 канолы указывает на то, что растение канола является растением канола с NS-B50027-4.

В другом варианте выполнения изобретение относится к способам обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты с элитным событием NS-B50027-4 в биологическом образце, включающим

(a) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК и зонд нуклеиновой кислоты, способной гибридизоваться со специфической молекулой нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют зонду гибридизоваться со специфической молекулой нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4; и

(c) обнаружение присутствия гибридизованной молекулы нуклеиновой кислоты, где присутствие специфической молекулы нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4 указывает на то, что образец содержит молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4.

Еще один вариант выполнения изобретения относится к способам обнаружения присутствия специфической молекулы нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4 в биологическом образце, включающим

(a) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК и первый праймер, способный ренатурировать область вставки в молекулу нуклеиновой кислоты события NS-B50027-4, и второй праймер, способный ренатурировать фланкирующую молекулу нуклеиновой кислоты в геноме клетки-хозяина;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновых кислот продуцировать амплифицированную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую фрагмент вставки события NS-B50027-4 молекулы нуклеиновой кислоты; и

(c) обнаружение присутствия амплифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом наличие молекулы нуклеиновой кислоты со вставкой события NS-B50027-4 указывает на то, что образец содержит ДНК со вставкой события NS-B50027-4.

Надлежащее тестирование должно выявить любые серьезные ошибки и установить степень превосходства или улучшения по сравнению с существующими культиварами. Помимо высокой производительности, спрос должен быть на новый культивар, совместимый с промышленными отраслевыми стандартами или создающий новый рынок. Введение нового культивара повлечет за собой дополнительные расходы для производителя семян, растениевода, переработчика и потребителя на специальную рекламу и маркетинг, практики изменения производства семян и коммерческого производства, а также использования нового продукта. Тестирование, предшествующее выпуску нового культивара, должно учитывать затраты на исследования и разработки, а также техническое превосходство конечного культивара. Для размножающихся семенами культиваров должно быть возможно производить семена легко и экономично.

Например, набор может содержать по меньшей мере один набор смысловых (прямых) праймеров и антисмысловых (обратных) праймеров, специфичных для $\Delta 6$ -десатуразы, полученной из микроводоросли *Micromonas pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазы, полученной из микроводоросли *Pyramimonas cordata*, $\Delta 5$ -десатуразы, полученной из морской микроводоросли *Pavlova salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Pichia pastoris*, $\Delta 4$ -десатуразы, полученной из *Pavlova salina*, или $\Delta 12$ -десатуразы, полученной из дрожжей *Lachancea kluyveri* (см., например, табл. 2); и по меньшей мере один набор праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной ДНК хромосомы A02 Brassica, такой как граница нуклеотидов от 2033 до 2132 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 43 п.о. вставки и 57 п.о. ДНК хромосомы Brassica A02, или по меньшей мере один набор праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной ДНК хромосомы A02 Brassica, такой как граница нуклеотидов от 14156 до 14255 SEQ ID NO: 40, область 100 п.о., содержащая 46 п.о. вставки и 54 п.о. ДНК хромосомы Brassica A02; по меньшей мере один набор праймеров, специфичных для границы 5' между вставкой и нативной ДНК хромосомы A05 Brassica, такой как граница нуклеотидов с 1110 по 1209 SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., включающая 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica, или по меньшей мере один набор праймеров, специфичных для границы 3' между вставкой и нативной ДНК хромосомы A05 Brassica, такой как граница нуклеотидов от 47724 до 47823 SEQ ID NO: 41, область 100 п.о., включающая 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica.

Условия амплификации для способов, в которых используют праймеры ДНК для получения ампликоновой диагностики для события NS-B50027-4, известны специалистам в данной области техники. Кроме того, пара контрольных праймеров для амплификации эндогенного гена канолы включена в качестве внутреннего стандарта для условий реакции и дает ампликон приблизительно из 100-5000 нуклеотидов. Анализ образца ткани растения события NS-B50027-4 должен включать положительный контроль ткани от события NS-B50027-4, отрицательный контроль растения канолы, который не является событием NS-B50027-4, и отрицательный контроль, который не содержит шаблон ДНК канолы. Дополнительные праймеры могут быть выбраны из границ, показанных в SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, специалистами в области способов амплификации ДНК, как и условия, оптимизированные для получения ампликона, который может быть любым, который приведет к диагностике ампликона для NS-B50027-4. Применение этих последовательностей праймеров ДНК с модификациями входит в объем вариантов выполнения изобретения, описанных в настоящем документе. Ампликон, полученный с использованием по меньшей мере одной последовательности праймера, полученной из SEQ ID NO: 47, или по меньшей мере одной последовательности праймера, полученной из SEQ ID NO: 48, или по меньшей мере одной последовательности праймера, полученной из SEQ ID NO: 49, или по меньшей мере одной последовательности праймера, полученной из SEQ ID NO: 50, которые при использовании в способе PCR приводят к диагностике ампликона для события NS B50027-4, может применяться в описанных способах и является аспектом настоящих вариантов выполнения изобретения. Получение ампликона события NS-B50027-4 можно проводить с использованием термоциклера или способами и устройствами, известными специалистам в данной области техники.

В настоящем изобретении также предлагаются способы идентификации элитного события NS-B50027-4 растения канолы, включающие

(а) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК растения канолы и первый и второй праймер нуклеиновой кислоты, способные амплифицировать специфическую молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновых кислот амплифицировать специфическую молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4; и

(с) обнаружение присутствия амплифицированного фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты, где присутствие специфической молекулы нуклеиновой кислоты с элитным событием NS-B50027-4 канолы указывает на то, что растение канолы является растением канолы с NS-B50027-4.

В другом варианте выполнения изобретение относится к способам обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты с элитным событием NS-B50027-4 в биологическом образце, включающим

(а) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК и зонд нуклеиновой кислоты, способный гибридизоваться со специфической молекулой нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют зонду гибридизоваться со специфической молекулой нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4; и

(с) обнаружение присутствия гибридизованной молекулы нуклеиновой кислоты, где присутствие специфической молекулы нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4 указывает на то, что образец содержит молекулу нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4.

Еще один вариант выполнения изобретения относится к способам обнаружения присутствия специфической молекулы нуклеиновой кислоты с событием NS-B50027-4 в биологическом образце, включающим

(а) формирование смеси, содержащей биологический образец, содержащий ДНК и первый праймер,

способный ренатурировать область вставки события NS-B50027-4 молекулы нуклеиновой кислоты, и второй праймер, способный ренатурировать фланкирующую молекулу нуклеиновой кислоты в геноме клетки-хозяина;

(b) реакцию смеси в условиях, которые позволяют первому и второму праймерам нуклеиновых кислот продуцировать амплифицированную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую фрагмент вставки события NS-B50027-4 молекулы нуклеиновой кислоты; и

(c) обнаружение присутствия амплифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом наличие молекулы нуклеиновой кислоты со вставкой события NS-B50027-4 указывает на то, что образец содержит вставку ДНК с событием NS-B50027-4.

Потомство.

Линия NS-B50027-4, описанная в настоящем документе, также может быть использована для разведения других линий. Например, исходные материалы могут самоопыляться, подвергаться перекрестному скрещиванию, обратному скрещиванию, использоваться для получения двойных гаплоидов, использоваться в качестве исходных материалов для генетической трансформации, подвергаться генетической трансформации, подвергаться дальнейшей мутагенезации и использоваться для других форм селекции, известным специалистам в данной области техники. Способы и результаты применения исходного материала для селекции других линий также находятся в пределах объема этих вариантов выполнения изобретения.

С появлением молекулярно-биологических методик, которые позволили выделить и охарактеризовать гены, кодирующие специфические белковые продукты, ученые в области биологии растений проявили большой интерес к инжинирингу генома растений на содержание и экспрессию чужеродных генов, или дополнительных, или модифицированных версий нативных или эндогенных генов (возможно, управляемых разными промоторами), для того чтобы изменить признаки растения определенным образом. Любые последовательности ДНК, будь то из разных видов или из одного и того же вида, которые вводятся в геном с применением трансформации или различных способов размножения, в настоящем документе совместно именуется "трансгенами". За последние 15-20 лет было разработано несколько способов получения трансгенных растений, и настоящее изобретение, в частности варианты выполнения изобретения, также относится к трансформированным вариантам 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 от конца 5' кодирующей области и по меньшей мере около 200 нуклеотидов последовательности ниже от конца 3' кодирующей области гена. Менее распространенные основания, такие как инозин, 5-метилцитозин, 6-метиладенин, гипоксантин и другие, также могут быть использованы для спаривания антисмысловых, дсРНК и рибозимов. Например, было показано, что полинуклеотиды, которые содержат C-5 пропиновые аналоги уридина и цитидина, связывают РНК с высокой аффинностью и являются мощными антисмысловыми ингибиторами экспрессии генов. Также могут быть изготовлены другие модификации, такие как модификация фосфодиэфирного остова или 2'-гидрокси в рибозо-сахарной группе РНК. Антисмысловые полинуклеотиды и рибозимы могут состоять исключительно из рибонуклеотидов или могут содержать смешанные рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. Полинуклеотиды по изобретению могут быть получены любыми способами, включая геномные препараты, препараты кДНК, синтез *in vitro*, RT-PCR и транскрипцию *in vitro* или *in vivo*.

Трансформация растений включает конструирование вектора экспрессии, который будет функционировать в клетках растений. Такой вектор содержит ДНК, содержащую ген, который находится под контролем или функционально связан с регуляторным элементом (например, промотором). Вектор экспрессии может содержать одну или несколько таких функционально связанных комбинаций ген/регуляторный элемент. Вектор(ы) может(могут) быть в форме плазмиды и может использоваться отдельно или в комбинации с другими плазмидами для получения трансформированных растений канолы с применением способов трансформации, известных в данной области, для включения трансгенов в генетический материал растения(ий) канола, включая растения канола с NS-B50027-4.

Генетический признак, который был внедрен в конкретное растение канола с применением методик трансформации, может быть перенесен в другую линию с применением традиционных методик селекции, хорошо известных в области селекции растений. Например, растения, несущие элитное событие NS-B50027-4, могут, например, быть получены из семян, депонированных в АТСС. Такие растения могут быть далее размножены или использованы в традиционной схеме размножения для введения элитного события NS-B50027-4 в другие культивары того же вида растений. Депонированные семена относятся к виду *Brassica napus*. Тем не менее способы введения аллелей или трансгенов, расположенных в А-геноме или С-геноме от *B. napus* до *B. juncea*, хорошо известны в данной области и включают повторное обратное скрещивание. Подход обратного скрещивания может использоваться для перемещения трансгена из трансформированного растения канола в элитную инбредную линию, и полученное потомство включает трансген. Кроме того, если для трансформации используется инбредная линия, то трансгенные растения могут быть скрещены с другой линией для получения трансгенного гибридного растения канола. Ис-

пользуемый в настоящем документе термин "скрещивание" может относиться к простому скрещиванию X с Y или процессу обратного скрещивания в зависимости от контекста.

Различные генетические элементы могут быть дополнительно введены в геном растения с использованием трансформации. Эти элементы включают, но без ограничения, гены; кодирующие последовательности; индуцибельные, конститутивные и тканеспецифичные промоторы; энхансерные последовательности; и сигнальные и нацеливающие последовательности. Появление новых молекулярно-биологических методик позволило выделить и охарактеризовать генетические элементы со специфическими функциями, такими как кодирование специфических белковых продуктов. Ученые в области биологии растений проявили большой интерес к инжинирингу генома растений на содержание и экспрессию чужеродных генетических элементов, или дополнительных, или модифицированных версий нативных или эндогенных генетических элементов для изменения признаков растения специфическим способом. Любые молекулы ДНК, будь то из другого вида или из того же вида, вставленные в геном с применением трансформации, в настоящем документе совместно именуются "трансгенами". Процесс "трансформации" представляет собой вставку ДНК в геном. Было разработано несколько способов получения трансгенных растений, и настоящее изобретение в конкретных вариантах выполнения также относится к трансформированным вариантам заявленной линии NS-B50027-4 канолы.

Были разработаны многочисленные способы трансформации растений, включая биологические и физические протоколы трансформации растений. Кроме того, доступны векторы экспрессии и способы культивирования *in vitro* для трансформации клеток или тканей растений и регенерации растений. См., например, Miki et al., Procedures for introducing foreign DNA into plants, в METH. PLANT MOLEC. BIOL. & BIOTECHNOL., 63 (Glick & Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, 1993); Gruber et al., Vectors for plant transformation, id., R 89; Genetic transformation for the improvement of Canola, PROC. WORLD CONF. BIOTECHNOL. FATS & OILS INDUS, 43-46 (Am. Oil. Chem. Soc, Champaign, IL, 1988).

Наиболее распространенные типы трансформации растений включают конструирование вектора экспрессии. Такой вектор содержит молекулу ДНК, которая содержит кодирующую область под контролем или оперативно связанную с регуляторной областью, например промотором. Вектор экспрессии может содержать один или несколько генов и один или несколько регуляторных элементов. По меньшей мере одна из областей кодирования и их соответствующие регуляторные элементы могут быть расположены в противоположной ориентации внутри вектора, обеспечивая двоичный вектор. Теоретически расположение генов, восприимчивых к выключению генов в бинарной форме, может минимизировать выключение генов. Вектор(ы) может(могут) быть в форме плазмиды и может(могут) использоваться отдельно или в комбинации с другими плазмидами для получения трансформированных растений канолы с применением способов трансформации, известных в данной области, для включения трансгенов в генетический материал растения NS-B50027-4 или растения, полученного из NS-B50027-4.

Например, первоначальная трансформационная кассета, pJP3416_GA7-modB, включала семь генов, способных стимулировать накопление омега-3 жирных кислот в семенах канолы, и один селективируемый маркерный ген для содействия селекции предполагаемых трансгенных растений *in vitro*. См. WO 2013185184; патентная публикация США № 2015/0374654; Petrie et al., 6, Plant Meth., 8 (2010). Все экспрессированные гены являются синтетическими (оптимизированными по кодонам и синтезированными), следовательно, трансгенные молекулы ДНК не обнаруживаются ни в одном природном организме. Были описаны исходные последовательности, которые использовались в качестве шаблонов для оптимизации кодонов. 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 хорошо известно в данной области техники, функциональные генные промоторы представляют собой области ДНК, которые важны для транскрипции генов, но не кодируют функциональные продукты, такие как пептиды. Например, общий промотор для конститутивной экспрессии получен из вируса мозаики цветной капусты. Kay et al., 236 Sci., 1299 (1987); Coutu et al., 16, Transgenic Res., 771 (2007). Промоторы, находящиеся под контролем развития, включают промоторы, которые преимущественно инициируют транскрипцию в определенных тканях, таких как семена, листья, корни, волокна, сосуды ксилемы, трахеиды или склеренхима. Промоторы, имеющие особое значение, представляют собой "предпочтительные для семян" промоторы, которые инициируют транскрипцию преимущественно или только в семени. "Предпочтительные для семян" промоторы включают как "специфичные для семян" промоторы (такие промоторы действуют во время развития семян, как промоторы накопителей белков в семенах), так и промоторы "прорастания семян" (такие промоторы действуют во время прорастания семян). См. Thompson et al., 10, BioEssays, 108 (1989). Такие предпочтительные для семян промоторы включают, но без ограничения, Sim1 (индуцированное цитокинином сообщение); cZ19B1 (зеин 19 кДа кукурузы); milps (мио-инозит-1-фосфатсинтаза) (См. WO 2000/11177; и патент США № 6225529). Для двудольных специфичные для семян промоторы включают, но без ограничения, β-фазеолин, напин, β-конглицинин, соевый лектин, круциферин, конлинин 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 напин

V. napus (Stalberg et al., 23, *Plant Molec. Biol.*, 671 (1993)). См. также WO 2013185184.

"Индукцибельный" промотор представляет собой промотор, который находится под контролем окружающей среды. Примеры условий окружающей среды, которые могут влиять на индуцибельные промоторы, включают химический контроль (вызванный в присутствии определенных химических веществ), анаэробные условия или наличие света. Специфичные для ткани, предпочтительные для ткани (например, специфичные для семян) и индуцибельные промоторы составляют класс "неконституционных" промоторов. См. Ward et al., 22, *Plant Mol. Biol.*, 361 (1993); Meft et al., 90, *PNAS*, 4567 (1993) (индуцируемый медью); Gatz et al., 243, *Mol. Gen. Genet.*, 32 (1994) (индуцируемый антидотами гербицидов); Gatz et al., 227, *Mol. Gen. Genet.*, 229 (1991) (индуцируемый тетрациклином); Schena et al., 88, *PNAS*, 10421 (1991) (индуцируемый глюкокортикостероидами). См. также WO 2001016340 и обсуждаемые там промоторы.

"Конститутивный" промотор представляет собой промотор, который активен при большинстве условий окружающей среды. Типичные конститутивные промоторы включают промоторы из вирусов растений, такие как промотор 35S из Вируса Мозаики Цветной Капусты (CMV) (Odell et al., 313 *Nature* 810 (1985)), и промоторы из таких генов, как актин риса (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)); рЕМU (Last et al., 81, *Theor. Appl. Genet.*, 581 (1991)); MAS (Velten et al., 3, *EMBO J.*, 2723 (1984)) и гистон НЗ кукурузы (Lepetit et al., 231, *Mol. Gen. Genet.*, 276 (1992); Atanassova et al., 2, *Plant J.*, 291 (1992)). Промотор ALS, фрагмент 5' XbaI/NcoI структурного гена ALS3 *Brassica napus* (или нуклеотидная последовательность, сходная с указанным фрагментом XbaI/NcoI), обеспечивает другой конститутивный промотор. См. также WO 1996/30530 и обсуждаемые там промоторы. Промотор CMV также связан с пригодной энхансерной областью. См. WO 1996/30530 и WO 2013185184 и обсуждаемые в них промоторы.

Терминаторные области, которые включают сигналы полиаденилирования, необходимы для производства полных и стабильных молекул мРНК. Например, терминатор нопалин-синтазы (NOS) *A. tumefaciens* обеспечивает нужный терминатор. Bevan, 12, *Nucl. Acid Res.*, 8711 (1984); Rogers et al., *BIOTECHNOL. PLANT SCI.*, 219 (Acad. Press, Inc., New York, NY, 1985); Sanders et al., 15, *Nucl. Acids Res.*, 1543 (1987). Ряд регуляторных последовательностей использовали в комбинации для запуска и терминации транскрипции различных каскадов экспрессии.

Транспорт белка, продуцируемого трансгенами в субклеточный компартмент, такой как хлоропласт, вакуоль, пероксисома, глиоксисома, клеточная стенка или митохондрия, или для секреции в апопласт, осуществляется посредством функционального связывания нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность, с областью 5' или 3' гена, кодирующего интересующий белок. Нацеливающие последовательности на конце 5' или 3' структурного гена могут определять во время синтеза и процессинга белка, где кодируемый белок в конечном счете компартиментализируется.

Присутствие сигнальной последовательности направляет полипептид либо во внутриклеточную органеллу, либо в субклеточный компартмент, либо для секреции в апопласт. Многие сигнальные последовательности известны в данной области техники. 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); Calderon et al., 39, *Cell*, 499 (1984); Steifel et al., 2, *Plant Cell*, 785 (1990).

Векторы экспрессии обычно содержат по меньшей мере один генетический маркер, функционально связанный с регуляторным элементом (например, промотором), который позволяет трансформированным клеткам, содержащим маркер, либо восстанавливаться путем негативного отбора, т.е. ингибировать рост клеток, которые не содержат селективируемого маркерного гена, либо путем положительного отбора, т.е. скрининга на продукт, кодируемый генетическим маркером. Многие обычно используемые селективируемые маркерные гены для трансформации растений хорошо известны в области трансформации и включают, например, гены, которые кодируют ферменты, которые метаболически детоксифицируют селективный химический агент, который может представлять собой антибиотик или гербицид, или гены, которые кодируют измененную мишень, которая нечувствительна к ингибитору. Способы положительного отбора также известны в данной области техники.

Одним из обычно используемых селективируемых маркерных генов для трансформации растений является ген неомизинфосфотрансферазы 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 применяемым селективируемым маркерным геном является ген гигромицинфосфотрансферазы, 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 гентамицинацетилтрансферазу, стрептомицинфосфотрансферазу, аминогликозид-3'-аденилтрансферазу, детерминант устойчивости к блеомицину. Nayford 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, глюофосинат или бромоксинил. Co-mai 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 для трансформации растений, которые не имеют бактериального

происхождения, включают, например, дигидрофолатредуктазу мыши, 5-енолпирувиллицимат-3-фосфатсинтазу растения и ацетоллактатсинтазу растения. 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 для трансформации растений требуется скрининг предположительно трансформированных клеток растений, а не прямой генетический отбор трансформированных клеток по устойчивости к токсическому веществу, такому как антибиотик. Эти гены особенно полезны для количественной оценки или визуализации пространственного паттерна экспрессии гена в конкретных тканях, и их часто называют репортерными генами, поскольку они могут быть слиты с геном или регуляторной последовательностью гена для исследования экспрессии гена. Обычно используемые гены для скрининга предположительно трансформированных клеток включают α -глюкуронидазу (GUS), α -галактозидазу, люциферазу и хлорамфеникол, ацетилтрансферазу. Jefferson, R.A., *Plant. Mol. Biol.*, 5: 387 (1987); Teeri et al., *EMBO J.*, 8: 343 (1989); Koncz et al., *PNAS*, 84: 131 (1987); и DeBlock et al., *EMBO J.*, 3: 1681 (1984). В некоторых способах *in vivo* визуализации активности GUS не требуется разрушение растительных тканей. *Molecular Probes, Publication, 2908, IMAGE GREEN, 1-4* (1993); Naleway et al., 115, *J. Cell Biol.*, 151a (1991). Тем не менее способы *in vivo* визуализации активности GUS имели проблемы: они демонстрировали низкую чувствительность, высокий флуоресцентный фон и ограничения, связанные с использованием генов люциферазы в качестве селективируемых маркеров. Зеленый флуоресцентный белок (GFP) может быть использован в качестве маркера для экспрессии генов в прокариотических и эукариотических клетках. Chalfie et al., 263, *Sci.*, 802 (1994). GFP и мутанты GFP могут применяться в качестве скринируемых маркеров.

NS-B50027-4 и потомство NS-B50027-4 могут быть трансформированы для придания устойчивости к заболеваниям или вредителям. Например, линия растений может быть трансформирована с помощью клонированного гена устойчивости для получения растений, устойчивых к конкретным штаммам патогена. См., например, Jones et al., 266, *Sci.*, 789 (1994) (клонирование гена томата Cf-9 для устойчивости к *Cladosporium fulvum*); Martin et al., 262, *Sci.*, 1432 (1993) (ген томата Pto для устойчивости к *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, протеинкиназа); Mindrinos et al., 78, *Cell*, 1089 (1994) (ген *Arabidopsis RSP2* для устойчивости к *P. syringae*); Geiser et al., 48, *Gene*, 109 (1986) (ген 5-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*); Van Damme et al., 24, *Plant Mol. Biol.*, 25 (1994) (связывающий маннозу лектин *Clivia miniata*); Sumitani et al., 57, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1243 (1993) (ингибитор амилазы); Abe et al., 262, *J. Biol. Chem.*, 16793 (1987) (ингибитор цистеинпротеиназы); Huub et al., 21, *Plant Mol. Biol.*, 985 (1993) (ингибитор I табачной протеиназы); Regan, 269, *J. Biol. Chem.*, 9 (1994) (рецептор диуретического гормона насекомых); Pratt et al., 163, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1243 (1989) (аллостатин); Tomalski et al., патент США № 5266317 (специфичные для насекомых паралитические нейротоксины); Scott et al., WO 1993/02197 (ген каллазы); Kramer et al., 23, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 691 (1993) (хитиназа табачного червя); Kawalleck et al., 21, *Plant Mol. Biol.*, 673 (1993) (ген уби-4-2-полиубиквитина петрушки); WO 1995/16776 (производные тахиплезин-ингибирующих грибов); WO 1995/18855 (синтетические антимикробные пептиды); Jaynes et al., 89, *Plant Sci.*, 43 (1993) (цекропин- β , литический пептид делает трансгенные табачные растения устойчивыми к *Pseudomonas solanacearum*); Botella et al., 24, *Plant Mol. Biol.*, 24: 757 (1994) (калмодулин бобов мунг); Griess et al., 104, *Plant Physiol.*, 1467 (1994) (калмодулин кукурузы); Taylor et al., Abstract #497, 7th Int'l Symp. Molec. Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland (1994) (ферментативная инактивация в табаке через трансгенное одноцепочечное антитело); Tavladorakiet al., 366, *Nature*, 469 (1993) (вирусная устойчивость через трансгенное антитело); Lamb et al., 10, *Bio technol.*, 1436 (1992) (грибковые эндо- α -1,4-D-полигалактуроназные фрагменты способствуют колонизации грибами и высвобождению питательных веществ из растений путем солюбилизации клеточной стенки растений с помощью гомо- α -1,4-D-галактуроназы; Toubart et al., 2, *Plant J.*, 367 (1992) (белок, ингибирующий эндополигалактуроназу бобов); Logemann et al., 10, *Bio/technology*, 305 (1992) (трансгенные растения, экспрессирующие ген, инактивирующий рибосому ячменя, которые обладают повышенной устойчивостью к грибковым заболеваниям).

Как уже отмечалось, устойчивость к гербицидам является еще одним полезным признаком, который может быть введен путем генетической модификации. Например, устойчивость к гербицидам, которые ингибируют конус нарастания 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 обеспечивается генами *agoA* и генами мутантной 5-енолпирувиллицимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS); устойчивость к глюфосинату обеспечивается генами фосфинотрицин-ацетилтрансферазы; и устойчивость к пиридинокси- или феноксипропионовым кислотам и циклогексонам обеспечивается генами, кодирующими ингибитор АССазы. 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, *Transgenic Research*, 33 (1999) (*Lactuca sativa*, устойчивая к глюфосинату); Kumada et al., EP 0333033; Goodman et al., патент США № 4975374 (EPSPS придает 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 фосфинотрицин-ацетилтрансферазу); Marshall et al., 83, Theor. Appl. Genet., 435 (1992) (гены *Acc1-S1*, *Acc1-S2* и *Acc1-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 триазину); 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 ацетогидроксиацетата придает устойчивость к множественным гербицидам); Shiota et al., 106, Plant Physiol., 17 (1994) (дрожжевая NADPH-цитохром P450 оксидоредуктаза); Aono et al., 36, Plant Cell Physiol., 1687 (1995) (глутатионредуктаза и супероксиддисмутаза); Datta et al., 20, Plant Mol. Biol., 619 (1992) (различные фосфотрансферазы); WO 2001/12825; патенты США № 6288306; 6282837; 5767373 (растения с измененной активностью протока устойчивы к гербицидам, нацеленным на протоке).

NS-B50027-4 и потомство, полученное от NS-B50027-4, могут быть дополнительно модифицированы для придания любого количества ценных признаков, известных в данной области техники. См., например, Goto et al., 521, Acta Horticulturae, 101 (2000) (ген ферритина сои); Curtis et al., 18, Plant Cell Rep., 889 (1999) (нитратредуктаза); Knultzon et al., 89, PNAS, 2625 (1992) (стеарил-АСР-десатураза); Shiroza et al., 170, J. Bacteriol., 810 (1988) (нуклеотидная последовательность гена фруктозилтрансферазы *Streptococcus mutans*); Steinmetz et al., 20, Mol. Gen. Genet., 220 (1985) (*Bacillus subtilis* левансахарозный ген); 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 томатной инвертазы); Sngaard et al., 268, J. Biol. Chem., 22480 (1993) (сайт-направленный мутагенез гена α -амилазы ячменя); Fisher et al., 102, Plant. Physiol., 1045 (1993) (ветвящийся фермент II кукурузного эндосперма крахмала).

Линия NS-B50027-4 канолы также может быть обработана для обеспечения мужской стерильности любым из ряда способов, известных в данной области техники, включая применение механических способов, химических способов, самонесовместимости (SI), цитоплазматической мужской стерильности (CMS, либо *ogura*, либо другая система) или ядерного мужского бесплодия (NMS). Термин "манипулированный для того, чтобы обладать мужской стерильностью" относится к применению любых доступных методик для производства версии линии NS-B50027-4 канолы с мужской стерильностью. Мужская стерильность может быть частичной или полной мужской стерильностью. См., например, WO 2001/29237 (введение гена деацетилазы под контролем специфического для тапетума промотора и с применением химического N-Ас-PPT); WO 1992/13956, WO 1992/13957 (специфичные для тычинки промоторы); 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).

Были разработаны многочисленные способы трансформации растений, включая биологические и физические протоколы трансформации растений. См., например, WO 2013185184; Miki et al., в METHS. PLANT MOLEC. BIOL. BIOTECHNOL., 67-88 (Glick & Thompson, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993). Кроме того, для трансформации растительных клеток или тканей и регенерации растений доступны векторы экспрессии и способы культивирования *in vitro*. См., например, WO 2013185184; Gruber et al., METHS. PLANT MOLEC. BIOL. BIOTECHNOL., 89-119 (Glick & Thompson, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993). В одном из способов введения вектора экспрессии в растения применяется 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 растения); Gruber et al.; Miki et al.; Moloney et al., 8Ю Plant Cell Rep., 238 (1989) (системы векторов *Agrobacterium*, способы опосредованного *Agrobacterium* переноса генов); патент США № 5591616.

В качестве альтернативы для опосредованной *Agrobacterium* трансформации было разработано несколько способов трансформации растений, которые в совокупности называют прямым переносом генов. Общепринятым 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 с помощью биолистического устройства, которое ускоряет микрочастицы до скоростей от 300 до 600 м/с, что достаточно 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 техники. 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, векторы экспрессии, вводимые в ткани растения с применением способа прямого переноса гена, такого как опосредованная микрочастицами доставка с помощью биолистического устройства, инъекция ДНК, электропорация и т.п. После трансформации экспрессия описанных выше селективируемых маркерных генов может позволить предпочтительный отбор трансформированных клеток, тканей или растений с использованием способов регенерации и селекции, хорошо известных в данной области техники. См., например, WO 2013185184.

Вышеупомянутые способы трансформации обычно используются для получения трансгенной линии. Затем трансгенную линию можно скрестить с другой (нетрансформированной или трансформированной) линией для получения новой трансгенной линии канолы. Альтернативно генетический признак, встроенный в конкретную канолу или Brassica с применением хорошо известных методик трансформации, может быть введен в другую линию с применением традиционных методик обратного скрещивания, которые также хорошо известны в области селекции растений. Например, подход обратного скрещивания может применяться для перемещения сконструированного признака из общедоступной неэлитной инбредной линии в элитную инбредную линию или из инбредной линии, содержащей чужеродный ген в ее 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 к процессу обратного скрещивания в зависимости от контекста.

Когда термин "растение NS-B50027-4" используется в контексте настоящих вариантов выполнения изобретения, он также включает в себя любые преобразования генов этой линии. Термин "генно-конвертированное растение" относится к тем растениям NS-B50027-4, которые получены путем обратного скрещивания, генной инженерии или мутации, при этом по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики сорта восстанавливаются в дополнение к одному или нескольким генам, перенесенным в полученную от NS-B50027-4 линию с помощью методики обратного скрещивания, генной инженерии или мутации. Способы обратного скрещивания могут использоваться с настоящими вариантами выполнения изобретения для улучшения или введения характеристики в сорт. Используемый в настоящем документе термин "обратное скрещивание" относится к повторному скрещиванию гибридного потомства обратно к рекуррентному родителю, т.е. обратное скрещивание 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более раз к рекуррентному родителю. Родительское растение Brassica, которое вносит ген для желаемой характеристика, называется "нерекуррентным" или "родителем-донором". Эта терминология относится к тому факту, что рекуррентный родитель используется один раз в протоколе обратного скрещивания и поэтому не повторяется. Родительское растение Brassica, которому передаются ген или гены от нерекуррентного родителя, известно как рекуррентный родитель, поскольку оно используется для нескольких раундов в протоколе обратного скрещивания. Poehlman & Sleper, 1994; Fehr, 1993. В типичном протоколе обратного скрещивания исходный интересующий сорт (рекуррентный родитель) скрещивается со вторым сортом (нерекуррентным родителем), который несет интересующий ген, подлежащий передаче. Полученное потомство от этого скрещивания затем снова скрещивается с рекуррентным родителем, и процесс повторяется до тех пор, пока не будет получено растение канолы, в котором по существу все желаемые морфологические и физиологические характеристики рекуррентного родителя восстанавливаются в преобразованном растении в дополнение к переносу гена от нерекуррентного родителя.

Выбор подходящего рекуррентного родителя является важным шагом для успешной процедуры обратного скрещивания. Целью протокола обратного скрещивания является изменить или заменить признак или характеристику в исходной линии. Для этого ген рекуррентного культивара модифицируют или заменяют желаемым геном у нерекуррентного родителя, сохраняя при этом по существу все остальное желаемое генетическое и, следовательно, желаемые физиологические и морфологические характеристики исходной линии. Выбор конкретного нерекуррентного родителя будет зависеть от цели обратного скрещивания. Одна из основных целей состоит в том, чтобы добавить некоторые коммерчески желаемые, агрономически важные признаки растению. Точный протокол обратного скрещивания будет зависеть от характеристики или признака, которые будут изменяться, для определения соответствующего протокола тестирования. Хотя способы обратного скрещивания упрощаются, когда передаваемым признаком является доминантный аллель, рецессивный аллель также может быть перенесен. В этом случае может потребоваться ввести тестирование потомства, для того чтобы определить, была ли желаемая характеристика успешно перенесена.

Могут быть идентифицированы генные признаки, которые не регулярно отбираются при разработке новой линии, но которые могут быть улучшены с помощью методик обратного скрещивания. Генетические признаки могут быть трансгенными или нет. 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 питательных веществ, промышленное использование, стабильность урожая и повышение урожайности. Эти гены обычно наследуются через ядро. См., например, патенты США № 5969212; 7164059.

Дальнейшее размножение инбредной линии NS-B50027-4 может происходить путем тканевой куль-

туры и регенерации. Термин "тканевая культура" обозначает композицию, содержащую изолированные клетки того же или другого типа или коллекцию таких клеток, организованных в части растения. Типичными видами тканевых культур являются протопласты, каллусы, меристематические клетки и растительные клетки, которые могут генерировать тканевые культуры, которые интактны в растениях или частях растений, таких как листья, пыльца, эмбрионы, корни, кончики корней, пыльники, пестики, цветы, семена, черешки, присоски и т.п. Средства для подготовки и поддержания тканевой культуры растений хорошо известны в данной области техники. Тканевая культура различных тканей канолы и регенерация растений из них 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. Тканевая культура, а также культура микроспор для регенерации растений канолы может быть успешно достигнута. 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, другой аспект настоящих вариантов выполнения изобретения относится к клеткам, которые при росте и дифференцировке продуцируют растения канолы, имеющие физиологические и морфологические характеристики инбредной трансгенной линии NS-B50027-4.

Как правило, когда трансген вводится в растение путем традиционного скрещивания, его сайт вставки в геном растения и его фланкирующие области не изменяются. "Область вставки" относится к области, соответствующей области по меньшей мере из 40 пар оснований, такой как по меньшей мере 100 пар оснований или вплоть до более чем 10000 пар оснований, охватываемых фланкирующими областями выше и ниже по трансгену в (нетрансформированном) геноме растения, и включающей сайт вставки (и возможную делецию сайта-мишени). Принимая во внимание незначительные различия из-за мутаций в пределах вида, область вставки может сохранять по меньшей мере 85%, например такую как 90, 95 или 100%, идентичность последовательности с фланкирующими участками вверх и вниз по чужеродной ДНК в данном растении этого вида. Однако вставка трансгенной кассеты в геном растения иногда может быть связана с делецией ДНК растения, называемой "делецией сайта-мишени". Тем не менее дополнительные трансгены или другие генетические манипуляции могут быть сделаны в NS-B50027-4 без излишних экспериментов; и производные от NS-B50027-4 растения могут быть идентифицированы, как описано в настоящем документе.

Исходный материал NS-B50027-4 может быть использован для производства линий для получения гибридного семени, если он подвергается обратному скрещиванию с цитоплазматическим источником мужской стерильности или каким-либо другим источником для стерилизации инбредной линии как женской. В качестве альтернативы линия может быть использована напрямую. Например, линия NS-B50027-4 В. parus может быть скрещена с другим растением канолы с образованием популяции растений первого поколения F1. Популяция растений первого поколения F1, полученных этим способом, также является вариантом выполнения изобретения. Эта популяция растений первого поколения F1 содержит по существу полный набор аллелей линии NS-B50027-4 канолы. Обычно считается, что гибрид F1 имеет все аллели каждого из родителей. Специалист в данной области техники может использовать либо маточные книги, либо молекулярные способы для идентификации конкретного растения F1, полученного с использованием линии NS-B50027-4 канолы, и любое такое отдельное растение также охватывается этим изобретением. Эти варианты выполнения изобретения также охватывают применение этих способов с трансгенными или единичными преобразованиями генов линии NS-B50027-4.

В другом варианте выполнения это изобретение относится к способу использования линии NS-B50027-4 канолы в разведении, который включает повторное обратное скрещивание с линией NS-B50027-4 канолы любое количество раз. Используя трансгенные способы, описанные в настоящем документе, способы обратного скрещивания или другие способы разведения, известные специалисту в данной области техники, можно разработать отдельные растения и популяции растений, которые сохраняют 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 NS-B50027-4 канолы. Процент генетики, сохраняемой в потомстве, может быть измерен либо с помощью анализа происхождения, либо с применением генетических методик, таких как молекулярные маркеры или электрофорез. В анализе происхождения в среднем 50% исходной зародышевой плазмы передавалось бы линии потомства после одного скрещивания в другую линию, 25% после второго скрещивания в другую линию и т.д. Молекулярные маркеры также могут быть использованы для подтверждения и/или определения линии происхождения потомства.

Конкретный способ получения линии, полученной из линии NS-B50027-4 канолы, заключается в следующем. Специалист в данной области техники скрещивает линию NS-B50027-4 канолы с другим растением канолы, таким как элитная линия. Семя F1, полученное из этого скрещивания, выращивают с

образованием однородной популяции. Семя F1 содержит 50% аллелей из линии NS-B50027-4 канолы и 50% аллелей из другого растения. Семя F1 выращивают и позволяют развиваться, тем самым образуя семя F2. В среднем семя F2 получило 50% своих аллелей из линии NS-B50027-4 и 50% из другого растения канолы, но у различных отдельных растений из популяции гораздо больший процент их аллелей, полученных из события NS-B50027-4. Wang et al., 40, Crop Sci., 659 (2000); Bernardo et al., 102, Theor. Appl. Genet., 986 (2001). В данном контексте термин "популяция" относится к статистически репрезентативной выборке. Семя F2 выращивают и производят отбор растений на основе визуального наблюдения или измерения признаков. Признаками, используемыми для отбора, может быть признак высокой продукции ДНА в семенах канолы линии NS-B50027-4 канолы. Потомство, полученное от события NS-B50027-4, которое демонстрирует желательный признак, полученный от NS-B50027-4, селекционируют и каждое растение собирают отдельно. Это семя F3 из каждого растения выращивается в отдельных рядах и предоставляется самому себе. Затем выбранные ряды или растения из рядов собирают и обмолачивают по отдельности. Отборы снова основываются на визуальном наблюдении за фенотипом растений или на измерениях желательных признаков растений, таких как желательный признак, полученный из NS-B50027-4. Процесс выращивания и селекции повторяют любое количество раз, пока не получат инбредное растение канолы, полученное из NS-B50027-4.

Растение канолы, полученное из NS-B50027-4, содержит желательные признаки, полученные из линии NS-B50027-4 канолы, некоторые из которых, возможно, не были экспрессированы другим растением канолы, с которым была скрещена линия NS-B50027-4 канолы, а некоторые из них могли быть экспрессированы обеими линиями канолы, но теперь находятся на уровне, равном или превышающем уровень, экспрессированный в NS-B50027-4.

Растения канолы F1, полученная из NS-B50027-4, или Brassica имеют в среднем 50% своих генов, полученных из NS-B50027-4, но различные индивидуальные растения из популяции имеют гораздо больший процент аллелей, полученных из NS-B50027-4. Процесс размножения, скрещивания, самоопыления и селекции повторяется для получения другой популяции растений канолы, полученных из NS-B50027-4, в среднем с 25% их генов, полученных из линии NS-B50027-4 канолы, но различные отдельные растения из популяции имеют гораздо больший процент своих аллелей, полученных из NS-B50027-4. Другим вариантом выполнения изобретения является инбредное растение канолы, полученное из NS-B50027-4, которое получило желаемый признак с высоким содержанием ДНА из NS-B50027-4.

Предыдущий пример может быть модифицирован множеством способов, например селекция может происходить или не происходить при каждом самоопыляющемся поколении, селекция может происходить до или после фактического процесса самоопыления или индивидуальные селекции могут быть сделаны путем сбора отдельных стручков, растений, рядов или участков в любой точке во время описанного процесса разведения. Кроме того, способы двойного гаплоидного разведения могут применяться на любом этапе процесса. Популяция растений, продуцируемых в каждом поколении самоопыления, также является вариантом настоящих вариантов выполнения изобретения, и каждая такая популяция будет состоять из растений, содержащих приблизительно 50% ее генов из линии NS-B50027-4 канолы, 25% ее генов из линии NS-B50027-4 канолы во втором цикле скрещивания и селекции, 12,5% ее генов из линии NS-B50027-4 канолы во третьем цикле скрещивания и селекции и т.д.

В другом варианте выполнения изобретение относится к способу получения гомозиготного растения канолы NS-B50027-4, полученному путем скрещивания линии NS-B50027-4 канолы с другим растением канолы, и применения двойных гаплоидных способов к семени F1 или растению F1 или к любому поколению линии NS-B50027-4 канолы, полученному путем самоопыления этого скрещивания. Племенное разведение обычно используется для улучшения самоопыляющихся культур или инбредных линий перекрестноопыляющихся культур. Два родителя, которые обладают благоприятными, дополнительными признаками, скрещиваются с получением F1. Популяция F2 получается путем самоопыления одного или нескольких F1 или путем скрещивания двух F1 (скрещивания между сибсами). Отбор лучших индивидуумов обычно начинается в популяции F2. Затем, начиная с F3, отбираются лучшие индивидуумы из лучших семей. Повторное тестирование семей или гибридных комбинаций с участием индивидуумов из этих семей часто продолжается в поколении F4, для того чтобы повысить эффективность отбора признаков с низкой наследуемостью. На продвинутой стадии инбридинга (т.е. F6 и F7) лучшие линии или смеси фенотипически похожих линий тестируются на потенциальное высвобождение в качестве новых культур.

Кроме того, настоящие варианты выполнения изобретения направлены на способы получения растений канолы, полученных из NS-B50027-4, путем скрещивания линии NS-B50027-4 канолы с растением канолы и выращивания семян потомства и повторения скрещивания с этапами выращивания с полученным из NS-B50027-4 растением канолы от 1 до 2 раз, от 1 до 3 раз, от 1 до 4 раз или от 1 до 5 раз и самоопыление любое количество раз после первого, второго, третьего, четвертого или пятого скрещивания. Массовые и рекуррентные отборы могут применяться для улучшения популяций как самоопыляемых, так и перекрестноопыляемых культур. Генетически изменчивая популяция гетерозиготных индивидуумов либо идентифицируется, либо создается путем интеркроссинга нескольких разных родителей. Луч-

шие растения отбираются на основе индивидуального превосходства, выдающегося потомства или превосходной способности к комбинированию. Отобранные растения подвергают интеркроссингу для создания новой популяции, в которой продолжаются дальнейшие циклы селекции.

Возвратное скрещивание использовалось для передачи генов для просто наследуемого, высоко наследуемого признака в желаемый гомозиготный культивар или линию, которая является рекуррентным родителем. Источник передаваемого признака называется родителем-донором. Ожидается, что полученное растение будет иметь атрибуты рекуррентного родителя (например, культивара) и желаемый признак, передаваемый от родителя-донора. После первоначального скрещивания индивидуумы, обладающие фенотипом родителя-донора, отбираются и повторно скрещиваются (подвергаются обратному скрещиванию) с рекуррентным родителем. Ожидается, что полученное растение будет иметь атрибуты рекуррентного родителя (например, культивара) и желаемый признак, передаваемый от родителя-донора.

Процедура поколения от одного семени в строгом смысле означает посадку сегрегационной популяции, сбор образца одного семени на растение и использование образца одного семени для посадки следующего поколения. Когда популяция переходит от F2 к желаемому уровню инбридинга, растения, из которых получены линии, каждое будет проследиваться до различных индивидуумов F2. Количество растений в популяции уменьшается с каждым поколением из-за того, что некоторые семена не прорастают или некоторые растения дают по меньшей мере одно семя. В результате не все растения F2, первоначально отобранные в популяции, будут представлены потомством после завершения развития поколения.

Дополнительный вариант выполнения изобретения относится к конверсии одного гена NS-B50027-4. Конверсия генов происходит, когда последовательности ДНК вводятся с помощью традиционных (не трансформационных) методик разведения, таких как обратное скрещивание. Последовательности ДНК, будь то встречающиеся в природе или трансгены, могут быть введены с применением этих традиционных методик разведения. Желаемые признаки, передаваемые посредством этого процесса, включают без ограничения модификацию фертильности, модификацию профиля жирных кислот, другие улучшения пищевых характеристик, промышленные улучшения, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к насекомым, устойчивость к гербицидам и повышение урожайности. Интересующий признак передается от родителя-донора рекуррентному родителю, в данном случае описанному в настоящем документе растению канолы. Одиночные генные признаки могут быть результатом переноса либо доминантного аллеля, либо рецессивного аллеля. Отбор потомства, содержащего интересующий признак, осуществляется путем прямой селекции признака, связанного с доминантным аллелем. Отбор потомства по признаку, который передается через рецессивный аллель, требует выращивания и самоопыления первого обратного скрещивания для того, чтобы определить, какие растения несут рецессивные аллели. Рецессивные признаки могут потребовать дополнительного тестирования потомства в последующих поколениях обратного скрещивания для того, чтобы определить присутствие гена, представляющего интерес. Наряду с отбором по признаку, представляющему интерес, потомство отбирается по фенотипу рекуррентного родителя. Следует понимать, что иногда дополнительные полинуклеотидные последовательности или гены переносятся вместе с интересующим признаком конверсии одного гена. Потомство, содержащее по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% генов от рекуррентного родителя, раскрытого в настоящем документе растения канолы, а также содержащее признак конверсии генов, считается генно-преобразованным NS-B50027-4. Когда признак контролируется двумя генами (например, некоторая устойчивость к заболеваниям), селекция проводится одновременно для двух генов и т.д.

Мутационное разведение представляет собой другой способ введения новых признаков в сорта канолы. Мутации, которые возникают спонтанно или индуцированы искусственно, могут быть полезными источниками изменчивости для селекционера. Целью искусственного мутагенеза является увеличение скорости мутации для желаемой характеристики. Частота мутаций может быть увеличена различными способами, включая температуру, длительное хранение семян, условия культивирования тканей, радиацию (такую как рентгеновское излучение, гамма-излучение, нейтроны, бета-излучение или ультрафиолетовое излучение), химические мутагены (такие как аналоги оснований подобно 5-бромурацилу), антибиотики, алкилирующие агенты (такие как сернистый иприт, азотистый иприт, эпоксиды, этиленамины, сульфаты, сульфонаты, сульфоны или лактоны), азид, гидроксилламин, азотистая кислота или акридин. Как только желаемый признак обнаружен через мутагенез, этот признак затем может быть включен в существующую зародышевую плазму с помощью традиционных методик разведения. См., например, Fehr, PRINCIPLES CULTIVAR DEVEL. (Macmillan Publ Co., 1993).

Следует понимать, что линия канолы по настоящим вариантам выполнения изобретения может быть получена в мужской стерильной форме путем рутинных манипуляций с цитоплазматическими генами, ядерными генами или другими факторами, как описано в ссылках, обсужденных ранее. Такие варианты выполнения изобретения также находятся в пределах объема представленной формулы изобретения. Настоящие варианты выполнения изобретения, таким образом, обеспечивают гибридные F1 семена и растения, полученные с использованием линии NS-B50027-4 канолы.

Существует много лабораторных методик, доступных для анализа, сравнения и характеристики генотипа растений; к ним относятся изоферментный электрофорез, полиморфизм длин рестрикционных

фрагментов (RFLP), случайно амплифицированные полиморфные ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (AP-PCR), отпечаток амплификации ДНК (DAF), амплифицированные области с характеристикой последовательности (SCAR), амплифицированные полиморфизмы длины фрагментов (AFLP), простые повторы последовательности (SSR, также называемые микросателлитами) и одиночные нуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Изоферментный электрофорез и RFLP широко использовались для определения генетического состава. Shoemaker & Olsen (Molecular Linkage Map of Soybean (*Glycine max*), p. 6.131-6.138 in S. J. O'Brien (ed.) Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1993)) разработали карту молекулярно-генетических связей, которая состояла из 25 групп сцепления с около 365 RFLP, 11 RAPD, тремя классическими маркерами и четырьмя изоферментными локусами. См. также Shoemaker, R.C. RFLP Map of Soybean, p. 299-309, in Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (eds.), DNA-Based Markers in Plants, Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands (1994).

Технология SSR в настоящее время является эффективной и практичной маркерной технологией; можно использовать больше маркерных локусов и больше аллелей на маркерный локус, используя SSR, по сравнению с RFLP. См., например, Diwan & Cregan, 95 Theor. Appl. Genet. 22 (1997). SNP также могут быть использованы для идентификации уникальной генетической композиции по изобретению и сортам потомства, сохраняющих эту уникальную генетическую композицию. Различные методики молекулярных маркеров могут быть использованы в комбинации для улучшения общего разрешения. Молекулярные маркеры, которые включают маркеры, идентифицированные с помощью таких методик, как изоферментный электрофорез, RFLP, RAPD, AP-PCR, DAF, SCAR, AFLP, SSR и SNP, могут использоваться в разведении растений. Одним из применений молекулярных маркеров является картирование локусов количественных признаков (QTL). Картирование QTL представляет собой использование маркеров, которые, как известно, тесно связаны с аллелями, которые оказывают измеримое влияние на количественный признак. Селекция в процессе разведения основана на накоплении маркеров, связанных с положительно действующими аллелями, или удалении маркеров, связанных с отрицательно действующими аллелями, из генома растения.

Молекулярные маркеры также могут быть использованы в процессе селекции для отбора качественных признаков. Например, маркеры, тесно связанные с аллелями, или маркеры, содержащие последовательности в пределах фактических представляющих интерес аллелей, можно использовать для селекции растений, которые содержат представляющие интерес аллели, во время программы разведения с обратным скрещиванием. Маркеры также могут быть использованы для селекции в отношении генома рекуррентного родителя и против маркеров родителя-донора. В этой процедуре пытаются минимизировать количество генома от родителя-донора, которое остается в отобранных растениях. Она также может быть использована для уменьшения количества обратных скрещиваний с рекуррентным родителем, необходимых в программе обратного скрещивания. Использование молекулярных маркеров в процессе отбора часто называют или селекцией с генетическим маркером или селекцией с помощью маркера. Молекулярные маркеры могут также использоваться для идентификации и исключения определенных источников зародышевой плазмы родительских сортов или предков растения путем предоставления средств отслеживания генетических профилей через скрещивания.

Таким образом, очевидно, что в уровне техники эти способы получения растений являются "общепринятыми" в том смысле, что они используются регулярно и имеют высокую степень успеха. Полезность линии NS-B50027-4 канолы также распространяется на скрещивания с другими видами. Обычно подходящие виды относятся к семейству Brassicaceae. Соответственно любые и все способы, использующие канолу с элитным событием NS-B50027-4 в разведении, охватываются настоящими вариантами выполнения, включая самоопыление, племенное разведение, обратные скрещивания, гибридную продукцию и скрещивание с популяциями. Все растения и популяции растений, полученные с использованием линии канолы с элитным событием NS-B50027-4 в качестве родителя, входят в объем этих вариантов выполнения, в том числе полученные из сортов, полученных из линии NS-B50027-4 канолы. Специалисты в данной области могут использовать уникальные профили молекулярных маркеров или селекционные записи для идентификации линий потомства или популяций потомства, полученных из линии NS-B50027-4 канолы.

Примеры

Пример 1. Характеризация и селекция линии NS-B50027-4 в полевых испытаниях.

Трудной задачей в селекции растений является идентификация отдельных растений, которые являются генетически превосходящими, потому что для большинства признаков истинная генотипическая ценность может маскироваться другими смешанными признаками растений или факторами окружающей среды. Один из способов идентификации превосходного растения заключается в наблюдении за его эффективностью по сравнению с другими экспериментальными растениями и одним или несколькими широко выращиваемыми стандартными культиварами. Если одно наблюдение является неубедительным, повторные наблюдения дают лучшую оценку генетической ценности.

Растения, первоначально идентифицированные как B0050-027-18, были отобраны на основе процедуры поколения 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 дают по меньшей мере одно семя. В результате не все растения, первоначально отобранные в популяции, представлены потомством, когда продвижение поколения завершено. Более того, оригинальные трансгенные события усугубляют сложность наследования, так что нельзя предсказать генотип или фенотип потомства. Таким образом, растения самоопылялись и отбирались по типу для последующих поколений до тех пор, пока конкретная линия не стала гомозиготной, проявляющей отобранные признаки с превосходными агрономическими свойствами и вырабатывающей однородную популяцию потомства чистого размножения. В частности, тестовые линии были отобраны после программы разведения с вторичным отбором в Nuseed Innovation Centre (NIC), Horsham (Victoria, Australia). Селекция и продвижение линий кандидатов основывались на

- (a) номере копии вставки Т-ДНК;
- (b) сегрегационном шаблоне экспрессии ДНА;
- (c) гомозиготности (на основе фенотипа и генотипа жирных кислот);
- (d) производстве LC- ω 3-ДНА; и
- (e) подходящих агрономических признаках для выращивания растениеводческих культур, основанных на тестировании потомства на местах зимой и летом.

В Австралии канола выращивается в южной зоне засушливых земель и в основном в условиях зимних осадков. В Австралии выращивают в основном культивары канолы весеннего типа, которые имеют низкие требования яровизации. В целом австралийские культивары обычно сохраняют небольшую задержку в начале цветения и имеют относительно высокую мощность растений или производство биомассы в зимние месяцы.

Растения канолы в Австралии, как правило, сеют с апреля по май после первого крупного дождя и собирают с октября по декабрь. На урожай влияют, прежде всего, доступность воды в течение вегетационного периода и эффективность водопользования культивара. Генетическая устойчивость основного патотипа к заболеванию черной ножкой, вызываемой *Leptosphaeria maculans*, может дифференцировать культивары с точки зрения выживания рассады и изъязвления стеблей, но считается, что австралийские культивары, как правило, имеют высокую устойчивость при выращивании в соответствии с рекомендованными агрономическими практиками. Развитие семян следует за вегетационным периодом от пяти до семи месяцев и происходит в конце весны или в начале лета. Помимо наличия воды, на урожай могут существенно повлиять большие температурные перепады (от $<0^{\circ}\text{C}$ до $>35^{\circ}\text{C}$), которые могут вызвать недоразвитие семян и семенных коробочек.

Как отмечено в настоящем документе, трансформация зародышевой плазмы канолы осуществлялась с помощью конструкта из восьми генов, которая приводила к специфичному для семян накоплению LC- ω 3 жирных кислот, в частности ДНА. Проще говоря, фенотип характеризовался качеством продукции (PQ) (полученными омега-3 жирными кислотами), хотя растения несли маркерный ген (MG). Трансформированный материал был повторно отобран по локусной гомозиготности, экспрессии ДНА в семени и агрономическим признакам и потенциальной урожайности, пригодной для коммерческого производства.

Три сибса, полученных из поколения T2, из трансгенного события сравнивали с восемью другими культиварами канолы (линиями) для ряда важных агрономических и семенных признаков в восьми экспериментальных точках (участках). В Виктории в 2015 г. количество осадков в вегетационном периоде было ниже долгосрочного среднего и уменьшило продолжительность вегетационного периода. Восемь австралийских участков представляли широкий диапазон потенциалов урожайности в окружающей среде, о чем свидетельствует диапазон средней урожайности участков (т.е. AV Garnet: от 0,7 до 2,4 т/га). Трансгенная линия B0050-027-18-X была представлена тремя трансгенными линиями: B0050-027-18-20 (T3), B0050-027-18-36-13 (T4) и B0050-027-18-105-13 (T4). Изменения агрономических признаков у тестируемых линий были сопоставимы с таковыми у коммерческих сортов, оцененных во всех протестированных средах. Этот вывод был подтвержден тем, что выход зерна на тестируемой линии с самой высокой урожайностью был статистически сопоставим, основываясь на межучастковом анализе (MET-REML), с коммерческими культиварами с самой высокой урожайностью. Кроме того, для каждого участка тестовая линия с наиболее высокой урожайностью имела значительно более высокую урожайность, чем по меньшей мере один культивар, за исключением одного участка, где не было значительных различий. Тестовые линии давали семена с немного более низким процентным содержанием масла из семян растений и с различным составом жирных кислот; но это не повлияло на урожайность или агрономические показатели. Экспрессия LC ω 3 ДНА жирной кислоты была очень стабильной во всех тестируемых средах.

Тестируемые линии были получены из трансформированных проростков (вар. AV Jade). Семена набухали, позволяя растениям самоопыляться изолированно (т.е. под тентами, защищающими от насекомых).

Контрольные культивары (коммерческие линии разведения), использованные для сравнения, обеспечивали агрономически разнообразный (например, растительный покров, фенология) диапазон хорошо

адаптированных (т.е. с высоким, но меняющимся потенциалом урожайности и содержания масла) культиваров, широко выращиваемых в зоне посева. Все эти культивары находятся в открытом опылении, описаны и тщательно оценены, например, в Австралийской Национальной Программе Тестирования Сортов и Региональных ежегодных отчетах об урожаях. См. вебсайт "nvtonline". Кроме того, вариация устойчивости растений к заболеваниям хорошо описана для черной ножки в Австралии. Van De Wouw et al., 67, *Crop & Pasture Sci.*, 273 (2015). В Австралии заболевание черной ножки может привести к потере урожая вплоть до 90%. Marcroft & Bluett, *Agricul. Notes*, AG1352, Victoria, Dept. Primary Indus. (2008). Генетическая изменчивость среди коммерческих культиваров для определенного состава жирных кислот в семенах и содержания масла в семенах была задокументирована с течением времени. См. Seberry et al., *Quality of Australian canola*, 2011 (Australian Oilseeds Fed., 2012). Растения из культивара AV Jade были трансформированы для получения 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 черной ножки, урожаем растений, урожаем зерна, влажностью зерна, процентным содержанием масла в семенах и содержанием жирных кислот, в частности LC- ω 3 полиненасыщенной жирной кислоты (LC-PUFA) в семени, особенно в отношении выхода EPA, DPA и DHA. Для всех измеренных признаков анализ с ограниченной оценочной вероятностью проводился с использованием ASREML в статистическом программном обеспечении 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 использовался для учета пространственного изменения поля, как это было подробно описано и использовано для полевых селекционных и генетических исследований. 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). Для определения урожайности зерна (т/га) далее был проведен межучастковый анализ Meta-REML для определения Наилучшего Линейного Объективного Прогноза (BLUP) для испытанных линий.

Что касается всхожести растений, этот подсчет был выполнен путем подсчета количества взошедших растений приблизительно через двенадцать дней после посева в двух квадрантах по одному квадратному метру (1 м²) на каждом участке на всех восьми участках. Среднее значение обоих квадрантов использовалось для оценки количества растений, взошедших на квадратный метр и проанализированных как изменение признака. Оценка всхожести растений, основанная на визуальной оценке средней плотности растений на участке, была записана для каждого участка на всех участках и проанализирована как изменение признака (например, 1=низкая=0-5 растений/м²; 5=умеренная=25-30 растений/м²; 9=высокая=45-50 растений/м²). Всхожесть растений на основе количества на квадратный метр и показатель всхожести растений значительно различались между линиями обработки для всех восьми участков. Статистическая изменчивость для всхожести растений у трансгенных линий была значительна в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах. Мощность растений была предсказана в начале вегетационного периода с использованием наблюдений от 1 до 9 баллов вегетативной биомассы на капустной стадии растений (т.е. от стадии шести листьев) для каждого участка во всех участках и анализировалась как вариация признака.

Время цветения записывалось как количество дней от посева до того момента, когда у 50% растений на участке был хотя бы один открытый цветок. Оно было записано для каждого участка во всех испытаниях и проанализировано как изменение признака. Начало цветения (количество дней после посева) исходя из 50% цветения растений значительно варьировалось между линиями обработки для всех участков. Среднее время цветения на участке варьировалось от 99 до 110 дней и является показателем различий в окружающей среде между экспериментальными участками для этого признака. Статистически изменение времени цветения трансгенных линий было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах.

Продолжительность цветения представляла собой расчетную разницу между временем цветения и временем окончания цветения (выражается в количестве дней). Она было рассчитана для каждого участка во всех испытаниях и проанализирована как переменная признака:

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

Начало цветения (количество дней после посева), основанное на 50% цветения растений, значительно варьировалось между линиями обработки для всех восьми участков. Среднее время цветения на участке варьировалось от 99 до 110 дней, отражая различия в окружающей среде на экспериментальных участках для этого признака. Статистически изменение времени цветения трансгенной линии было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах. Конец цветения (количество дней после посева), основанный на 90% растений, не имеющих цветов, значительно варьировался между линиями для всех восьми участков. Среднее время окончания цветения на участке варьировалось от 128 до 139 дней, что отражало различия в окружающей среде на экспериментальных участках для этого признака. Статистически изменение конца цветения трансгенных линий было в зна-

чительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами на всех участках.

Растения при сборе урожая по количеству растений на квадратный метр значительно различались между линиями для всех восьми участков. Статически изменение количества растений во время сбора урожая для трансгенных линий было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами на всех посадках и местах. Количество растений на момент появления всходов значительно коррелировалось с количеством растений, зарегистрированных при сборе урожая. Некоторые из рассчитанных процентов выживаемости превышали 100%, что отражало медленное появление всходов у двух сортов (ATR Wahoo и AV Jade): не все проростки появились во время подсчета появления всходов растений.

Высота растения на стадии созревания сухих семян измерялась от основания до верхушки в центре участка. Центр участка использовался, чтобы избежать смешанных эффектов, вероятно связанных с пространственной областью между участками (краевые эффекты). Этот признак был записан для каждого участка во всех испытаниях и проанализирован как изменение признака. Высота растения в зрелости (см) значительно варьировалась между линиями обработки для всех участков. Средняя высота растений на участке варьировалась от 63 до 105 см, что указывало на различия в окружающей среде на экспериментальных участках для этого признака. Статистически изменение высоты зрелости для трансгенных линий было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах.

Разрушение семян (иногда называемое растрескиванием бобов) при созревании анализировали с использованием подсчета количества семян на 1/8 квадратного метра, записанного в течение двухнедельного периода. Это было предпринято путем размещения двух лотков между посеянными рядами и под навесом для каждого участка во всех местах и проанализировано как изменение признака. Показатель разрушения семян (по шкале от 1 (ноль) до 9 (высота: +40)) также был записан на одном участке на основании количества семян, наблюдавшихся на земле непосредственно перед сбором урожая, и проанализирован как изменение признака. Разрушение семян, основанное на количестве семян на земле во время сбора урожая, значительно варьировалось между линиями обработки для четырех из восьми участков. Среднее значение разрушения семян варьировалось от 3 до 15 (на 1/8 квадратного метра) и указывало на низкий уровень разрушения на всех участках. Показатель разрушения семян на одном из участков также значительно варьировался между линиями и был тесно коррелирован со средним количеством разрушенных семян. Это указывает на то, что разрушение, записанное как оценка, было хорошим предиктором разрушения семян. Статистически вариация для разрушения семян, основанная на количестве семян и баллах для трансгенных линий, была в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах.

Устойчивость к полеганию регистрировали как от 1 (устойчивая) до 9 (восприимчивая), рассчитывая на основе угла наклона растения от основания растения в зрелости. Не было статистически значимых изменений для полегания растений. Отсутствие вариации для этого признака, вероятно, связано с уровнем осадков ниже среднего на поздней стадии роста стручка.

Симптомы тяжести листьев черной ножки, характерные для *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa*, записывались в баллах как от 1 (низкий <5%) до 9 (высокий >40%) за один повтор на пяти участках. Не все участки были оценены из-за отсутствия заметных изменений. Симптомов, связанных с изъязвлением и поломкой ствола, не наблюдалось. Наблюдаемые симптомы листьев черной ножки были на очень низком уровне на всех восьми участках. Один участок высевали с использованием голых семян (семена, не обработанные фунгицидом). Не было никаких относительных различий во всхожести растений среди линий, протестированных между этим участком и другими участками, обработанными фунгицидом для семян. Симптомы листьев не всегда предсказывают степень изъязвления стеблей, вызванного *L. maculans* (основная причина потери урожайности и основа для рейтинга 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 на семядолях, листьях, стеблях (язвы) и выживаемости растений в полевых условиях. Учитывая отсутствие изъязвления и повреждения стебля, линии канолы можно считать устойчивыми к действующему давлению заболевания для целей, описанных в настоящем документе.

Количество урожая растений оценивали путем подсчета растений в двух квадрантах по одному квадратному метру на каждом участке во всех восьми участках. Среднее значение обоих квадрантов затем использовалось для оценки количества растений на квадратный метр и анализировалось в качестве признака вариации. Выживаемость растений (%) рассчитывали путем выражения средних значений для экспрессирующего участка для количества растений в % от средних значений для показателей всхожести растений:

$$\% \text{ Выживаемости растений} = (\text{Количество урожая растений} \times 100) / \text{Количество всхожести растений}$$

Зерно собирали, когда семена были физиологически зрелыми и сухими (~7%), используя уборочную машину для опытных и селекционных участков. Направление сбора урожая поддерживалось постоянным (т.е. диапазон спереди назад для каждого ряда) для каждого испытания для того, чтобы избежать ошибок направления сбора урожая. Вес сухого зерна для каждого участка был определен и преобразован

в единицы т/га на основе площади участка и проанализирован как изменение признака.

Влажность зерна при сборе урожая и в лабораторном образце регистрировалась и анализировалась как изменение признака. Ручной измеритель влажности использовался для анализа сыпучих образцов непосредственно в точке сбора урожая в поле. Процент влажности также определяли с использованием способа сушки в печи, основанного на методе 4-1,5 Австралийской Федерации Масличных Культур (AOF). Этот способ 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 уборке урожая (%) значительно варьировалась между линиями обработки для всех восьми участков. Средняя влажность зерна при уборке варьировалась от 9 до 12%, что указывало на то, что семена собирали на аналогичной стадии развития зерна. Статистически изменение влажности зерна при уборке для трансгенных линий было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного культиварами во всех экспериментах. Процент влажности зерна при уборке также коррелировал со временем цветения, так что семена линий позднего цветения (т.е. ATR Wahoo и Monola515TT) имели значительно более высокий % влажности зерна во время уборки во всех местах. Лабораторная влажность семян значительно различалась между линиями на всех участках. Однако различия между линиями и по участкам были очень низкими и составляли в среднем около 7%. Это указывает на отсутствие мешающих эффектов хранения семян. Изменение влажности семян в лаборатории для трансгенной линии было значительно ($P < 0,05$) в пределах диапазона, выраженного нетрансгенными линиями.

Содержание масла в семенах (%) анализировали с применением спектрометрии с ядерно-магнитным резонансом (ЯМР) на семенах с 6% влажностью. Вкратце, образцы семян от 5 до 10 г взвешивали в пробирке для ЯМР и анализировали с помощью ЯМР-спектрометра. Результаты по маслу семян были определены с помощью программной калибровки, созданной первоначально с использованием двадцати эталонных образцов с известным процентным содержанием масла, которое было определено гравиметрической экстракцией масла. Содержание растительного масла значительно различалось ($P < 0,05$) между линиями на всех восьми участках. Средний процент масла семян на участке варьировался от 37,0 до 41,5%, что, как правило, было ниже среднего для мест посадки и, вероятно, являлось следствием дождевых осадков ниже среднего и более высоких, чем в среднем, температур, наблюдаемых в период заполнения зерном. Относительные различия в линиях были вполне постоянными на разных участках. Разброс содержания масла в семенах для трансгенных линий был несколько ниже по сравнению с нетрансгенными линиями во всех участках - в среднем около 2%, что может служить целью для генетического улучшения. Более низкое содержание масла не может быть генетически связано с трансгенным событием, но может быть результатом трансформации сорта с более низким содержанием масла, т.е. AV Jade.

Краткое описание характеристик агрономических признаков события NS-B50027-4 по сравнению с характеристиками нетрансгенных сортов представлено в табл. 4 (анализ REML; $F_{pr} < 0,001$ Sig для всех признаков).

Таблица 4

Межучастковый анализ агрономических признаков

Признак:	Всхожесть	Количество Собранных Растений	Всхожесть	Мощность Растений	Начало Цветения	Конец Цветения	Продолжительность Цветения	Высота в Зрелом Состоянии	Раздробленное Семя	Выход	Влажность зерна при сборе
Наименование линии	Единица: Растений	Растений на м	Балл (1-9)	Балл (1-9)	День	День	Дни	см	№.	т/га	%

	на кв.	м кв.									
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
B0050-27-18-105-13	22,6	19,8	7,6	5,4	108,5	135,8	27,3	70,6	8,9	0,92	11,1
Min Значение для Культивара	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
Max Значение для Культивара	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
SE	0,81	0,98	0,14	0,11	0,21	0,27	0,35	1,15	1,65	0,06	0,39
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 омылением и метилированием и анализом с помощью GC-FID. Вкратце, это включало дробление образцов семян и экстракцию масла в растворитель из навески измельченных семян. Растворитель выпаривали в атмосфере азота, и масляную навеску разбавляли в новом растворителе. Аликвоту подвергали взаимодействию с Meth Prep II (реагент омыления/метилирования). Образцы нагревали при 40°C для ускорения реакции, а затем вводили в GC-FID с использованием колонки BPX-70 для определения жирных кислот. Жирные кислоты рассчитывали как % композиции масла, где площадь каждого пика жирной кислоты определяли как процент от суммы всех пиков жирных кислот на хроматограмме. Эти оценки были проанализированы индивидуально, как признак изменения. Процент специфической жирности был оценен для: пальмитиновой кислоты; стеариновой кислоты; олеиновой и цис-вакценовой; линолевой; альфа-линоленовой кислоты (ALA); арахидиновой (также известной как эйкозановая кислота) и стеариноновой (SDA); поллиновой, гондоевой и гадолеиновой кислоты; эруковой и эйкозатетраеновой (ETA); эйкозапентаеновой кислоты (EPA); докозапентаеновой кислоты (DPA); и докозагексаеновой кислоты (DHA). В табл. 5 представлен межучастковый анализ содержания жирных кислот в семенах (все значения в процентах; анализ REML; Fpr<0,001 Sig для всех признаков).

Таблица 5

Межучастковый анализ содержания жирных кислот в семенах

	Лабораторная Влажность Семян	Масло Семян	Пальмитиновая	Стеариновая	Олеиновая & Цис-вакценовая	Линолевая	ALA, Арахидиновая & SDA	Гондоевая & EPA	DPA	DHA	Сумма EPA DPA 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
ATR GEM	6,8	41,5	3,7	1,7	66,3	14,9	10,2	1,2	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
ATR WAHOO	6,8	41,7	3,7	1,6	60,7	20,4	10,4	1,2	0,0	0,0	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
AV JADE	6,7	41,0	4,0	2,2	61,0	18,7	11,2	1,0	0,0	0,0	0,1
AV ZIRCON	6,8	41,0	3,8	1,6	69,3	11,8	10,4	1,3	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
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
B0050-027-18-36-	7,1	35,5	4,2	2,4	41,8	7,9	22,2	3,8	0,6	1,2	10,5
13											
B0050-27-18-105-13	7,2	35,3	4,1	2,4	42,0	7,7	22,1	3,9	0,5	1,2	10,3
Min Значение для Культивара	6,6	40,4	3,6	1,6	60,5	11,8	5,2	1,0	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
Max Значение для Культивара	7,1	41,9	4,3	2,2	73,3	20,9	11,2	1,5	0,0	0,0	0,1
Среднее	6,8	39,6	3,9	2	55	14,8	15	2,3	0,1	0,6	3,1
VAR	0,002	0,05	0,0005	0,0003	0,1912	0,0385	0,0475	0,0032	0,0001	0,0005	0,0248
SE	0,04	0,22	0,02	0,02	0,43	0,19	0,22	0,06	0,01	0,02	0,16
LSD	0,09	0,44	0,04	0,03	0,87	0,39	0,43	0,11	0,02	0,05	0,31
CV%	0,7	0,6	0,5	0,9	0,8	1,3	1,5	2,5	6,3	4,1	5,1

Процент жирной кислоты в семени в виде стеариновой кислоты согласно анализу GC-FID значительно варьировался между линиями по всем восьми участкам. Средний по участкам % стеариновой кислоты показал очень незначительные изменения и колебался от 1,6 до 2,2%. Статистически изменение % стеариновой кислоты для трансгенной линии было в значительной степени в пределах диапазона, выраженного нетрансгенными линиями на всех участках.

Процент жирной кислоты в семени в виде олеиновой и цис-вакценовой кислот согласно анализу GC-FID значительно варьировался между линиями по всем восьми участкам. Средний по участкам % олеиновой и цис-вакценовой кислот варьировался от 51 до 58%. Статистически изменение % олеиновой и цис-вакценовой кислот для трансгенной линии было значительно ниже, чем диапазон, выраженный нетрансгенными линиями на всех участках. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна.

Процент жирной кислоты в семени в виде линолевой кислоты согласно анализу GC-FID значительно варьировался между линиями по всем восьми участкам. Средний % линолевой кислоты по участкам колебался от 13,4 до 14,7%. Изменение % линолевой кислоты для трансгенных линий сибсов, полученных из одного события T2 (растение B0050-027-18), было значительно ($P < 0,05$) ниже, чем диапазон, выраженный культиварами на всех участках, и сибсами, полученными из сибсов с другими событиями. Значительная разница в % линолевой кислоты, вероятно, связана с экспрессией трансгенов. Снижение % линолевой кислоты, вероятно, связано с трансгенной вставкой, но не влияет на агрономию или производство зерна в промышленном масштабе.

Процент жирных кислот, присутствующих в виде ALA, арахидиновой и SDA, значительно различался между линиями на всех восьми участках. Среднее значение на участке для % ALA, арахидиновой и SDA варьировалось от 5 до 11%. Вариация для % ALA, арахидиновой и SDA для трансгенных линий была зна-

чительно ($P < 0,05$) выше, чем вариация, выраженная нетрансгенными культиварами во всех экспериментах. Значительные различия, наблюдаемые для этого признака на некоторых участках, 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) давал значительно ($P < 0,05$) более низкий % ALA по сравнению с другими культиварами из-за SNP в генах Fad.

Процент жирной кислоты в виде поллиновой, гондоевой и гадолеиновой кислоты значительно различался между линиями на всех восьми участках. Среднее значение на участке для % поллиновой, гондоевой и гадолеиновой кислоты находилось в диапазоне от 2,0 до 2,5%. Вариация для % поллиновой, гондоевой и гадолеиновой кислоты для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше вариации, выраженной нетрансгенными культиварами во всех экспериментах. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна.

Процент жирной кислоты в виде эруковой кислоты и ЕТА регистрировался на пяти участках и варьировался, как правило, близко к 0%. Результат, связанный с трансгенной вставкой, коммерчески не влияет на агрономию или производство зерна.

LC- ω 3 полиненасыщенную жирную кислоту (LC-PUFA) из семени, в частности EPA, DPA и DHA, рассчитывали как процент для каждого образца участка и анализировали как вариацию признака, где

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

Прогнозируемая DHA в единицах кг/га была рассчитана для каждого участка и проанализирована как вариация признака:

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

Прогнозируемая LC-PUFA в единицах кг/га была рассчитана для каждого участка и проанализирована как вариация признака:

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

Процент жирной кислоты в виде EPA значительно варьировался ($P < 0,05$) среди линий на всех восьми участках. Вариация % для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше, чем вариация, выраженная нетрансгенными культиварами. Этот результат, связанный с трансгенной вставкой, не влияет на агрономию или производство зерна, но действительно может сделать зерно более ценным.

Процент жирной кислоты в виде DPA значительно варьировался ($P < 0,05$) между линиями на всех участках. Вариация % для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше, чем вариация, выраженная нетрансгенными культиварами на всех участках. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на агрономию или производство зерна коммерчески.

Процент жирной кислоты в виде DHA значительно варьировался между линиями на всех восьми участках. Вариация % для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше, чем вариация, выраженная нетрансгенными культиварами на всех участках. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна. Разброс между трансгенными линиями сибсов был использован в качестве основы для селекции. Процент DHA по участкам и сравнение элитного события NS-B50027-4 с нетрансгенными сортами (как определено с помощью GC-FID) показаны в табл. 6 (анализ REML; $F_{pr} < 0,001$ Sig для всех мест).

Таблица 6

Участок по среднему содержанию
% DHA (C22:6n3) в семенах в культиваре/элитном событии

Наименование линии Участок:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по участкам
ATR Bonito	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2
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	0,3
ATR Wahoo	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,0	0,2
AV Garnet	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2
AV Jade	0,0	0,3	0,5	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,3
AV Zircon	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2

Monola 515TT	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2
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
B0050-27-18-105-13	10,5	11,3	9,0	9,6	10,2	9,7	10,9	12,5	10,5
Min Значение для Культивара	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	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
Max Значение для Культивара	0,1	0,3	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,0	0,3
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	

Прогнозируемая ДНА, выраженная в кг/га, рассчитанная на основе профиля жирных кислот, % масла семян и урожайности зерна, значительно варьировались ($P < 0,05$) между линиями на всех участках. Вариация % для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше, чем вариация, выраженная нетрансгенными линиями на всех местах. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на коммерческую агрономию или производство зерна за исключением того, что делает зерно более ценным. Разброс между трансгенными линиями sibсов был использован в качестве основы для селекции. Была отмечена высокая стабильность ДНА в терминах единицы продукции на единицу площади (кг/га) из-за низкой вариации между маслом семян и % ДНА, продуцируемого в семенах. Прогнозируемая урожайность ДНА (кг/га) по участкам и сравнение элитного события NS-B50027-4 с нетрансгенными культиварами показаны в табл. 7 (анализ REML, F $pr < 0,001$ Sig для всех мест).

Таблица 7

Участок по среднему прогнозируемому содержанию ДНА (кг/га) в семенах линии

Наименование линии Участок:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по участкам
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
B0050-27-18-105- 13	24	25	34	50	46	40	26	33	35
Min Значение для Культивара	0,0								

NS-B50027-4	30,0	28,0	39,0	36,0	50,0	49,0	24,0	41,0	37,0
Мах Значение для Культивара	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 LC-PUFA омега-3 в семенах - процент EPA, DPA и DHA - процент LC-PUFA значительно различался ($P < 0,05$) среди линий на всех восьми участках. Разница в % для трансгенных линий была значительно ($P < 0,05$) выше, чем выраженная культиварами во всех экспериментах. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не влияет на агрономию или коммерческое производство зерна за исключением увеличения ценности зерна. Разброс между трансгенными линиями сибсов был использован в качестве основы для селекции. Следовые уровни LC-PUFA, наблюдаемые в нетрансгенных линиях, вероятно, связаны с потоком пыльцы, движением семян или ошибкой GC-FID.

В табл. 8 показаны значения в процентах, определенные с помощью GC-FID (анализ REML; $F_{pr} < 0,001$ Sig для всех мест):

Таблица 8

Участок по среднему содержанию LC-PUFA
(% суммы EPA+DPA+DHA) в семенах культивара или трансгенной линии

Наименование линии									Среднее по участкам
Участок:	A	B	C	D	E	F	G	H	
ATR Bonito	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,3
ATR Gem	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
ATR Stingray	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	0,5	0,3
ATR Wahoo	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2
AV Garnet	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,0	0,3
AV Jade	0,0	0,4	0,5	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,3
AV Zircon	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2
Monola 515TT	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	0,3
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
B0050-27-18-105-13	12,2	13,2	10,5	11,3	11,9	11,3	12,7	14,5	12,3
Min Значение для Культивара	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	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
Мах Значение для Культивара	0,1	0,4	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,5	0,3
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	

Прогнозируемый LC-PUFA, выраженный в кг/га, рассчитанный на основе профиля жирных кислот, % масла семян и урожайности зерна, значительно различался между линиями обработки на всех участках. Статистически вариация % для трансгенных линий была значительно выше, чем вариация, выраженная культиварами во всех экспериментах. Этот результат связан с трансгенной вставкой и не оказы-

вает коммерческого влияния на агрономию или производство зерна. Разброс между трансгенными линиями сибсов был использован в качестве основы для селекции. Следовые количества в семенах культиваров, вероятно, связаны с потоком пыльцы, движением семян или ошибкой GC-FID. Существует высокая стабильность LC-PUFA в терминах единицы продукции на единицу площади (кг/га) из-за низкой вариации между семенами для масла семян и % ДНА, продуцируемого в семени. В табл. 9 показан прогнозируемый кг/га LC-PUFU ($F_{pr} < 0,001$ для всех участков).

Таблица 9

Участок по среднему прогнозируемому количеству LC-PUFA (Кг/га) в семенах культивара (линии)

Наименование линии Участок:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по участкам
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-	29	32	48	48	60	61	28	41	43
13									
B0050-27-18-105-13	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 каждого из участков культивирования и представлено в табл. 10 (единицы представляют собой проценты; анализ REML; $F_{pr} < 0,001$ Sig для всех участков).

Таблица 10

Участок по среднему содержанию % масла в культивированном масле семян

Линия Участок:	A	B	C	D	E	F	G	H	Среднее по участкам
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
B0050-27-18-	36,3	34,4	37,9	37,4	35,8	34,1	32,1	33,0	35,1

105-13										
Min 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	
Max 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. 11.

Таблица 11

Детализированные данные о содержании жирных кислот для 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												
	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	0,0	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 Т7, Лето 2015-2016 (продолжение)												
		DGLA	ETE		ETA		EPA		DPA6		DPA3	DHA
	C21:	C20:3n	C20:3n	C22:	C20:4n	C22:1n	C20:5n	C24:	C22:5n	C24:1n	C22:5n	C22:6n
	0	6	3	0	3	9c	3	0	6	9c	3	3
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	0,71	0,32	0	0	0,40	0,23		0,10	0,88	9,80
NS-B50027-4, Поколение Т6, 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	0,56	0,35	0	0	0,67	0,05	0,06	0,08	1,07	12,73
NS-B50027-4, Поколение Т5, 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 Т4, 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 Т7, Лето 2015-2016 (продолжение)												
	Масло ЯМР	Сумма ЕРА, DPA, DHA	Общее содержан ие Ω3	Общее содержан ие Ω6	Ω3/Ω 6	Общее содержани е насыщенн ого жира	Общее содержание мононенасыщен ного жира	Общее содержан ие 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 Т6, 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)								
	Масло ЯМР	Сумма EPA, DPA, DHA	Общее содержан ие Ω3	Общее содержан ие Ω6	Ω3/Ω 6	Общее содержани е насыщенн ого жира	Общее содержание мононенасыщен ного жира	Общее содержан ие PUFA
1		9.46	34.09	9.49	3.59	7.76	45.00	43.58
*Номер образца								

Данные в табл. 11 подтверждают, что в дополнение к LC-ω3 жирным кислотам семена NS-B50027-4 также содержат существенно больше ALA, чем обычные сорта канолы. См. также табл. 5. Хотя ALA не является LC-PUFA, она представляет собой ω3 жирную кислоту. Соотношение ω3:ω6 жирных кислот в масле семян NS-B50027-4 в табл. 11 составляет от около 3,59 до около 6,12; соотношение ω3:ω6 жирных кислот в обычном масле канолы составляет около 0,5. Patterson et al, J. Nutr. Metab. (2012).

В табл. 12 представлены данные, относящиеся к процентному содержанию DHA и LC-PUFA в семенах шестнадцати поколений элитного события NS-B50027-4, выращенных на экспериментальных участках в Австралии. Дополнительное полевое испытание в Австралии позволило получить множество семян с 9,6% DHA и 10,1% LC-PUFA.

Таблица 12
DHA% и LC-PUFA% в семенах из элитного события NS-B50027-4 на поколение

Покол ение	Образец семени	Окружающ ая Среда	Вегетационный Период	Год в Поле	Место располо жения	DHA% в семени	LC-PUFA % в семени	
1	T1	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		5,7	6,0	
2	T2	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		9,5	10,1	
3	T3	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		12,6	13,1	
4	T3- х	Множество	Изоляционн ый тент	Зима/Весна	2014	В	8,9	10,2
5	T3- 2х	Множество	Открытое Поле	Лето	2014-15	С	8,4	9,5
6	T3- 3х	Множество	Открытое Поле	Зима/Весна	2015	Д	9,0	10,6
7	T4	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		А	11,9	13,2
8	T5	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		А	13,4	14,6
9	T5- х	Множество	Изоляционн ый тент	Зима/Весна	2015	В	12,7	14,5

10	T5-2x	Множество	Открытое Поле	Лето	2015-16	C	9,8	11,1
11	T5-3x	Множество	Открытое Поле	Зима/Весна	2016	D	9,6	10,6
12	T6	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		A	12,9	14,4
13	T6-x	Множество	Изоляционный тент	Лето	2015-16	C	17,3	18,8
14	T6-2x	Множество	Изоляционный тент	Зима/Весна	2016	E	10,1	12,1
15	T7	Одно растение	Теплица	Контролируемая Среда		A	13,8	15,1
16	T7-x	Множество	Изоляционный тент	Зима/Весна	2016	B	12,5	14,1

Кроме того, способность NS-B50027-4 расти в Канаде была протестирована в контролируемых экспериментальных условиях в двух разных местах в 2016 г. В табл. 13 представлены агрономические данные и данные по урожайности, сравнивающие NS-B50027-4 с несколькими нетрансгенными линиями канолы.

Таблица 13

Данные агрономических измерений для нетрансгенных культиваров канолы и экспериментальных трансгенных тестируемых линий из двух канадских экспериментальных культивирований в 2016 г.

Признак:	Всхожесть	Высота Растения в Зрелости	Начало Цветения	Конец Цветения	Продолжительность Цветения	Полетание в Зрелости	Раздробленные Семена	Количество Собранных Растений	Симптомы Альгерариоза	Сопротивление черной ножке	Мощность Растений	Влажность зерна	% Гранатового цвета зерна	Выход зерна
Наименование линии	Растения на м ²	см	День	День	Дни	Балл (1-9)	No.	Растений 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
Min Значение для Культивара	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
Max Значение для Культивара	27	125	50	76	29	9	13	26	3	7	7	10	114	2,9

Поскольку линия NS-B50027-4 канолы является по существу гомогенной, ее можно воспроизвести, высадив семена такой линии, выращивая полученные растения канолы в условиях самоопыления или сиб-опыления с адекватной изоляцией и собирая полученные семена с применением традиционных агрономических методов.

Пример 2. Анализы конкурентной аллель-специфической PCR (KASP).

Фенотипическая экспрессия трансгенов в каноле определяется как структурой самой трансгенной кассеты, так и местоположением ее вставки в геноме растения: присутствие трансгенов в определенных местах 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 других генетических манипуляций). Конкретный(ые) сайт(ы) включения может(могут) быть случайным(и) или предопределенным(и) (если применяется процесс целевой интеграции). Агрономически или промышленно успешное введение коммерчески интересующего признака в растение путем генетической манипуляции может быть длительной процедурой, зависящей от различных факторов. Фактическая трансформация и регенерация генетически трансформированных растений являются только первыми в серии этапов отбора, которые включают обширную генетическую характеристику, селекцию и оценку в полевых испытаниях, что в конечном итоге приводит к селекции элитного события.

NS-B50027-4 был разработан после обширных селекционных и полевых испытаний и обеспечивает культивар канолы, который продуцирует по меньшей мере около 7-15% ДНА. Генетический анализ показал, что NS-B50027-4 имел трансгенную вставку на хромосоме A02 и другую трансгенную вставку на хромосоме A05. Вставка на A05 включает две полные Т-ДНК-границные кассеты из восьми генов (Mircu-Δ6D, Rugsco-Δ5E, Pavsa-Δ5D, Prcra-ω3D, Pavsa-Δ4D, Lackl-Δ12D, Rugsco-Δ6E и маркер PAT), выровненных лицом-к-лицу (RB-LB:LB-RB). Вставка на хромосоме A02 состоит из набора из четырех генов Mircu-6D, Rugsco-D5E, Pavsa-5D и Prcra-ω3D. Удивительно, но сегрегационное скрещивание показало, что вставки как в хромосому A02, так и в хромосому A05 были необходимы для достижения продуцирования ДНА около 11%.

Около 1200 потомков из восьми различных популяций BC и F₂, полученных при интрогрессионном разведении канолы ДНА, были использованы для выделения ДНК на основе LGC Octopure SOP, разработанной в Nuseed Molecular Lab в Вудленде. Вкратце, два лиофилизированных листовых диска диаметром 0,25 дюйма измельчали в 300 мкл буфера для экстракции ДНК (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,5% SDS, 1,5 M NaCl) при 1400 об/мин в течение 8 мин с 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 LGC-связывающего буфера с магнитными шариками sbeadex. После связывания и промывания ДНК элюировали 80 мкл буфера для элюирования ДНК LGC.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью NanoDrop 8000 (Thermo Scientific), и она находилась в диапазоне от 5,0 до 20,0 нг/мкл со средним значением 10,0 нг/мкл. Образцы ДНК разводили 1×. Для каждой реакции 2,0 мкл (~ 5,0 нг/мкл) образца геномной ДНК и 2 мкл мастер-микса с праймерами помещали в 384-луночный планшет для генотипирования KASP.

В дополнение к потомству из интрогрессионных популяций канолы ДНА в генотипирование было включено восемь контролей. 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 контроля событий (B0050-027-18-20-12-19) и четыре не шаблонных контроля (NTC). Положительный контроль (растение T5 B0050-027-18-20-12-19) ранее использовался для характеристики события канолы ДНА посредством секвенирования.

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

Информация о последовательности была загружена в LGC Kraken Workflow Manager, и анализы KASP были разработаны с использованием его программы дизайна 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 (Primer_Common). Primer_Allele X ассоциируется с флуоресцентным FAM, а Primer_Allele Y с флуоресцентным HEX.

Большинство анализов, нацеленных на границы, представляли собой анализы с тремя праймерами (табл. 14). Для детектирования канолы ДНА также были разработаны анализы с четырьмя праймерами в дополнение к обычным анализам с тремя праймерами, упомянутым выше. Анализы с четырьмя праймерами содержали трансгенный аллель-специфический PrimerAllele X, аллель-специфический PrimerAllele Y дикого типа, PrimerCommon, специфичный для гена Омега 3, и PrimerCommon 2, специфичный для

дикого типа, в реакции. Для обнаружения восьми генов в кассете Омега 3 в каждом анализе использовали только два праймера, PrimerAllele X и PrimerCommon (анализ с двумя праймерами); оба праймера были ген-специфичными для Омега-3 (табл. 14):

Таблица 14

Последовательности праймеров 14 анализов
KASP для детектирования и интрогрессии NS-B50027-4

ID Анализа KASP	Мишень	Наименование праймера	Последовательность праймера
NBN001	Mіcру-Δ6D	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAAGCACCGT AGTAAGAGAGCA (SEQ ID NO:1)
		Primer_Common	GCTAAGAAGTGGGACTCAACTACAA (SEQ ID No:2)
NBN002	Pyrco-Δ5E	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCTCTTGCTGG AACTCTGG (SEQ ID No:3)
		Primer_Common	GGGTTAGCCACATTGTAGGTAACGTA (SEQ ID No:4)
NBN003	Pavsa-Δ5D	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAAGAGACACC CTGGTGAAAGA (SEQ ID No:5)
		Primer_Common	TAGCATCAGTTCCAACTGGTAAGCAAT (SEQ ID No:6)
NBN004	Picpa-ω3D	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAACACGTAAG CAGACCAAGCAG (SEQ ID No:7)
		Primer_Common	CCCTCTTCCCTAACGAATTCCTT (SEQ ID No:8)
NBN005	Pavsa-Δ4D	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAGGAACCTGT TGCTGCTGATGA (SEQ ID No:9)
		Primer_Common	GCGATCCTAGCACAAAGTTGAAGGTA (SEQ ID No:10)
NBN006	Lackl- Δ12D	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGATGGATCGC TTACCTCTTCGT (SEQ ID No:11)
		Primer_Common	CAGGGTAAGGTGTCCCTGTAACGTT (SEQ ID No:12)
NBN007	Pyrco-Δ6E	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTATTGGATGG GACTCAAGC (SEQ ID No:13)
		Primer_Common	GGGAGATCCTTAGTAGCAGAAGAGAT (SEQ ID No:14)
NBN008	PAT	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCTGAGAGGCG TCCTGTTGAAAT (SEQ ID No:15)

		Primer_Common	AACAGCAGCCATATCAGCAGCAGTA (SEQ ID No:16)	
NBN009	A05 Граница Вставки	1	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTGTCTTGGGTGGTCTGTCCTTC (SEQ ID No:17)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTGTTCTTGGGTGGTCTGTCCTTA (SEQ ID No:18)
			Primer_Common 1	ATCCACTAGCAGATTGTCGTTTCCC (SEQ ID No:19)
			Primer_Common 2	GTTGGCTAAGGTCACGGTGGAG (SEQ ID No:20)
NBN010	A05 Граница Вставки	1	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGCCTTCAGTTAAACTATCAGTGTT (SEQ ID No:21)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTCACGGTGGAGGTCACCA (SEQ ID No:22)
			Primer_Common	GGTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG (SEQ ID No:23)
NBN011	A05 Граница Вставки	2	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACTTTTTTTTC AACTGTTGGCTAAGGTA (SEQ ID No:24)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACTTTTTTTTC AACTGTTGGCTAAGGTC (SEQ ID No:25)
			Primer_Common 1	GTGTGTTCTTGGGTGGGTCTG (SEQ ID No:26)
			Primer_Common 2	GTCGTTTCCCGCCTTCAGTTT (SEQ ID No:27)
NBN014	A02 Граница Вставки	1	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAACTATCAGTTTGAACACCTCC (SEQ ID No:28)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACAACCTGTCTGCTACACACCT (SEQ ID No:29)
			Primer_Common	GGTTGTGTGAAAACGTGTGAGC (SEQ ID No:30)
NBN015	A02 Граница Вставки	2	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTTTAGCTAAATAAGAGGTTCTGTATACT (SEQ ID No:31)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTTTAGCTAAATAAGAGGTTCTGTATACA (SEQ ID No:32)
			Primer_Common 1	GATTGTGATTCCGGGCAGT (SEQ ID No:33)
			Primer_Common 2	GTGTGAAAACGTGTGAGCAAT (SEQ ID No:34)
NBN016	A02 Граница Вставки	2	Primer_Allele X	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGTGATTCCGGCAGTAG (SEQ ID No:35)
			Primer_Allele Y	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTGAGCAATTGTTGGAGGT (SEQ ID No:36)
			Primer_Common	TCTTATCAACATTAAGAACATAATCTTTTAG (SEQ ID No:37)

Для системы генотипирования KASP требуется два компонента: аналитическая смесь и мастер-микс. Аналитическая смесь представляет собой смесь требуемых праймеров, а мастер-микс содержит все другие необходимые компоненты, включая буфер для PCR, универсальную флуоресцентную репортерную систему и Taq-полимеразу.

Реакцию KASP проводили в объеме 4,0 мкл, состоящем из 2,0 мкл (10,0 нг) геномной ДНК, 2,0 мкл мастер-микса 2× KASP и 0,06 мкл аналитической (праймерной) смеси. Аналитическая (праймерная) смесь представляет 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 со следующими параметрами циклов: 1 цикл при 94°C в течение 15 мин, затем восемь циклов при 94°C в течение 30 с и 64-57°C (падение 1,0°C на цикл) в течение 60 с, а затем тридцать циклов при 94°C в течение 30 с и 57°C в течение 60 с. Если четкие кластеры генотипирования не были получены, планшет дополнительно подвергали термощиклированию с помощью трех дополнительных циклов при 94°C в течение 30 с и 57°C в течение 60 с.

После завершения реакций KASP трансгенный аллель метили с помощью FAM через PrimerAllele X, а нетрансгенный аллель дикого типа метили HEX через PrimerAllele Y. Флуоресцентные сигналы считывали в считывающем устройстве для микропланшетов PheraStar с длиной волны возбуждения 485 нм и длиной волны излучения 520 нм для FAM и 535/556 нм для HEX. Данные были проанализированы с применением базы данных LGC Kraken.

Ген-специфическая доминанта (NBN01-NBN08; один анализ/ген) была разработана для обнаружения восьми генов в кассете конструктора. Специфичные для вставки совместные доминантные анализы KASP, предназначенные для восходящих (NBN57, NBN68, NBN58, NBN85 и NBN14) и нисходящих (NBN16, NBN62 и NBN64) границ вставки на A02 и восходящих (NBN52, NBN51, NBN09, NBN50, NBN48 и NBN10) и нисходящих (NBN83, NBN82, NBN84, NBN66, NBN41 и NBN43) границ вставки на A05 были разработаны и подтверждены 1200 потомством из интрогрессионных популяций NS-B50027-4 (табл. 14). Более 10000 образцов были генотипированы с этими маркерами.

Было разработано и валидировано 30 анализов конкурентной аллель-специфической PCR, которые нацелены на восемь генов и четыре границы двух вставок канолы ДНА с событием NS-B50027-4. Эти анализы предложили простой, экономически эффективный, высокопроизводительный и гибкий подход для обнаружения и мониторинга NS-B50027-4 в программе разведения.

Пример 3. Детальное сравнение NS-B50027-4 и нетрансгенной канолы.

Данные о производстве семян канолы на опытных полевых участках за 2014-2016 гг. были сведены в таблицу. Диапазон ДНА и общее содержание EPA+DPA+DHA были 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 следовой величине, определенной как ниже количества, необходимого для точного определения количества компонента.

Таблица 15

Детализированное сравнение
содержания жирных кислот в NS-B50027-4 и контроле

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
Арахидиновая	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
Нервоновая	C24:1n9c	0,1	0,2
DPA3	C22:5n3	0,9	0,0
DHA	C22:6n3	9,8 (8-10)	0,0
Другое		3,8	1,3
Сумма: EPA+DPA+DHA		11,1 (10-12)	0,0
Общее Содержание Омега 3		35,7	10,4
Общее Содержание Омега 6		8,4	11,3
ω3/ω6		4,3	0,9
Общее Содержание Насыщенных		7,7	6,7
Общее Содержание Мононенасыщенных		44,5	68,9
Общее Содержание Полиненасыщенных		44,1	23,5

Семена, собранные в результате экспериментального культивирования NS-B50027-4, были измельчены, а масло получено с помощью холодного отжима. Семена, собранные с родительской изогенной линии AV Jade, обрабатывали аналогичным образом, и содержание каждого масла сравнивали, как показано в табл. 16.

Таблица 16

Содержание масла в NS-B50027-4

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 Стаеиновая	2,9	2,5
C20:0 Арахидиновая	0,8	0,5
C22:0 Бегеновая	0,4	0,2
C24:0 Лигноцериновая	0,1	0,1
Общее Содержание Насыщенных	8,7	7,3

Мононенасыщенные TAG (%)		
C14:1 Миристиленовая	<0,1	<0,1
C16:1 Пальмитоленовая	0,2	0,1
C17:1 Гептадеценная	<0,1	<0,1
C18:1 Оленовая	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 Линолевая	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 Эйкозопентаеновая	0,4	<0,1
C22:2ω6 Докозодиеновая	<0,1	<0,1
C22:4ω6 Докозатетраеновая	<0,1	<0,1
C22:5ω3 Докозопентаеновая	1,0	<0,1
C22:6ω3 Докозагексаеновая	9,4	0,2
Общее Содержание PUFA (%)	40,6	29,9
Общее Содержание Моно Транс Жирных Кислот	0,1	0,2
Общее Содержание 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		

Компонент (единицы)	NS-B50027-4	AV Jade
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 К1 (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
Общее содержание Фитостеринов	690	600

В соответствии с Будапештским договором заявители депонировали не менее 2500 семян канолы NS-B50027-4 в Американской Коллекции Типовых Культур (АТСС®), расположенной по адресу: 10801 University Blvd., Manassas, Va., 20110-2209, USA., номер доступа РТА-123186, и жизнеспособность семян была подтверждена АТСС®. Во время рассмотрения данной заявки доступ к изобретению может быть предоставлен уполномоченному по запросу; все ограничения на доступность для общественности безвозвратно отменяются при выдаче патента; депозит линии NS-B50027-4 будет храниться в депозитарии АТСС, который является государственным депозитарием, в течение 30 или 5 лет после самого последнего запроса или в течение срока действия патента в зависимости от того, что больше, и будет заменен, если он станет нежизнеспособным в течение этого периода. Жизнеспособность семян была проверена на момент депонирования. Заявители выполнили все требования 337 С.F.R. § 1.801-1.809. Заявители не накладывают никаких ограничений на доступность депонированных материалов из АТСС; тем не менее заявитель не имеет права отменить какие-либо ограничения, установленные законом в отношении передачи биологического материала или его транспортировки в коммерции. Заявитель не отказывается от каких-либо нарушений своих прав, предоставленных в соответствии с данным патентом или Законом об Охране Сортов Растений (7 U.S.C. § 2321 et seq.).

Хотя вышеизложенные варианты выполнения изобретения были описаны в некоторых деталях в качестве иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, специалисту в данной области будет понятно, что определенные изменения и модификации, такие как модификации и мутации одного гена, соматоклональные варианты, вариантные индивидуумы, выбранные из больших популяций растений данной инбредной линии и т.п., могут быть осуществлены в рамках объема изобретения, который ограничен исключительно прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Семя, полезное для получения докозагексаеновой кислоты (ДНА),
причем указанное семя происходит из инбредной трансгенной линии Brassica или его потомства, обозначенной как NS-B50027-4,
причем репрезентативное семя указанной NS-B50027-4 депонировано под номером доступа АТСС РТА-123186,
причем семя идентифицировано с помощью генетического анализа границы первого трансгенного локуса, характеризующегося как содержащий SEQ ID NO: 43 и/или SEQ ID NO: 44, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные любой из указанных последовательностей или обоим из них, или их комплементы, и границы второго трансгенного локуса, характеризующегося как содержащий SEQ ID NO: 45 и/или SEQ ID NO: 46, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные любой из указанных последовательностей или обоим из них, или их комплементы,
причем указанные границы первого трансгенного локуса и второго трансгенного локуса представляют собой трансгенный локус хромосомы A02 и трансгенный локус хромосомы A05 соответственно.
2. Способ *in vitro* детекции присутствия ДНК, характерного для трансгенной Brassica, обозначенной

как NS-B50027-4, в образце, содержащем ДНК, где указанный способ включает

(а) контактирование указанного образца с парой праймеров для области границы первого трансгенного локуса и парой праймеров для области границы второго трансгенного локуса, которые при использовании в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с геномной ДНК из элитного события NS-B50027-4 продуцируют ампликон первого трансгенного локуса и ампликон второго трансгенного локуса, которые являются диагностическими для элитного события NS B50027-4;

(b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с получением тем самым указанных первого и второго ампликонов; и

(с) детекцию ампликонов,

причем ампликон для указанного первого трансгенного локуса содержит граничную область SEQ ID NO: 43 и/или SEQ ID NO: 44 или их комплемент и ампликон для указанного второго трансгенного локуса содержит граничную область SEQ ID NO: 45 и/или SEQ ID NO: 46 или их комплемент,

причем детектированные ампликоны для первого трансгенного локуса и второго трансгенного локуса свидетельствуют о присутствии трансгенного локуса хромосомы A02 и трансгенного локуса хромосомы A05 соответственно, которые являются характерными для элитного трансгенного объекта NS-B50027-4, характеристики семени которого были депонированы под номером доступа ATCC PTA-123186.

3. Способ по п.2, причем

указанная пара праймеров для указанной области границы первого трансгенного локуса выбрана из SEQ ID NO: 17-23 (A05 Инсерционная граница 1) или SEQ ID NO: 24-27 (A05 Инсерционная граница 2), по меньшей мере десяти смежных нуклеотидов любого из этих праймеров или их комплементов;

указанная пара праймеров для указанной области границы второго трансгенного локуса выбрана из SEQ ID NO: 28-30 (A02 Инсерционная граница 1) или SEQ ID NO: 31-36 (A02 Инсерционная граница 2), по меньшей мере десяти смежных нуклеотидов любого из этих праймеров или их комплементов.

4. Способ *in vitro* обнаружения присутствия по меньшей мере одного трансгенного локуса в образце, содержащем ДНК растения, причем способ является диагностическим для трансгенной Brassica, обозначенной как NS B50027-4, репрезентативное семя которого было депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186, где указанный способ включает

(а) контактирование указанного образца с

по меньшей мере одним первым праймером, который связывается с первой фланкирующей трансгенной граничной областью указанного первого трансгенного локуса, причем указанный по меньшей мере один первый праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 17-23 (A05 Инсерционная граница 1);

по меньшей мере одним вторым праймером, который связывается со второй фланкирующей трансгенной граничной областью указанного первого трансгенного локуса, причем указанный по меньшей мере один второй праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 24-27 (A05 Инсерционная граница 2);

по меньшей мере одним третьим праймером, который связывается с первой фланкирующей трансгенной граничной областью указанного второго трансгенного локуса, причем указанный по меньшей мере один третий праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 28-30 (A02 Инсерционная граница 1);

по меньшей мере одним четвертым праймером, который связывается со второй фланкирующей трансгенной граничной областью указанного второго трансгенного локуса, причем указанный по меньшей мере один четвертый праймер выбран из группы праймеров, состоящей из SEQ ID NO: 31-37 (A02 Инсерционная граница 2); или

по меньшей мере их десятью смежными нуклеотидами или комплементарными;

(b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и

(с) анализ ампликонов, генерируемых между указанными праймерами,

причем сгенерированные ампликоны для первого и второго трансгенного локуса свидетельствуют о присутствии трансгенного локуса хромосомы A02 и трансгенного локуса хромосомы A05 соответственно, которые являются диагностическими для элитного трансгенного объекта NS-B50027-4, характерное семя которого депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186.

5. Способ по п.4, где указанный способ представляет собой анализ генотипирования на основе конкурентной аллель-специфической ПЦР.

6. Способ по п.4, дополнительно включающий на стадии (а) контактирование указанного образца с по меньшей мере одним праймером, который генерирует ампликон, характерный для по меньшей мере одного трансгена NS-B50027-4,

причем праймер выбран из SEQ ID NO: 1-16, по меньшей мере десяти смежных нуклеотидов любого из этих праймеров или их комплементов,

причем по меньшей мере один трансген выбран из гена *Micromonas pusilla* $\Delta 6$ десатуразы, *Pyramimonas cordata* $\Delta 5$ -элонгазы, *Pavlova salina* $\Delta 5$ -десатуразы, *Pichia pastoris* $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, *Pavlova salina* $\Delta 4$ -десатуразы, *Lachancea kluyveri* $\Delta 12$ -десатуразы или *P. cordata* $\Delta 6$ -элонгазы.

7. Набор, содержащий компоненты для осуществления способа по пп.2-6, где указанный набор содержит по меньшей мере один ДНК, выбранный из SEQ ID NO: 17-37, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

8. Растение или часть растения, идентифицированные способом по любому из пп.2-6.

9. Семя, идентифицированное способом по любому из пп.2-6.

10. Способ получения масла канолы, содержащего докозагексаеновую кислоту (DHA), включающий обработку семени из инбредной линии канолы, обозначенной как NS-B50027-4, или ее потомства, причем репрезентативное семя указанной инбредной линии канолы депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186, для получения масла канолы, содержащего DHA.

11. Способ получения масла канолы, содержащего докозагексаеновую кислоту (DHA), включающий стадии

(a) интрогрессирования NS-B50027-4, депонированного под номером доступа ATCC PTA-123186, в элитную линию Brassica, которая является стерильной;

(b) интрогрессирования NS-B50027-4 во вторую элитную линию Brassica, которая является фертильной;

(c) скрещивания двух линий (a) и (b) для получения гибридного потомства;

(d) культивирования семени гибридного потомства;

(e) сбора зерна, полученного в результате культивирования гибридного потомства; и

(f) экстрагирования масла, содержащего DHA, из гибридного семени потомства.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное гибридное потомство 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.

13. Способ по п.11 или 12, где указанная Brassica представляет собой *B. juncea* или *B. napus*.

14. Геномная ДНК инбредной линии канолы NS-B50027-4,

причем репрезентативное семя указанной NS-B50027-4 депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186,

причем указанная геномная ДНК характеризуется содержанием SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46 или их комплементов, последовательности которых представляют собой границы трансгенных локусов хромосомы A02 и хромосомы A05, которые являются характерными для инбредной линии канолы NS-B50027-4.

15. Клетка растения, полезная для идентификации растения Brassica, которое продуцирует докозагексаеновую кислоту,

причем клетка происходит из инбредной трансгенной линии Brassica или ее потомства, обозначенной как NS B50027-4,

причем репрезентативное семя указанной NS-B50027-4 депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186 и содержит

(a) SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные указанным последовательностям, или их комплементы;

(b) SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные указанным последовательностям, или их комплементы; или

(c) как (a), так и (b);

последовательности которых представляют собой границы трансгенных локусов хромосомы A02 и хромосомы A05, которые являются характерными для инбредной линии канолы NS-B50027-4.

16. Способ детекции наличия трансгенного объекта NS-B50027-4 у канолы или ее потомства в образце, содержащем ДНК растения, причем указанный способ содержит

(a) приведение указанного образца в контакт с

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 5' фланкирующей граничной области между вставкой A02 и нативной ДНК A02 хромосомы Brassica, причем указанная 5' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 2033 по 2132 последовательности SEQ ID NO: 40; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 3' фланкирующей граничной области между вставкой A02 и нативной ДНК A02 хромосомы Brassica, причем указанная 3' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 14156 по 14255 последовательности SEQ ID NO: 40; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 5' фланкирующей граничной области между вставкой A05 и нативной ДНК A05 хромосомы Brassica, причем указанная 5' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 1110 по 1209 последовательности SEQ ID NO: 41; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 3' фланкирующей граничной области между вставкой A05 и нативной ДНК A05 хромосомы Brassica, причем указанная 3' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 47724 по 47823 последовательности SEQ ID NO: 41; или

по меньшей мере их десятью или пятнадцатью смежными нуклеотидами или комплементами;

(b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и

(c) анализ ампликонов, генерируемых между указанными праймерами,

причем указанный способ является диагностическим для элитного трансгенного объекта

NS-B50026-4, характерное семя которого депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186.

17. Способ по п.16, причем способ представляет собой анализ генотипирования на основе конкурентной аллель-специфической ПЦР.

18. Способ по п.16, причем указанная 5' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 2033 по 2132 последовательности SEQ ID NO: 40 охватывает область из 100 п.о., содержащую 43 п.о. вставки и 57 п.о. ДНК хромосомы A02 Brassica.

19. Способ по п.16, причем указанная 3' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 14156 по 14255 последовательности SEQ ID NO: 40 охватывает область из 100 п.о., содержащую 46 п.о. вставки и 54 п.о. ДНК хромосомы A02 Brassica.

20. Способ по п.16, причем указанная 5' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 1110 по 1209 последовательности SEQ ID NO: 41 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica.

21. Способ по п.16, причем указанная 3' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 47724 по 47823 последовательности SEQ ID NO: 41 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica.

22. Способ детекции наличия трансгенного объекта NS-B50027-4 в образце, содержащем ДНК растения, причем указанный способ содержит

(а) приведение указанного образца в контакт с

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 5' фланкирующей граничной области между вставкой A02 и нативной ДНК A02 хромосомы Brassica, причем указанная 5' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 2040 по 2139 последовательности SEQ ID NO: 40; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 3' фланкирующей граничной области между вставкой A02 и нативной ДНК A02 хромосомы Brassica, причем указанная 3' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 14152 по 14251 последовательности SEQ ID NO: 40; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 5' фланкирующей граничной области между вставкой A05 и нативной ДНК A05 хромосомы Brassica, причем указанная 5' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 1110 по 1209 последовательности SEQ ID NO: 41; или

по меньшей мере одним праймером, специфичным для 3' фланкирующей граничной области между вставкой A05 и нативной ДНК A05 хромосомы Brassica, причем указанная 3' фланкирующая граничная область находится в диапазоне нуклеотидов с 47724 по 47823 последовательности SEQ ID NO: 41; или

по меньшей мере их десятью или пятнадцатью смежными нуклеотидами или комплементами;

(b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и

(c) анализ ампликонов, генерируемых между указанными праймерами,

причем указанный способ является диагностическим для элитного трансгенного объекта NS-B50026-4, характерное семя которого депонировано под номером доступа ATCC PTA-123186.

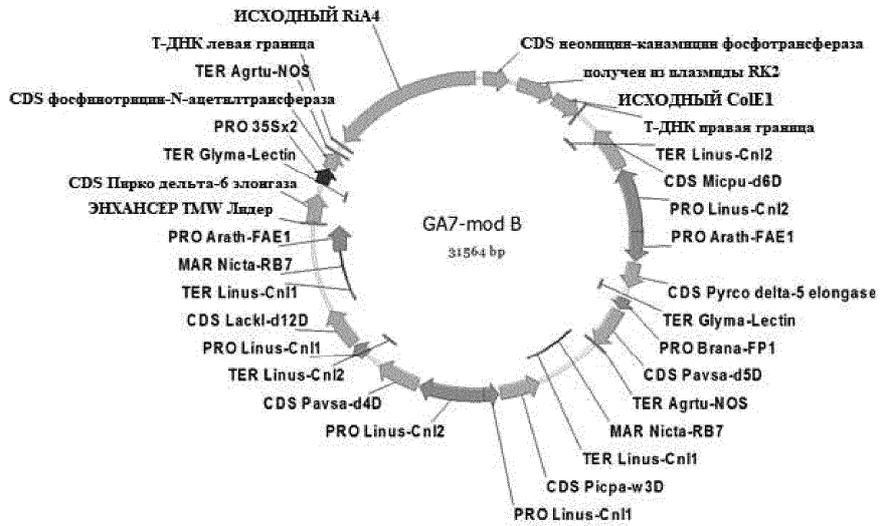
23. Способ по п.22, причем способ представляет собой анализ генотипирования на основе конкурентной аллель-специфической ПЦР.

24. Способ по п.22, причем указанная 5' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 2040 по 2139 последовательности SEQ ID NO: 40 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A02 Brassica.

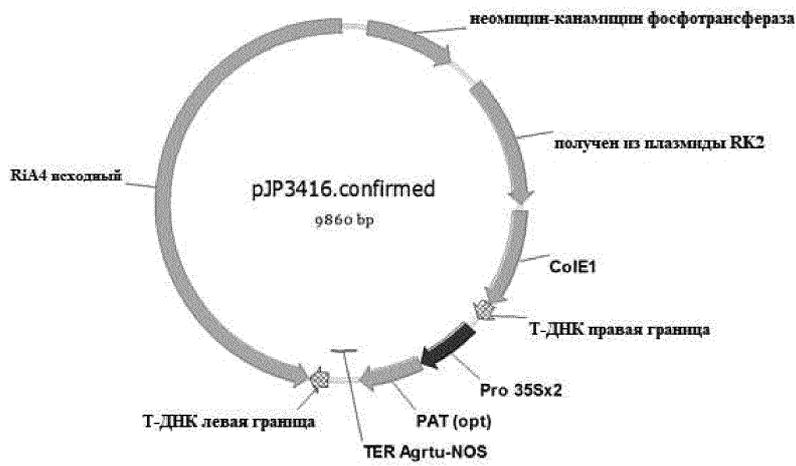
25. Способ по п.22, причем указанная 3' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 14152 по 14251 последовательности SEQ ID NO: 40 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A02 Brassica.

26. Способ по п.22, причем указанная 5' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 1110 по 1209 последовательности SEQ ID NO: 41 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica.

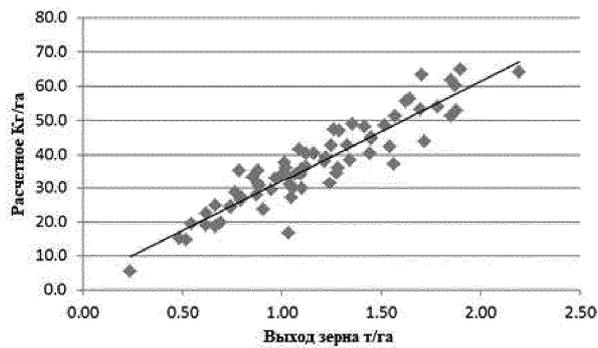
27. Способ по п.22, причем указанная 3' фланкирующая граничная область от нуклеотидов с 47724 по 47823 последовательности SEQ ID NO: 41 охватывает область из 100 п.о., содержащую 50 п.о. вставки и 50 п.о. ДНК хромосомы A05 Brassica.



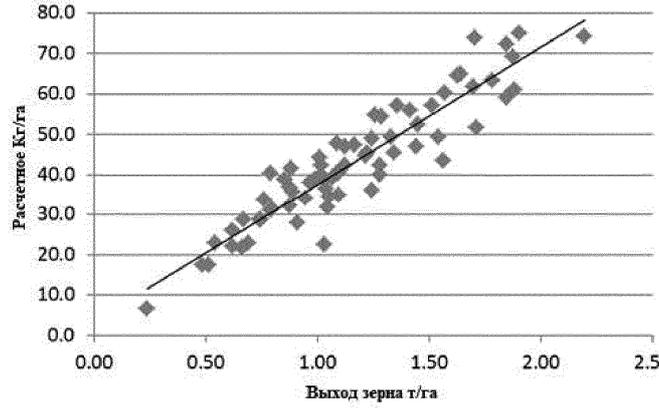
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

GAGCCTTGAGTGCCTACTTTGGGAACAAAACTTGGTTTGATGCTATCCTAGTCTTTTTCTCTTTTATAAACTATTTATAG
ATAAAAACTAAAAATAGTATTTATGAGATTGTCTTTTTTTCACAATATAAAATTTTATTTAGGTATAAAAAATAAATA
GAATTAGTATTTATGAGATATAAAAAACATTTAATTTAATTAATAATAAATAAAGTATAAATTAAGTTATACAATA
TCTAATAAATAAAAAATGATTTAAAAATATGGGAAAACAATATATATTTTAAAGCGATCTTACTCGATCTCTCTTTGA
TCCCAAAGTTTTCACTCTTTTAAATATATTTGTTGCGAATATAAAACCGATGATTTCTGGGGTTTGATAGGATTAAG
ACACGATCGCAGAGAAAGTAGAATCAATCGTGAAGGGGAAGGATATTCGAAACCCATAATTCGATCGTATCCCCATCTT
CTACGAAAGCATCGATCGACTTTTTCTGATTCAGTGAGATTGAAATCAAAGTTTGATTTTTTTCGACCTGATGGGTTT
CTTAAAGAAAGTAAACGGGATTTTCGGGTTTCGGGCACAACGATGTTGGGACGAGCTGCTGCGAGAGACGAAGATGGTG
AAGGGGATAACACTGGATCAGTCTCTGAGGACGGAGATAAACGCCGGGAGGGTAATCAGGCAAGGTTCCGTGAAACCGGA
CTTCCAAGGAGGGGTTTTGGAGTTCCGGTTCAAGTAGCCGTCGAACGGTCTAGTCTGGTCTTATCTTCAGCCTTGTGC
TGCTTCGACGGTGGAGTTGAGTTTGTCTTTCTTTCATGGTTGTGATTTTAACTGTGTAGAAGTCTAGGGACTGAAGAA
ATTAATGAGAAATTTGAGGGTTGCTAGTTTTGATTTCTGATCTTGTAAATGTGGCTACAGTGTGTACTTGTCTTGTTCAGG
ATCGTTAAATCCATTTGTTGGTTCCGATCATCTATGTTAGTTGGTAAATTTGGTCTTGTGAGTTTGTTTAAGTTGTTT
TTGTGTCTTCATTTCTAAAGCTTAGCATTTGATGAACAGTTGAAATTTAGAACTTTTGTCTTAAGCTTAACATTAATG
AATATCGAATCTTTGTTCTACTCAGTCTTTCTTTGTTTTTGGTTGTGATATGTTCTCGTTTCAACGTAGTTTATGTTCT
TCTTGTGATTTGGCTTTACATTTGACGGTTTCCGCTTTAGTTAGGTGTCTGCATTATAGTTAGTTTCAATGCTATCTTAA
ATTTCTCTGTTTCAATCTCTATATAACAATTAAGAGTGGCAGTGAAGTTTATGACAGGACACGATATATGTTTTAGC
TTGATTTAGTTGGGTTAAAGCAAAAAGTTTTTGTTCACCTGTCTGCTACAGAACCTGTAATTTAGAAATGATGATGGA
TCTCAATGCTTAAACGGTTTTCGATTTCAATCATGAGTCCAGGGTGTATAGAGTTTGAATCTTAAATTTGGTTCTGTTGTTG
GGAAAGACAATAATCCAGTCTTTAAGAAGCTTAGTGGGTTGATTTTATCTCCCAAGACTATTCGATTTCCCAACGATTTG
ATATGTTTTTTTTAATCAAGTTTTTGTGATGGCAATAAACTAACATCCAGCATAGTTATTTAGCTCGACTTAGTTTTAC
CATTAGGGACTACGATGTTACTCAATCGCGCTAAGGATTTGATGAAGATGGAGATGTTGCGAGATGAGTTCTTGGAAAGATGA
TAACTGTAAGACTTTGCCAGAAAATGCAAAAACAAAGCTGCAAAAAGTGAAGGTTTAGTGATATCTTCTGATGGGAAAC
TTTCAGCATTAAATGCAATTGAGCAGTGAACACCAAGGATAAATTTTACTGATTAGTGTGTGATTTGAACTCAAAGAAAGTT
AGAATCTGGTTTTTCATTTAGCCATTTCAATCTCGATGTAATAATCGGTTAGATTCTGGTTGTTGATCTTGGAACTTGA
TGTTTTGTAAGTGTGAAATTTTTTTTTGAAAATAGACAAGTGAATCTGTTTTGGGGTTGTGTGAAAACCTGTGAGCAATTTG
TGGAGTGTCTCAAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGCCGGGAAACGACAATCTGCTAGTGGATCTCCAGTCCACGCTTG
TAAAACGGGCGCCCCGGGAAAGCTTTCGGCCCGCGGTACCGCCCGTTTCGACTCAGATCTTCCAAGGCCTCGTCTCCGAGT
CCGCTGCTTCTCGCCGCGCCGATCACTTCTCCGCCCAACAAGGCTTGTAGTTAATAGGAATCATTGAGGATTTGAT
TCCGGGCGTAGTAATAATAATATAGTATTAGTATAGATAATATGTTTCGTTTGGGATCTTTGGAACGTTGCTCTGTTCT
CTTGTGTTCAATTTAAAGCTTTTGAAGGATAGTTGCGAAGCTGTTCCGGTGATGCTTCACTCTCAAGACTAGATTTG
GGTAAAGAACATCCATGCATGGATATGGAATGTTGTTCTCCGATTTGGAGATTTTATAAAATTTAAAATTCATGAT
TTAAAAAACACATAAAAACCAAAAATTCATGATTTATTGACAATACGATACAAAATTAGCACCCCGGCTACTGGCTC
ATTACACATTTCCCTTCCCTTCAATCTCACTTTGTGGCTTTATATATATATATATACATATATTTACCGTTATATAT
TCCAGTCAACATAAGCTTGTAAATTAATCATTAGTGAGCCTTCTCAGCCTTTCCGTTAACGTAGTAGTGTGTCCCACCTT
ATCAAGGTTAGAGAAAGTAGCCTTCCAAGCACCGTAGTAAGAGAGCACCTTGTAGTTGAGTCCCACTTCTTAGCGAAAG
GAACGAATCTTCTGCTAACCTCAGGCTGTCTGAATGAGGCATATCAGGGAAGAGTGGTGGATAACCTGAAGTTAAGG
TATCCCATAAAGCCAGTTACGATCTCTAGAAAGGATCGATATCAACGGTGTGATCAACAGCGTAGTTAACCCAAGAAAG
GTGCTTATCAGATGGAACAACAGGGAGGTGAGTATGAGAAGTGAAGAGTGAAGCAAGGATACATGTAAGCGATCCAGT
TTCCGAAAGTGAACCACAGTAAGCAACAGGCCAAGAGTATCCAGTAGCAAGCTTGATAACAGCGGTTCTAACACATGA
GAAACGAGCATCAAAGAAGCCTTTCGATGTTCTTCTTACGGAGAACTTGTCTAGGGTGGAGAACGTAGATCCAGAAAGC
TTGAACAAGAGTCCAGAGGTAACAGGAACGAAATCCAGCTTGAAGTCTAGCCCAAGCTCTAGAGAATCTCTAGGTC
TGTATCTCTCAACAGCAGTGTGAAAGAAAGCCACAGCAGGAGTGGTATCAAGATCCATATCGTGTCTAACCTTTGAGGG
GTAGCATGGTCTTGTATGCACTGGTTCCACATCTCACCAGAAGTAGAAAGTCCGAATCCACAAGCTCATAGCCTGAAG
TCTCTTGTCCACGTAAACAGATCCGGTAAGAGAGTTATGTCCACCTCATGTTGAACCCATCCACATCTAGCTCCGAAGA
AAGCACCGTAAACAACAGAAGCAATGATAGGGTATCCAGCGTACATAAGAGCAGTTCCAAGAGCGAATGTAGCAAGAAGC
TCGAGAAGTCTGTAAGCCACATGGGTGATAGAAGGCTTGAAGAATCCATCTCTCAAGCTCAGCACGCCATCTAGCGAA
ATCTCAAGCATAGGAGCATCTCAGACTCAGATCTCTGATCTCAGCAGGTTAGAAAGGCAAGCTCAAGCATCTCC
AAGCCTTGAGAGAAGCATGTGGAATCTTTGAAAGCCTCAGTAGCATCAGCACAGTGTAGCAAGCATGTAGAAGATC
ACAGATCCACCAGGGTGTGAAAGTTAGTCAATCGTACTCAAGCTCTCAACTTAACCCATCTAGTCTCGAAAGTAGC
ATACAGCTCATGAGGCTCAAGAGTCTTAAGATCAACAGGAGCAGTAGAAGCATCTTAGCATCAAGACCTCAGCAGAAG
ATTTAGACCTGGTAAGTGGAGATCTAGGAGAAGATCTCCATCAGTCTTAGGAGGACATGGTATGGTAATTTGAAATG
TAAATTTAATGTTTGTGTTG
GCAAGTAGTATGATGTTCTAGGTGAAGTATGGGGTGTTTTATAGCGGAGATGGTGAATGGATGGTCCGCACATAA
GAAATGGAGGGGAAGGTTCTTGCCTTCTCAGTTTGCATGGATGCATGGGTTTCATTTTGTAACCGTAATTAAGGA
CAATGAAGTGCAGGTGCTCTCAAGTTTTCAGAGGGATATGTTGACAGAAGAAACGGCGATGATATTTGATGGAATGG

Фиг. 5

CCATCTAGTGTGAATCTATTCCGGTTGATAATACTAGTGCATTTTGGCCGTTAATCCCTTCAATTAACGACAAAACCTTCA
 GTTGAATATTGATTATTTGATTATAGGTTCTGTAACACAATACCAAGTTTATTTAGAGGGGAGACATACAAATAGTTTC
 GATATAAATAATAGAGTGGTTAAACTTAGTTATTAACATATATATAAAGTCTAAAAGTTAAATTAATTTTTTAATTGCA
 AATATATAAAGTCTAAAAGGGTTACATTAATTTCTTAAGAGATGTAACCTCTGTTGGAATCTGACTTAATCCGCTCATCAC
 TCTGGTTCCAGTTCTAATCTAATGAATGTTTCTGCCAAAAGAAATTTGAAGCAAGAAGTAAATTTGATCAATGCCGTC
 CCCACACCAAAACCGTCAACCCACTACCATCGCCGCGGAGACCCCAACTCAACCTCCACCCATCGGTAAGAAGCACAGG
 GCAGCCCGCACCACCACCAATTTGGCGTGCATGACACCTAGGGACTTGGCACGGGAGCGCGCACGTTGGATGCAATGA
 CGGGATATCAGATGACAGGAAACGAGTTGAGAGACCATACGATGTAGAATATGAGCTCACCATCAACGAGAAAAC TAGGA
 AAATCACAAAAAACAACCTCTCGTAATTTGACGAGTGGCACAGATGGGTCTGCCTCAACATATCTCTAATACGCCGAAG
 GTCGGACGGGAATTTGCCGGAATCCGGTGTGGAGCTCACGACTCTGAAAGATAGGGCTTCCCTGTTTCGTTTCGCTC
 ACCCACTGGACGTCCTCATGTGATGGATTTCGGTCATTTGGTTGCTGACAAACCACTTCTGAAGCTCCATGAGATGAGT
 CTTCAATAGGTCCTGCTCAATACCGTGGAGTTATGGTTGCAAGTCCATAACTTGGCGTTCGAATATTTTGGCGAGCCA
 TATGCTTGAGGGTACCCTAGTAGATTGGTTGGTTGCCATTAAGGCCATGACAAGAAGAACC AAAAGTTCTTCCCTAATGCTTT
 CATGAGGCTTCCGGTCTGTTATGGATGTCGGAACCCCTCTTGAAGAACGAGACGTTATATGCATGACGGTAAGACTA
 TTACTTGTCTAGTATAAGTATGAAAGATTACCTGCTTCTGCTTGTGTTGTGGATTGATTGGACACGTTGAAAAAATGT
 GCATTCGATTTTCAATACTCAGAGATCGACTTCCCTTTCTCTAGGAGTATTCGATCAAGGCATTAACATGGAAGGAGC
 TCAAGCTCTAAAGGCTTCAAAATGGAACCTGAAAAATTTCAACAAGCCTAAACTGAAATCGAAGTCAAAATCACCAACCG
 GGAGCTCTAAATCAGCAAACTCCTCCTCCACAGTATCCAATCATCGTGACGATGCTCCAGGTATTCGAGCCAGGTA
 TTGCAAGCTAGGAGTAGGATAGAGACCTTAAACGTCGTTGGTGTGAAGAGTCATCTTCAGACCTAATGGAGATAGATGTA
 GACGGCCGGCACGAAGACTCTGAAACCCGAAAAGGCTAGTCCAGGATAAGGATCTGCTATCCCAACTGACCTCTCGTTAG
 TATGCTTGAGGGTACCCTAGTAGATTGGTTGGTTGCCATTAAGGCCATGACAAGAAGAACC AAAAGTTCTTCCCTAATGCTTT
 TCCCAAGGCTCTCAACTAGACGAGGAGGAGGATGGTCAAGACCTAGGATAATGATGTTTCCAAATGACCTGAATG
 TCCATAGCTAATTTTTTAGTCTTGCCTTCTGCACCTTTTGTATTATGTTCTGGTGACTATGTTATTTACCCCTTGTCCG
 TAGCTTGAGGGTACCCTAGTAGATTGGTTGGTTGCCATTAAGGCCATGACAAGAAGAACC AAAAGTTCTTCCCTAATGCTTT
 CTTTGTCCCTACTCAATTCCTAGTTGTGTAATGTATGTATATGTAATGTGTATAAAACGTAAGTACTTAAATGACTAGG
 AGTGGTTCTTGAGACCGATGAGAGATGGGAGCAGAACTAAAGATGATGACATAAATAAGAACGAATTTGAAAGGCTCTTA
 GGTTTGAATCCTATTGAGAAATGTTTTGTCAAAGATAGTGGCGATTTTGAACCAAGAAAACATTTAAAAATCAGTAT
 CCGGTTACGTTCAATGCAAAATAGAAAAGTGGTCTAGGATCTGATTGTAATTTTAGACTTAAAGAGTCTCTAAGATCTCAATC
 CTGGCTGTGTACAAAATACAAATAATATATTTTAGACTATTTGGCCTTAACTAAACTTCCACTCATTTACTGAGGT
 TAGAGAATAGACTTGGCAATAAACACATTTCCCGAGAAATACTCATGATCCATAAATAGTCAGAGGGTATGCCAATCAGA
 TCTAAGAACACACATTTCCCTCAAATTTAATGACATGTAATCATAGTTTAGCAAAATTCAAAAATAATGATGATATAA
 GACAGAATTTGTAGACTTTTTTTGGCGTAAAAGAAGACTAAGTTTATACGTACATTTATTTTAAAGTGGAAAACCGA
 AATTTTTCCATCGAAATATATGAATTTAGTATATATATTTCTGCAATGACTATTTTGTATTTTGGCAACTTTCAGTGGG
 TACTACTTTTAACTAATGTGTATGGATGATGAGTTTGGATATACACATGTCTAAATGCATGCTTTGTAACACGTAACG
 GACCACAAAAGAGGATCCATACAAATACATCTCATAGCTTCCCTCATTTATTTCCGACACAAACAGAGCATTTTACAACA
 ATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTAACAATTACATTTACAAATACCATACCATGGCCTCTATCGCTATCCCTG
 CTGCTCTTGTGGAACCTTTGGATACGTTACCTACAATGTGGCTAACCCCTGATATCCAGCTTCTGAGAAAGTTCCTGCT
 TACTTCATGCAGGTTGAGTACTGGGGACTACTATCGGAATTTGGATACCTCCTCTTCATCTACTTCGGAAGGCGTAT
 CATGCAGAACAGATCTCAACCTTTCCGACTCAAGAACGCTATGCTCGTTTACAACCTTCTACCAGACCTTCTTCAACAGCT
 ACTGCATCTACCTTTCTGTTACTTCTCATAGGGCTCAGGGACTTAAGGTTTGGGGAAACATCCCTGATATGACTGCTAAC
 TCTTGGGGAATCTCTCAGGTTATCTGGCTTCACTACAACAACAAGTACGTTGAGCTTCTCGACACCTTCTTCATGGTGAT
 GAGGAAGAAGTTCGACCAGCTTTCTTCTTCCATCTACCACCACACTCTTCTCATCTGGTCATGGTTCTGTTGTTATGA
 AGCTTGAGCTGTTGGAGATTGCTACTTCCGATCTTCTGTTAACACCTTCGTCACGTCATCATGACTCTTACTACGGA
 CTTGCTGCTCTTGGAGTTAACTGTTTCTGGAAGAAGTACATCACCCAGATCCAGATGCTTCAGTCTGTATCTGTGCTTC
 TCACTCTACTACACCCGTTACGTTTCAAGATACCCTTTCTGGCTTCCCTTACCTTCAACTCTGGGTTATGGTGAACATGT
 TCGTCTCTTCCGCAACTTCTACCCTAAGAGGTACAAGTCTAAGGGTCTAAGAGCAGTGATAAGGCGCGCGCGCGCC
 GGGCCGCGCCATGTGACAGATCGAAGGAAGAAGTGTAAATAGACGACTCTCACTACTCGATCGCTAGTGATTGTCAT
 GTTATATATAATAATGTTATCTTTCAACAATTTATCGTAATGCATGTGAAACTATAACACATTAATCCTACTTGTGATATG
 ATAACACTCTCCCATTTAAAACCTTGTCAATTTAAGATATAAGATTTTAAATGATTAATAAATAATATATATAA
 TTCAATCACTCCTACTAATAAATATTAATTTATTTATTTGATTAATAAATACTTATACTAATTTAGTCTGAATAGAA
 TAATTAGATCTAGTCTCATCCCTTTTAAACCAACTTAGTAACGTTTTTTTTTTTAAATTTTATGAAGTTAAGTTTTTA
 CTTGTTTTTAAAAGAATCGTTCAATAAGATGCCATGCCAGAACATTAGCTACACGTTACACATAGCATGACGCCGCGGA
 GAATGTTTTCTTCGCCACTTGTCACTCCCTTCAAACACCTAAGAGCTTCTCTCTCACAGCACACATACAATCACAT
 GCGTGCATGCATTTACACGTCATCGCCATGCAATCTCSTTTATAGCCTATAAATTAACCTCATCCGCTTCACTCTTTA
 CTCAAAACCAAACTCATCGATACAAACAAGATTAATAACATACACGAGGATCTTTTACAACAATTAACAACAACAACA
 CAACAACAACATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACAATTAACA
 CTGCTCAACTTACGAAGTTGATACCTCAAGAGCAGCAAGAAGAAGGCTTGTATCGGAGATAGGGCTTACGATGTT

Фиг. 5 (продолжение)

ACCAATTCTGTTAAGAGACACCCTGGTGGAAAGATCATTGCTTACCAAGTTGGAACATGATGCTACCGTACTTACAAGCA
 GTTCCATGTTAGATCTGCTAAGGCTGACAAGATGCTTAAGTCTCTTCTTCTCGTCTGTTCAAGGGGATCTCCAA
 GAAGGGCTGATCTTATCGCTGATTTCCAAGGTTCCCAAGCAACTTGAGGCTGAGGGAATGTTCCAGCCTTCTCTTCT
 CATGTTGCTTACAGACTTGGCTGAGGTTATCGCTATGCATGTTGCTGGTGTCTCTTATCTGGCATGGATACACTTTTCG
 TGGAAATCGCTAGCTTGGAGTTGTTGAGGGAAGATGTGGATGGCTTATGCATGAGGGTGGACATTACTCTCTACTGGAA
 ACATGCTTTCCAGCAGAGCTATCCAAGTTGCTTGTACCGACTTGGATGTGGAATGTCTGGTGTCTGGTGGCGTAAACAG
 CATAACAAGCACCATGCTACTCTCTCAAAGCTTCCAGCAGATGTTGATCTTGATACCTTCTCTCTGTTGCTTTCCATGA
 GAGAATCGCTGCTAAGGTTAAGTCTCTGCTATGAAGGCTTGGCTTCTATGCAAGCTAAGCTTTTCGCTCTCTTACCA
 CTCTTCTTGTGCTTGGATGGCAGCTTACCTTCACTTAGACACATGCTCAGGACTAAGCAGTACGATGAGCTTGGT
 ATGCTCGGAATCAGATACGGACTTGTGGATACCTTGTGCTAAGTACGGTGTGGATACGTTCTCGCTTGTACCTTCT
 TTACGTTACGCTTGGAGCTATGTACATCTTCTGCAACTTCCGCTGTTCTCATACTCACCTCCCTGTTGTTGAGCCTAACG
 AGCATGCTACTTGGGTTGAGTACGCTGCTAACACACTACTAAGTCTTCCATCTTGGTGGTGTGATTGGTGGATGCT
 TACCTTAACCTACCAGATCGAGCACCACCTTACCCTTCTATGCCTCAATTCAGACACCCTAAGATCGCTCTAGAGTTAA
 GCAGCTTTTCGAGAAGCAGGACTTCACTACGATGTTAGAGGATCTTCCAGGCTATGGCTGATACCTTTCGCTAACCTTG
 ATACGTTGCCATGCTCTGAGAAGAAAATCGAGTAAATGAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTG
 AATCGTTTCAAATTCGCTGATGATTAATCATATAAATTTCTGTTGAATACGTTAAGCAGCTAAATAATTAAGGTTAA
 CATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAAT
 AGCGCGCAAATAGGATAAATTTATCGCGCGGCTGTCATCTATGTTACTAGATCGGTCGATTAATAATCCCAATTTAT
 TGGTCTAATTTAGTTTGGTATTGATTAACAAAATTCGAACCAAACCAAATAAATAATATAGTTTTTATATATATGCC
 TTTAAGACTTTTTATAGAATTTCTTTAAAAAATATCTAGAATAATTTGCGACTCTTCTGGCATGTAATATTTCTGTTAA
 TATGAAGTCTCCATTTTATTAACCTTTAAATAATTTGGTTGACGATCACTTTCTTATCAAGTGTACTAAAAATGCGTCA
 ATCTCTTGTCTTCCATATTCATATGCTCAAAATCTATCAAAATCTTATATATCTTTTTCGAATTTGAAGTGAATTTTC
 GATAATTTAAAAATTAATAGAACATATCATTTATAGTATCATATTTGATTTTTATACTTAATTAAGGTTAACTTAAAG
 TTTGAAAGTGTACATCAACGAAAAATTAGTCAAACGACTAAAATAAATAAATATCATGTGTTATTAAGAAAATTCCTTA
 TAAGAAATTTTTAATAGATCATATGTTTGTAAAAAATAAATTTTTTACTAACACATATTTACTTATCAAATAATTTGA
 CAAAGTAAGATTAATAATATTTTCACTAACAAAAAACCAGAAAATGCTGAAAACCCGGCAAACCCGAACTTCC
 AAACCGATATAGTTGGTTGGTTGATTTTTGATATAAACCGAACCAACTCGGTCATTTGCACCCCTAATCATAATAGCT
 TTAATATTTCAAGATATTTAAGTTAAGCTTGTCAATATCTGGAATTTTGCAAAATGAATCAAGCTTATAGGCTGT
 AATATGAATTTAAAAGCAGCTCGATGTGGTGGTAAATATGTAATTTACTTGATTCTAAAAAATATCCCAAGTATTAATA
 TTTCTGTAGGAAGAGGTTAGCTACGATTTACAGCAAAGCCAGAATACAAAAGAACCCATAAAGTATTGAAGCTCGAAAT
 ATACGAAGGAACAAATTTTTTAAAAAATACGCAATGACTTGGAACAAAAGAAAGTATATATTTTTTGTCTTAAACA
 AGCATCCCTCTTAAAGAAATGGCAGTTTTCTTTGATGTAACATTTATGCTCCCTCGTTACAAAAATTTTGGACTACTA
 TTGGGAACCTCTTCTGAAAAATAGTGATAGAACCACACGAGCATGTGCTTCCATTTAATTTAAAAACCAAGAACATA
 CATAACATATCCATCAGCTCTCTCTCTTTTTATTACGGTTAATGACTTAAAACACATCTTATTATCCCATCTTAA
 CACTAGCAGTGTCTTTATACGATCTCATCGATCACCCTTCAAACCATGCGACTGCTGCTGCCCTGGAGCTGGCAT
 CGGCTAGGCTGGTCCGCACTGTCCCGAAGGTCCTAGCGACTTGTATTAGATTGATGGGACCCTCTCAACTTCTCTG
 CTGCTGCTCCTGCTGCTGATGCTGCTCATCTGCGCGATTGCACGCTCCAGTCCCTGCATGTGCACTCGCTCTCA
 ATTGCTTAAGATCATCGCAGCAGCTATCGAAGTGTGGCTCTGTTGCCCTCCACGGCTTGGTTGTAGTAGTAGCTG
 CCGCCGCCCTCTGGACTTTTTCCACAGGAACCCCGAATAATTCGATAGAACCACACGAGCATGTGCTTCCATTTAT
 TAAAAACCAAGAAACATACATAACATTTCTCAGCCT
 CTCTCTCTTTATTACAGCTGTACACTAATTAACACATTCATCTCATTTATTATTATTATCCATCCTTAAACCT
 AGCAGTGTCTTTGATGATCTCATAATCGATCACCCTTCTCAGGATCTCTTAGGCTTCACTCCAACGTTGTTGAGTT
 ACGGAACATGTACACACCATCATGGTTCTCAACGAACCTGGCAAGATCTCCAAGTTTTTCAAAGGCTAACCCGAACTGTTCT
 CATCGGTGTGCTGTAGTGTCTCCCATAACTTTCTGATGCACTCGGTAGCTTCTTAGCATGGTAGAATGGGATCCTT
 GAAACGTAGTGATGGAGCACATGATCTCGATGATGTCATGGAAGATGATTCGAGGATTCGCACTCTCATCGATAGT
 AGCAGCAGCACCCTTAGCGAAAAGTCCACTTGGAGCATCGTAATGAGGCATAGAAGAAATCGTGTGCTGAAGGAGGTTAA
 CGAAAACCAAGCTGGTTAAACAAGGATCCAAAGGACGAAACCATGTGATGAAAAGTAGGCCAGAATCCGAAAACCTGTAA
 GCGGTGTAAACAGAAGTGAAGGTAGCAAGGATCCAAGATCAGAAGAAGCATGTACAGGATAGTCTCTTATCGAAAAC
 AGGGCTAGAAGGCGAGTGTGAGACTTGAAGAATAGAAAACACAGGGTAAGGTTGTCAGTAGCGTTAGTAGCAAGGT
 AAAGAGAAAGTCCCTCAAAGCTGTTGGAAACAGAGAGCGAAAACAGAGTAGATAGGAGTTTCCCTCAGCAGATTCGAAGG
 CTGGTAACCTGGTGCTTCTCTTTGAATTCCTCGGCGGTGAAGGAACGAAAACCATATCTCTGGTGTGTCAGTAGC
 CTTATGGTCTTAGCATGAGAGAACTTCCAGCTGAAAGTAAAGGAACCATAAACAAGAGAGTGGAGAACCCATCCCAAGCTG
 CGTTAACCCATCCGATGTAGAGAAAAGCAGAATGTCACACTCATGTCCAAGGATCCAGATTCGAAATCCGAAACCAAG
 ATAGAGAACACGTAAGCAGACCAAGCAGCGAATCTAAGGAATTCGTTAGGGAGAAGAGGGATGTAGGTAAGTCCAACGTA
 AGCGATAGCAGAGATAGCCACGATATCTCTCACCACGTAAGACATAGACTTACGAGAGATCTCTCGTAACAGTGTCTAG
 GGTAGCGTCAAGGATATCTTGTGATGGTGAATCTGGCACCTTGAACCGTTTCCGAAGGTATCGATAGCGGTCTTTTGC
 TGCTGAAAAGATGCAACGTTTCCAGAACCCTAACGCTTGTAGTAGATCCCTCAAGGATCTCAGATCCAGACAGCGTAAAC
 CTTAGACATGGTATGGTAAATGTAATGTAATGTAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
 TTGTT
 TTATATAGTGGAGACTGAGGAATGGGGTCTGTGAGTGTAACTTTGCATGGGCTACACGTGGGTTCTTTTGGGCTTACACG
 TAGTATTATTATGCAAAATGACGCAATACATATACGGTATTTTAAATAATGTGTTGGGAATACAATATGCCGAGTATTTTA
 CTAATTTTGGCAATGACAAGTGTACATTTGGATTATCTTACTTGGCCTCTCTTGTCTTAAATTTGGATTATTTTTATTCTC
 TTACCTTGGCCGTTCAATTTACATCCCTAAAGGCAAGACAGAATTTGAATGGTGGCCAAAAATTAACGATGGATATGA
 CCTACATAGTGTAGGATCAATTAACGTCGAAGGAAAACTAGTATTCTGCCCTTCCGACTCAGATCTTCAAAGGCTCGCT
 TCCGAGTCCGCTGCTTCTCGCCGCGCCGATCACTTCTCGCCGCCAACAGGCTTGTAGTTAATAGGAATCATTCAGGGA
 TTGTGATTCGGGCGAGTAGTAATTAATAATATAGTATTAGTATACAGAACCCTTATTTAGCTAAAAGATTATGTTCTTA
 ATGTTGATAAAGAGTTTGGAGAACAAATATAAATTTGAGCTTCTGATTAGTTGATCGTAATTTGGTCAATTAATTTGATCT
 AACCAAGTGCAGTATAAGAGCTATAAGAGCATCTTCAAAGAGCTTATTTTAGAGTTAATCAGTGCAGTATAAGAGCAT
 CTCTAAAAAACTCTAATTAAGAGTTTTGCAAACTCTATATTTGAAGTTTTAAGGTTTTTTTTTTTCAAAGGCAAAACT
 TCAAATTTAACTTCAAATTTATTTGTAATTTACACTATGCTCTTTATATTTATCATAATTAATATAAGGGGGTGTAGTG
 GGACTTAGATTTCTATAGAGTTTGTGATTTTTAAAAGTTGAGAGATTTGTTAAATTTAGAAAAGAGATGTAGAGAAATTTG
 TCTATTTGTGAAAATCTATGAAAATAGAGTAATGTAATGATTCTAAGAAATCAAAGTAAACATGTAGTATTCTCAAATCT
 AAATTTGTGAAACAGTGGTCCAGATTTTCAAGACTCAGACTAAAGGCTATGGAGGAAGCTAGGGTTTTGGCGGATGGCG
 ACATAGGTTTTGAGTACGGCAGATTTGGATGAACTATGATGGATGTGGGGGAGAGAGGGGAGACCCGCGAGGATCCG
 CCAGATAAGTTAACCTCATGGGTAGCGAAGGTTGGTGGAGACGGCTGAGGGAGGGATGCCAGTACCGGAGTTTTGATTGC
 AGATTTCTTTTGTCTCGGAGAGGGTACGGGTAGAATTTCCGAATG

(SEQ ID NO: 40)

Фиг. 5 (продолжение)

TTGCCGTTTCGAATATTTTTCGGGAGCCAGTCGGACGGGAATTGGCGAGCTCGGCTGACACCTATAAAGGCCATGACAAGAA
 GAACCAAAAGTCTTCCCTAATGCTTTCATGAGGCTTCGGGTCGTTATGGATGTCGGAAAACCCCTCTTGAAGGAACGAG
 ACGTTATTTATGCATGACGGTAAGACTATTACTTGTTCAGTATAAGTATGAAAGATTACCTGTCTTCTGCTTTGTTTGGG
 TTGATTGGACACGTTGAAAAAATGTGCACTTCGATTTCAATACTCAGAGATCGACTTCCCTTTCTCTAGGATATTTC
 GATCAAGGCATTAACATGGAAAGGAGCTCAAGCTCTAAAGGCTTCACAATGGAACTGAAAAATTTCAACAAGCCTAAAC
 TGAATTCGAAGTCAAATCACCACCGGGAGCTTAAATCAGCAAACTCCTCCTCCACAGTATCCCAATCATCGTGCAC
 GATGCTCCAGGTATTGCAAGCCAGGTATTGCAAGCTAGGAGTAGGATAGAGACCTTAAACGTCGTTGGTGTGAAGAGTCA
 TCTTCAGACCTAATGGAGATAGATGTAGACGGCGCACGAAGACTCTGAAACACCAGAAAGGCTAGTCCAGGATAAGGAT
 CTGCTATCCCACTGACCTCTCGTTAGTCCCAAGGCTCTCACTAGAGCAGGAGGAAGGATGGTCAACAAGACTAGGATA
 ATAAAACGTAGTACTTAAATGACTAGGAGTGGTCTTGAGACCGATGAGAGATGGGAGCAGAATAAGATGATGACATA
 ATTAAGAACGAATTTGAAAGGCTCTTAGGTTTGAATCCTATTGCGAATGTTTTTGTCAAAGATAGTGGCGATTTTGAAC
 CAAAGAAAACATTTAAAAAATCAGTATCCGGTTACGTTTATGCAAAATAGAAAGTGGTCTAGGATCTGATTTGAAATTTAG
 ACTTAAAGAGTCTCTTAAGATTCAATCCTGGCTGTGTACAAAACACTACAAAATAATATATTTTAGACTATTTGGCCTTAACT
 AAACCTCCACTCATTTACTGAGGTTAGAGAAATAGACTTGGGAAATAACACATTCGCGAGAATACTCATGATCCCAT
 AATTAGTACAGAGGTTATGCCAATCAGATCTAAGAACACACATTCCTCCTCAAAATTTAATGACACATGTAATCATAGTTTAGC
 ACAATTCAAAAATAATGTAGTATTAAGACAGAAATTTGAGACTTTTTTTGGCGTTAAAAGAAAGACTAAGTTTATACG
 TACATTTTATTTTAAAGTGAAAACCGAAATTTCCATCGAAAATATGAAATTTAGTATATATATTTTGGCAATGTACT
 TTTGCTATTTTGGCACTTTCAGTGGACTACTACTTTATTACAATGTGTATGGATGCATGAGTTTGGATATACACATGTC
 ATACATGATGCTTTGTAACACGTAACGGACACAAAAGAGGATCCATACAAATACATCTCATAGCTTCTCCATTTATTTT
 CCGACACAAACAGAGCATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
 ATACCATGGCCTCTATCGCTATCCCTGCTGCTCTTGGTACGTTACCTACAAATGTGGTAAACCTGAT
 ATCCCAGCTTCTGAGAAAGTTCCTGCTTACTTTCATGCAGGTTGAGTACTGGGGACTACTATCGGAACATTTGGATACCT
 CCTCTTCATCTACTTCGGAAGCGTATCATGCAGAACAGATCTCAACCTTTTCGGACTCAAGAACGCTATGCTCGTTTACA
 ACTTCTACCAGACTTCTTCAACAGCTACTGCATCTACCTTTTCTGTTACTTCTCATAGGGCTCAGGGACTTAAAGTTTGG
 GAAACATCCCTGATATGACTGCTAACTCTTGGGAACTCTCAGGTTATCTGGCTTCACTACACAACAAGTACGTTGA
 GCTTCTCGACCTTCTCATGGTGTAGGAAAGGTTGACGACGCTTCTTCTTCTTCACTACACACACTCTTCT
 TCATCTGGTATGGTTCTGTTGTTATGAAGCTTGAAGCTTGGCCTGTTGGAGATTGCTACTTTCGGATCTTCTGTTAACACCTTCG
 CACGTTGATCATGACTCTTACTACGGACTTGTGCTCTTGGAGTTAACTGTTTCTGGAAGAAGTACATCACCCAGATCCA
 GATGCTTCAGTTCTGTATCTGTGCTTCTCACTCTATCTACACCGCTTACGTTTCAAGAAACCGCTTCTTGGCTTCTTACC
 TTCAACTCTGGGTTATGGTGAACATGTTGTTCTTTCGCCAATCTTACCCTAAGAGGTACAAGTCAAGGGTGCSTAAG
 AAGCATGATAAAGCGCGCGGGCCGCGCCGCTTCCATCGAAAATATGAAATTTAGTATATATATTTTGGCAATGTACT
 ACTACTCGATCGCTAGTGTATGTCATTTGTTATATATAAATGTTATCTTTCACAACCTTATCGTAATGCATGTGAACATA
 TAACACATTAATCTACTTGTATATGATAACACTCTCCCAATTTAAAACCTTGTCAATTTAAAGATATAAGATTCTTT
 AAATGATTAATAAATAATATATAAATTCATCACTCCTACTAATAAATTAATTAATTAATTTATTTGATTAATAAATAA
 ACTTATACTAATTTAGTCTGAATAGAATAATTAGATTCTAGTCTCATCCCCTTTTAAACCAACTTAGTAAACGTTTTTTTT
 TTTTAAATTTTATGAAGTTAAGTTTTTACCTTGTTTTTTAAAAGAATCGTTTATAAGATGCCATGCCAGAACATTAGCTAC
 ACGTTACACATAGCATGCAGCGCGGAGAATTGTTTTTCTTTCGCCACTTGTCACTCCCTTCAACACCTAAGAGCTTCTC
 TCTCACAGCACACATACAATCACATGCGTGCATGCATTTATACAGTGCATCGCCATGCAAAATCTCCTTTTATAGCCTAT
 AAATTAACCTCATCCGCTTCACTCTTACTCAAACAAAACCTCATCGATACAAACAGATTAATAACATACACGAGGATCT
 TTTACAACAATTACCAACA
 ACTCTTACTCTTATGCTGCTCCTCCTTCTGCTCAACTTACGAAAGTTGATACTCCTCAAGAGCACGACAAGAAAGAGCTT
 GTTATCGGAGATAGGGCTTACGATGTTACCAACTTCGTTAAGAGACACCCTGGTGGAAAGATCATTTGCTTACCAAGTTGG
 AACTGATGCTACCGATGCTTACAAGCAGTTCCATGTTAGATCTGCTAAGGCTGACAAGATGCTTAAAGTCTTCTTCTC
 GTCCTGTTTACAAGGGTACTCTCAAGAAGGGCTGATCTTATCGCTGATTTCCAAGAGTTACCAAGCAACTTGAAGCT
 GAGGGAATGTTTCGAGCCTTCTTCTTCTCATGTTGCTTACAGACTTGTGAGGTTATCGCTATGCATGTTGCTGGTGTGCTG
 TCTTATCTGGCATGGATACACTTTCGCTGGAATCGCTATGCTTGGAGTTGTTCAAGGAAAGATGTGGATGGCTTATGCATG
 AGGGTGGACATTACTCTCTCACTGGAACATTTGCTTTCGACAGAGCTATCCAAGTTGCTTGTACGGACTTGGATGTGGA
 ATGCTGGTGTCTGGTGGCGTAACCAGCATAAACAAGCACCATGCTACTCCTCAAAGCTTCAAGCAGATGTTGATCTTGA
 TACCCTTCTCTGCTTTCCTATGAGAGATCGCTGCTAAGGTTAAGTCTCCTGCTATGAAGGCTTGGCTTTCTATGC
 AAGCTAAGCTTTTCTGCTCCTGTTACCACTCTTCTGTTGCTCTTGGATGGCAGCTTACCTTCACTAGACACATGCTC
 AGGACTAAGCACTACGATGAGCTTGTATGCTCGAATCAGATACGGACTTGTGGATACCTTGTGCTAAGTACGCTGCT
 TGGATACGTTCTCGCTTGTACCTTCTTACGTTTCAAGCTTGGAGCTATGTACATCTTCTGCACTTCTGCTGTTTCTCATA
 CTCACCTCCCTGTTGTTGAGCCTAACGAGCATGCTACTTGGGTTGAGTACGCTGCTAACACACTACTAACTGTTTCTCCA

Фиг. 6 (продолжение)

GCAATACCTGGCTGCAATACCTGGAGCATCGTGCACGATGATTGGATACTGTGGAGGAGGAGTGTTCGCTGATTTAGAG
 CTCCCGGTTGGGTGATTTGACTTCGATTTTCAGTTTAGGCTTGTGAAATTTTCAGGTTCCATTGTGAAGCCTTTAGAGC
 TTGAGCTTCCCTCCATGTTAATGCCTTGATCGAATACTCTAGAGAAAAGGGAAGTCGATCTCTGAGTATTGAAATCGAA
 GTGCACATTTTTTTTCAACGTGTCCAATCAATCCACAAAACAAAGCAGAAGACAGGTAATCTTTCATACTTATACTGACAA
 GTAATAGTCTTACCGTCATGCATAATAACGCTCTCGTTCCTTCAAGAGGGGTTTTCCGACATCCATAACGACCCGAAGCCT
 CATGAAAGCATTAGGGAAGAACTTTTGGTTCCTTGTGTCATGGCCTTTATAGGTGTGAGCCGAGCTCGCCAAATTTCCCGTC
 CGACTGGCTCCGCAAAAATATTGAAACGGCAAGTTATGGACTTGCAACCATAACTCCACGGTATTGAGCAGGACCTATTGT
 GAAGACTCATCTCATGGAGCTTCAGAAATGTGGTTGTGACGAAACCAATGACCCGAAATCCATCACATGACGGACGTCAGT
 GGGTGAGCGAAACGAAACAGGAAGCGCCTATCTTTCAGAGTCGTGAGCTCCACACCCGGATTCCGGCAACTACGTGTTGGG
 CAGGCTTCGCCGATTAGAGATATGTTGAGGCAGACCCATCTGTGCCACTCGTACAATTACGAGAGTGTTTTTTTTGTG
 ATTTTCTAGTTCCTCGTTGATGGTGTGAGCTCATATCTACATCGTATGGTCTCTCAACGTCGTTTCCTGTATCTGATAT
 CCCGTCATTTGCATCCACGTGCGCGCCCTCCCGTGCACAGTCCCTAGGTGTGATGCACGCCAAATTTGGTGGTGGTGGCGG
 CTGCCCTGTGCTTCTTACCAGTGGGTGGAGGTTGAGTTTGGGGGTCTCCGCGCGGATGGTAGTGGGTTGACGTTTGGTG
 TGGGTTGACGGCATTGATCAATTTACTTCTTGTCTCAAATTTCTTGGCAGAAAACAATTCATAGATTAGAACTGGAAC
 CAGAGTGATGAGACGGATAAAGTCAGATTCCAACAGAGTTACATCTCTAAGAAAATAATGTAACCCCTTTAGACTTTATA
 TATTTGCAATTAATAAATAAATTAACCTTTAGACTTTATATATAGTTTAAATAACTAAGTTAACCACCTATATATTTA
 TATCGAAACTATTTGTATGTCTCCCTCTAAATAAACTTGGTATTGTGTTTACAGAACCATAAATAAATAAATAAATAA
 CAACTGAAGTTTGTGACGTTAATTGAAGGGATTAAACGGCCAAATGCACTAGTATATCAACCGAATAGATTCAACTAG
 ATGGCCATTTCCATCAATATCATCGCCGTTCTTCTTGTGCCACATATCCCTCTGAAACTTGAGAGACACCTGCACTTC
 ATTTGCTTATTACGCTGTACAAAATGAAACCCATGCATCCATGCAAACTGAAGAATGGCGCAAGAACCCTTCCCTCCA
 TTTCTTATGTGGCGACCATCCATTTACCATCTCCCGCTATAAAACACCCCCATCACTTACCTAGAACATCATCACTAC
 TCGCTTATCCATCCAAAAGATACCCACTTTTACAACTATCCAAACAAACAAACAAACAAACAACTTACAATTTACAT
 TACAATTACCACTGATGCCACCTAGCGCTGTAGCAAAATGGGAGCTTCTACTGGTGTTCATGCTGGTGTACTGACTC
 TTCTGCTTACCAGAAAGGATGTTGCTGATAGACCTGATCTCACCATCGTTGGAGATTCTGTTTACGATGCTAAGGCTT
 TCAGATCTGAGCATCCTGGTGTGCTCATTTCGTTCTTGTTCGGAGGAGAGATGCTACTGAGGCTTTTATGGAATAC
 CATAGAAGGGCTTGGCCTAAGTCTAGAATGTCTAGATTCCACGTTGGATCTCTTGTCTACTGAGGAACCTGTTGCTGC
 TGATGAGGATACCTTCAACTTGTGCTAGGATCGCTAAGATGGTGCCTTCTGTTTCTTCTGATTTCGCTCTGCTTCT
 ACTGGGTTAAGGCTGGACTTATCCTTGGATCTGCTATCGCTCTTGGGCTTACATGCTTTACGCTGGAAAGAGACTTCTC
 CTTTCTATCGTTCTTGGATGGCTTTTCGCTCTTATCGTCTTAACTCCAGCATGATGCTAACCATGGTGGTCTTGTCTAA
 GTCTGCTTCTGTTAACCTTGCCTTGGACTTTGTCAGGATTGGATCGGAGGATCTATGATCCTTTGGCTTCAAGAGCATG
 TTGTTATGCACCACCTCCACACTAACGATGTTGATAAGGATCCTGATCAAAGGCTCACGGTGTCTTAGACTCAAGCCT
 ACTGATGCTTGGTCACCTATGCATTGGCTTCCAGCATCTTACCTTTTGCCTGGTGGAGACTATGACGCTTTCAAGCTTTT
 GTTCTCGACATCTCTGAGCTTGTATGTGGCGTTGGGAGGGTGAGCCTATCTTAAGCTTGTGGATACCTCTTTATGC
 CTTCTTTGCTTTCAGCTTACCTTCTGGCTAGATTCTGTTGCTTTGCTTCTTACCTTGTCTCTTCTGCTTCTGCTCAT
 GTGTGATCGCTGCTACTGTTATGACTGGATCTTCTACCTCGCTTCTTCTTCTTCTCATCTCCACAACCTCGAGGGTGT
 TGCTTCTGTTGGACCTGATGGATCTATCACTTCTATGACTAGAGGTGCTAGCTTCTTAAAGAGACAAGCTGAGACTTCTT
 CTAAGCTTGGAGGACCTCTTCTGCTACTCTAACGGTGGACTCAACTACCAAAATGAGCATCACTGTTCCCTAGAGTT
 CACCATGGATTCTACCTTAGACTTGTCTCTTGTAAAGGCTGAGCTTGGGCTAGAGGAATCGAGTACAAGCACTACCC
 TACTATCTGGTCTAACCTTGTCTTACCCTCAGACATATGTACGCTCTTGGAAAGAGGCTAGATCTAAGGCTGAGTAAT
 GACAAGCTTATGTGACGTGAAATAATAACGGTAAAATATATGTAATAATAATAATAATAAAGCCACAAGTGAGAATGAG
 GGGAAAGGGAAATGTGTAATGAGCCAGTAGCCGGTGGTGTCTAATTTGTATCGTATTGTCAATAAATCATGAATTTGTG
 GTTTTTATGTGTTTTTTTAAATCATGAATTTTAAATTTTATAAATAAATCTCCAATCGGAAGAACACATTTCCATATCCA
 TGATGGATGTTTCTTACCCAAATCTAGTTCTTGGAGGATGAAGCATCACCGAACAGTTCTGCAACTATCCCTCAAAA
 GCTTTAAATGAACAACAAGGAACAGAGCAACGTTCCAAGATCCCAACGAAACATATATCTATACTAATACTATATAT
 ATTAATTACTACTGCCCGAATCACAATCCCTGAATGATTCTATTAACATAAGCCTTGTGGCGGCGGAGAAGTGATC
 GGCGCGGCGAGAAGCAGCGGACTCGGAGACGAGGCTTGGAAAGATCTGAGTCGAACGGGCGAGAATCAGTATTTTCTTCCG
 ACGTTAATTGATCCTACACTATGTAGGTGATATCCATCGTTTTAATTTTTGGCCACCATTCAATTTCTGCTTGCCTTTAG
 GGATGTGAATATGAACGGCCAAAGGTAAGAGAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA
 ATGTACACTTGTATGCAAAATAGTAAATACTCGGCATATGTATTTCCACACATATTAATAAATACCGTATATGTA
 TTGGCTGCATTTGCATGAATAATACTACGTGTAAGCCCAAAAGAACCACGTTGAGCCCATGCAAAAGTTAACACTCACGA
 CCCCATTCTCAGTCTCCACTATATAAACCACCATCCCAATCTCACAACCCACACACAACCTACAACCTCACTCTC
 ACACCTTAAAGAACCAATCACCAACAAAATTTTACAACAATTACCACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
 ATTTACAATACCATACCATGAGCGCTGTTACCGTTACTGGATCTGATCCTAAGAACAGAGGATCTTCTAGCAACACCGA
 GCAAGAGTTCCAAGAGTTGCTATCGATACCAACGGAAACGTTCTCTGTTCTGATTTCCATCAAGGACATCTTTG
 GAGCTATCCCTCATGAGTGTACGAGAGAAGATTGGCTACCTCTCTACTACGTTTTCAGAGATATCTTCTGCATGCTT
 ACCACGGATACCTTACCATAAGATCCTTTACCTCTCCTCATCTTACACCTTACACAGCATCATCAAGTTCACTTT

Фиг. 6 (продолжение)

CTGGGCCCTTACACTTACGTTCAAGGACTTTTCGGAACCGGAATCTGGGTTCTCGCTCATGAGTGTGGACATCAAGCTT
 TCTCTGATTACGGAAATCGTGAACGATTTTCGTTGGATGGACCCCTTACTCTTACCTTATGGTTCCTTACTTTCAGCTGGAAG
 TACTCTCATGGAAAGCACCATTAAGGCTACTGGACACATGACCCAGAGATATGGTTTTTCGTTCCCTGCCACCAAGAGGAAAT
 CAAGAAGTCTAGGAACTTCTTTCGGTAACCTCGCTGAGTACTCTGAGGATTTCCACTTAGAACCCCTTACGAGCTTCTTG
 TTCAACAACCTTGGAGGATGGATCGCTTACCTCTTTCGTTAACGTTACAGGACAACCTTACCCTGATGTTTCCTTCTGGAAA
 TGGAAACCACTTCTGGCTTACCTCTCCACTTTTCGAGCAAAAGAGATGCTCTACATCTTCTTCTGATCTTGGAAATCCT
 CACCCAGGGAATCGTTCCTTACTCTTTGGTACAAGAAATTCGGAGGATGGTCCCTTTTCATCAACTGGTTCGTTCCCTTACA
 TCTGGGTTAACCACTGGCTCGTTTTATCACATTCCTTTCAGCACACTGATCCTACTATGCCTCATTACAACGCTGAGGAA
 TCGATATAGAGATCGTACAAGACACTGCTAGGTTAAGGATGGATAAATAATAATAATAAGAGTGAATGTGTTTAA
 TTAGTGTAACAGCTGTAATAAAGGCTGAT
 GAAATGTTATGATGTTTTCTTGGTTTTTAAATAAATGAAAGCACATGCTCGTGTGGTTCATTCGAATATTCGGCGGTT
 CCTGTGGGAAAAATCCAGAAAGGCGCGCCGACTACTACTACAACCAAGGCCGTGGAGGAGGCAACAGAGCCAGCACT
 TCGATAGTCTGCGATGATCTTAAGCAATGAGGAGCGAGTGCACATGCAGGGGACTGGAGCGTCAATCGGCCAGATG
 AGGCAGGACATCCAGCAGCAGGACAGCAGCAGGAAGTTGAGAGGTTGCCCATCAATCTAAACAAGTCCGCTAGGACCT
 TCCGGGACAGTGGCCACCCAGCCTAGCCGATGCCAGCTCCAGGGGAGCAGCAGTCTGCATGGTTTTGAAGTGGTGATC
 GATGAGATCGTATAAAGACACTGCTAGGTTAAGGATGGGATAAATAAGATGTGTTTTAAGTCATTAACCGTAATAAAAA
 ATATAAATAATAGTTTTTATATATATGCTTTAAGACTTTTTATAGAATTTTTCTTAAAAAATATAGAAATATTTGC
 GACTCTTCTGGCATGTAATATTTTCGTTAAATATGAAGTCTCCATTTTTATTAACTTTAAATAATTTGGTGTACGATCAC
 TTTCTTATCAAGTGTACTAAAATCGGTCAATCTCTTTGTTCTCCATATTCATATGTCAAAATCTATCAAAATCTTAT
 ATACTTTTTCGAATTTGAAGTGAATTTTCGATAATTTAAATTAATGAACATATCATATTTAGGTATCATATTTGAT
 TTTTATCTTTTACTAAATTTGGTTAACTTTGAAAGTGTACATCAACGAAAAATTAGTCAACCGACTAAAAATAA
 ATATCATGTGTTTAAAGAAATTTCTCTATAAAGAAATTTTAAATAGATCATATGTTTAAAAAATTAATTTTACT
 AACACATATATTTACTTATCAAAATTTGACAAAGTAAGATTAATAAATATTCATCTAACAAAAAACCAGAAAAAT
 GCTGAAAAACCCGGCAAAACCAATCCAAACCGATATAGTTGGTTTTGGTTTTGATTTGATATAAACCGAACCACTC
 GGTCCATTTGCACCCTAATCATAATAGCTTAAATATTTCAAGATATTTAAGTTAACGTTGTCAATATCTGGAAAT
 TTGCAAAATGAATCAAGCTTATGCTGTAATATGAATTTAAAGGAGCTCGATGTGGTGGTAATATGTAATTTACTTG
 ATTTCTAAAAAATATCCCAAGTATTAATAATTTCTGCTAGGAAGAAGTTAGCTACGATTTACAGCAAAAGCCAGAA
 AAGAACCATAAAGTGATGAGCTCGAAATATACGAAGGAACAATATTTTTAAAAAATACGCAATGACTTGGAAACAA
 AGAAAGTGATATAATTTTTGTTCTTAAACAGCATCCCCTCTAAGAAATGGCAGTTTTCTTTGCATGTAACATATATGC
 TCCCTTCGTTACAAAAATTTGGACTACTATTTGGAACTTCTTCTGAAAAATAGTCTGCAGGCTAGTAGATTGGTTGGTT
 GGTTCCTATGTACCAGAAGGCTTACCCTATAGTTGAAAGTTGAACTTTGTTCCCTACTCAATCTTAGTTGTGTAAT
 GTATGTATATGTAATGTGATAAAACGTAGTACTTAAATGACTAGGAGTGGTTCTTGAGACCGATGAGAGATGGGAGCAG
 AACTAAGATGATGACATAATTAAGAACGAATTTGAAAGGCTCTTAGGTTTGAATCCTATTCGAGAATGTTTTGTCAA
 GATAGTGGCGATTTTGAACCAAGAAAACATTTAAAAAATCAGTATCCGGTTACGTTTCATGCAAAATAGAAAGTGGTCTAG
 GATCTGATTTGAATTTTAGACTTAAAGACTCTCTAAGATTCAATCCTGGCTGTGTACAAAACATAAATAATATTTTT
 AGACTATTTGGCCTTAACTAACTTCCACTCATTATTTACTGAGGTTAGAGAATAGACTTGGCAATAAACACATTTCCCGA
 GAAATACTCATGATCCATAATTAGTCAGAGGATGCCAATCAGATCTAAGAACACACATTTCCCTCAAATTTAATGCA
 CATGTAATCATAGTTTAGCACAATTTCAAAAATAATGATGATATAAAGACAGAAATTTGTAGACTTTTTTTGGCGTTAAA
 AGAAGACTAAGTTTATACGTACATTTTATTTAAGTGGAAAACCGAAATTTCCATCGAAATATATGAATTTAGTATATA
 TATTTCTGCAATGACTATTTTGTATTTTGGCACTTTCAGTGGACTACTACTTTATTAACAATGTGATGGATGCATGA
 GTTTGAGTATACACATGTCTAAATGCATGCTTTGTAAACGTAACGGACCACAAAAGAGGATCCATACAAAATACATCTCA
 TAGCTTCCCTCATTATTTTCCGACACAACAGAGCATTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACATTAC
 AATTACATTTACAATTACCATACCATGGAATTTGCTCAACCTCTCGTTGCTATGGCTCAAGAGCAGTACGCTGCTATCGA
 TGCTGTGTTGCTCCTGCTATCTTCTGCTACCGACTCTATTTGGATGGGACTCAAGCCTATCTCTTCTGCTACTAAGG
 ATCTCCCTCTCGTTGAATCTCTACCCCTCTATCCTTTCTCTCCTCGCTTACTTCTGCTATCGTTGGTTCTGGACTCGTT
 TACCGTAAAGTGTTCCTTAGAACCGTTAAGGGACAGGATCCTTTCTCTCAAGGCTCTTATGCTCGCTCACAACGTTTT
 CCTTATCGGACTCAGCCTTTACATGTGCCTCAAGCTCGTTTACGAGGCTTACGTGAACAAGTACTCCTTCTGGGAAACG
 CTTACAACCTGCTCAACCGAGATGGCTAAGGTGATCTGGATCTTCTACGTGCTCAAGATCTACGATTTACGGACACC
 TTCATCATGCTTCTCAAGGAAACGTTAACCAGGTTTCTTCTCCTCATGTTTACCACCAGGATCTATCTCTGGAATCTG
 GTGGATGATCACTTATGCTGCTCCAGGTGGAGATGCTTACTTCTCTGCTGCTCAACTCTTGGGTTTCATGTGTCATG

Фиг. 6 (продолжение)

ACACCTACTACTTCATGGCTGCTGTTCTTCCCTAAGGACGAAAAAGACCAAGAGAAAGTACCTTTGGTGGGGAAGATACCTT
ACCCAGATGCAAAATGTTCCAGTTCTTCATGAACCTTCTCCAGGCTGTTTACCTCCTCTACTCTTCTTCTTCCCTTACCCATA
GTTCAATTGCTCAACTCCTCGTTGTTTACATGGTTACCCCTCCTCATGCTTTTCGGAAACTTCTACTACATGAAGCACCACG
CTTCTAAGTGATAAGGGCCGCCCATGTGACAGATCGAAGGAAGAAAGTGAATAAGACGACTCTCACTACTCGATCGC
TAGTGATTGTCATTGTTATATATAATAATGTTATCTTTCACAACCTTATCGTAATGCATGTGAAACTATAACACATTAATC
CTACTTGTCTATATGATAACACTCTCCCATTTAAAACCTTGTCAATTTAAAGATATAAGATTCTTTAAATGATTTAAAA
AAATATATTATAAATCAATCACTCCTACTAATAAATTTAATAATTATTATTATTGATTAATAAATACTTATACTAATTT
TAGTCTGAATAGAATAATTAGATTCTAGCCTGCGAGGGCGGCCGGATCCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCT
AACAGAACTCGCCGTAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTCA
ACATGGTGGAGCAGCACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGCAATTGAGACT
TTTCAACAAAGGGTAATATCCGAAACCTCCTCGGATTCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGGA
AAAGGAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGT
CCAAAGATGGACCCACCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGCGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGA
TGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTC
ATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGACTGAATTAATAATGAGCCCTGAGAGGCGTCTCTGTTGAATCAGACCTGCTACTG
CTGCTGATATGGCTGCTGTTGTGATATCGTGAACCACATACGAGACTTCTACCGTTAACTTCAAGACTGAGCCTCAA
ACTCCTCAAGAGTGGATCGATGATCTTGAAGACTCCAAGATAGATACCCCTTGGCTTGTGCTGAGGTTGAGGGTGTGT
TGCTGGAAATCGCTTACGCTGGACCTTGAAGGCTAGAAACGCTTACGATTGGACTGTGAGTCTACCGTTTACGTTTAC
ACAGACATCAGAGACTTGGACTTGGATCTACCCCTTACTACTCACCTTCTCAAGTCTATGGAAGCTCAGGGATTCAAGTCT
GTTGTTGCTGTTTACGGACTCCCTAACGATCCTTCTGTAGACTTTCATGAGGCTCTGGATACACTGTAGAGGAACTCT
TAGAGTCTGGATACAAGCACGGTGGATGGCATGATGTTGGATTCTGGCAAAGAGATTTCCGACTTCTCTGCTCCTCCTA
GACCTGTTAGACAGTTACTCAGATCTGAATTTGCGTGTGCTTCAAACATTTGGCAATTAAGTTTCTTAAGATTGAATC
CTGTTCCGGTCTTGGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTAAGTAAAGCATGTAATAAATTAAGATGTAATGCATG
ACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCCTAATATACATTTAATACGGATAGAAAACAAAATATAGCG
CGCAAACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCACTAGTGTATGACGGTTAAAACCCACCCAG
TACATTAAAAACGTCGCAATGTGTTATTAAGTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATTTGGTGTAAAC
AAATTTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTTGCGGACGTTTTTAAATGACTGGGTGGTTTTAACCGTACATCACTAGT
GATCTAGTAACATAGATGACACCGCGCGGATAATTTATCCTAGTTTGGCGCTATATTTGTTTTCTATCGCGTATTA
ATGTAATTTGCGGGACTTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTTATACATGCTT
AACGTAATTAACAGAAATATATGATAATCATCGCAAGACCGCAACAGGATTAATCTTAAGAACTTTATGGCAAA
TGTTTTGAACGATCACGCAAAATCAGATCTGAGTAACTGGTCTAACAGGCTAGGAGGAGCAGGAAGCTCGAAATCTCTTT
GCCAGAAATCAACATCATGCCATCCACCGTCTGTTGATCCAGCAGCTTAAAGAGTTCCTTAGCAGTGTATCCAAGGCC
TCATGAAGTCTAACAGAAGGATCGTTAGGGAGTCCGATAACAGCAACACAGACTTGAATCCCTGAGCTTCCATAGACTT
GAGAAGGTGAGTGAAGGGTAGATCCAAGTCCAAGTCTCTGATGTCTGTGTGAACGTAACCGGTAGACTCAACAGCTC
AATCGTAAGGTTTTCTAGCCTTCCAAGGTCAGCGTAAGCGATCCAGCAACAAACCCCTCAACCTCAGCAACAAGCCAA
GGGTATCTATCTTGGAGTCTCTCAAGATCATCGATCCACTCTTGGAGGTTTTGAGGCTCAGTTCTGAAGTTAACGGTAGA
AGTCTCGATGTAGTGGTTACGATATCACAAACAGCAGCCATATCAGCAGCAGTAGCAGGTCTGATTTCAACAGGACGCC
TCTCAGGGCTCATATTTAATTCAGTCCCCGTGTTCTCTCAAATGAATGAACCTTCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGC
GAAGGATAGTGGGATTTGTCGTCATCCCTTACGTCAGTGGAGATATCACATCAATCCACTTGTCTTGAAGACGTTGGTGG
AACGTTCTCTTTTCCAGGATGCTCCTCGTGGTGGGGTCCATCTTTGGGACCCTGTCCGCAAGGATCTTCAACGA
TGGCCTTCTCTTTATCGCAATGATGGCATTGTAGGAGCCACCTTCTTTTCCACTATCTTCAAAATAAAGTGACAGATA
GCTGGGCAATGGAATCCGAGGAGGTTTCCGGATAATACCTTTGTTGAAAAGTCTCAATGCCCCTTTGGTCTTCTGAGAC
TGATCTTTGATATTTTGGAGTAGACAAGTGTGTCGTCGCCACATGTTGACGAAGATTTTCTTCTTGTCTATTGAGTC
GTAAGAGACTCTGTATGAACTGTTCCGCACTTTACGGCAGTTCCTGTTAGGTCCTTATTTGAATCTTTGACTCCATG
GGATCCGCGGCCCTTGCAGGCTAGAATCTAATTAATCTATTCAGACTAAATTAGTATAGTATTTTTTAAATCAATAA
ATAATAATTAATAATTTATAGTAGGAGTGAATTTATAATATATTTTTTTTAAATCATTTAAAGAACTTATATCTT
TAAATGACAAGAGTTTTAAATGGGGAGAGTGTATCATATGACAAGTAGGATTAATGTGTTATAGTTTACATGCATTA
CGATAAGTGTGAAAGATAACATTTATATATAACAATGACAATCACTAGCGATCGAGTAGTGAAGTCTTATTAC
ACTTTCTTCTTCCGATCTGTACATGGCGCGGCCCTTATCACTTAGAAGCGTGGTCTTCATGTAGTAGAAGTTTCCGA
AAAGCATGAGGAGGTAACCATGTAACAACAGGAGTGTGACCAATGAACCTTAGGGTAAGGAGAAGAGTAGAGGAGG
TAAACAGCCTGGAGAAGTTTCAAGAACTGGAACATTTGCATCTGGGTAAGGTATCTTCCCAACCAAAGTACTTTCT
CTTGGTCTTTTCTGCTTAGGAAGAACAGCAGCCATGAAGTAGTAGGTGTACATGCACACATGAACCAAGAGTTGAGAG
CAGCAGAGAAGTAAGCATCTCCACCTGGAGCAGCATAAGTGTATCCACCAGATTCAGAGATAGATCCGTTGGTGGTAA
ACATGGAGGAAGAAACCTGGTTAACGTTTTCCCTTGAGAAGCATGATGAAGGTGTCATGAACCTGTAGATCTTGGACAC
GTAGAAGATCCAGATCACCTTAGCCATCTCGGTTTGGAGAGGTTGTAAGCGTTTTCCCAAGAGGAGTACTTGTTCAGT

Фиг. 6 (продолжение)

AAGCCTCGTAAACGAGCTTGAGGCACATGTAAGGCTGAGTCCGATAAGGAAACGTTGTGAGCGAGCATAAGAGCCTTG
 AGAAGGAAAGGATCCTGTCCCTTAACGGTCTAGGGAACACTTTACGGTAAACGAGTCCAGAACCACGATAGCGAAGTA
 AGCGAGGAGAGAAAGGATAAGAGGGTAGGAGATTCAACGAGAGGGAGATCCTTAGTAGCAGAAGAGATAGGCTTGAGTC
 CCCATCCAATAGAGTCGGTAGCAGAGAAGATAGCAGGAGCAACAACAGCATCGATAGCAGCGTACTGCTCTTGAGCCATA
 GCAAACGAGAGGTTGAGCAAAATCCATGGTATGGTAAATGTAATGTAATGTAATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TAATGTTGTAATAATGCTCTGTTG
 GGTCCGTTACGTTTTCACAAAGCATGCATTTAGACATGTGTATACCTCAAACCTCATGCATCCATACACATTGTAATAAAGTA
 GTAGTCCACTGAAAGTTGCCAAAATAGCAAAATAGTACATTTGCAGAAAATATATATACAAAATTCATATATTTCCGATGGAA
 AATTTCCGGTTTTCCACTTAAATAAAAATGTACGTATAAACTTAGTCTTCTTTAACGCCAAAAAAAAGTCTACAAATTTCT
 TGCTTTAATACTACATTAATTTTTGAATTTGCTAAACTATGATTACATGTGCATTAATAATTTGAGGGAATGTGTTCT
 TAGATCTGATTGGCATAACCCTCTGACTAATATGGGATCATGATATTTCTCGGGAATGTGTTATTCGCAAGTCTATTC
 TCTAACCTCAGTAAATAATGAGTGGAGGTTAGTTAAGGCCAAATAGTCTAAAAATATATATTTGTAGTTTGTGTACACAG
 CCAGGATTGAATCTTAAGAGACTCTTAAAGTCTAAAATTAACAATCAGATCCTAGACCCTTCTATTTGCATGAACGTAA
 CCGGATACTGATTTTTTAAATGTTTCTTTGGTTCAAATCGCCACTATCTTTGACAAAAACATTTCTCGAATAGGATTCA
 AACCTAAGAGCCTTCAAATTCGTTCTTAATATGTCATCATCTTAGTCTCTGCTCCCATCTCTCATCGTCTCAAGAAC
 CACTCCTAGTCATTTAAGTACTACGTTTTATACACATTACATATACATACATTTACACAACCTAGGAATGAGTAGGGAAAC
 AAAGTTTCAACTTTCAACTAATAGGTAAGCCTTCTGGTACATGGAAACCAACCAACCAATCTACTAGCCTGCAGGACTA
 TTTTCAGAGAAGTTCCCAATAGTAGTCCAAAATTTTTGTAAACGAGGGAGCATAAATAGTTACATGCAAGGAAACTGC
 CATTCTTTAGAGGGGATGCTTGTAAAGAACAAAAATATATCACTTTCTTTGTTCCAAAGTCATTGCGTATTTTTTTAA
 AAATATTTGTTCCCTTCGTATATTTTCGAGCTTCAATCACTTTATGGTTCTTTGATTTCTGGCTTTGCTGTAATCGTAACT
 AACCTTCTTCTAGCAGAAATTAATAACTTTGGGATATTTTTTGAAGTCAAGTAAATACATATTTACCACCACATCGA
 GCTGCTTTTAAATTCATATTACAGCCATATAGGCTTGATTTGCAAAAATTTCCAGGATATTGACAACGTTAACTTA
 ATAATCTTTGAAATATAAAGCTATTATGATTAGGGGTGCAAAATGGACCAGTTGGTTCTGTTTATATCAAAATCAAA
 CAAACCAACTATATCGTTTTGGATTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGGTTTTGG
 ATTTATTTAATCTTACTTTGTCAAATTTTTGATAAGTAAATATATGTGTAGTAAAAATTAATTTTTTTTACAACATAT
 GATCTATTTAAATATTTCTATAGGAGAATTTCTTAATAACACATGATATTTATTTATTTTATTTAGTCTGTTGACTAATTTTT
 CGTTGATGTACGTTTTCAAAGTTAACCAAAATTTAGTAATTAAGTATAAAAATCAATATGATACCTAAATAATGATATGTT
 CTATTTAATTTTAAATATCGAAAATTTCACTTCAAATTCGAAAAGATATATAAGAATTTTATAGATTTTGTACATATGA
 ATATGGAAGAACAAAGAGATTGACGCATTTTAGTAACTTTGATAAGAAAGTATCGTACAACCAATATTTTAAAGTTAA
 TAAAATGGAGCACTTCAATTTAACGAAATATTCATGCCAGAAGAGTCCGAAATATTTCTAGATATTTTTTAAAGAAA
 ATTTCTATAAAAAGTCTTAAAGGCATATATATAAAAACATATATTTATATTTTGGTTTTGGTTTCAATTTGTTTTACTCAA
 TACCAAACTAAATAGACCAAAATATAATTTGGGATTTTTTAACTCGAGATAGAACCCACACGAGCATGTGCTTTCCATTTAAT
 TTTAAAAACCAAGAACATACATACATAACATTTCCATCAGCCTCTCTCTTTTTATACGGTTAATGACTTAAAACACA
 TCTTATTTATCCCATCCTTAACACCTAGCAGTGTCTTTATACGATCTCATCGATCACCCTTCAAACCAATGACAGCTGCT
 GCTGCCCTGGAGCTGGCATCGGCTAGGCTGGGTGCCGCACTGTCCCGAAGGTCCCTAGCGACTTGTTTAGATTGATGG
 GACCACCTCTCAACTTCTGCT
 GCATGTGCACTCGCTCCTCAATTTGCTTAAAGATCATCGCAGCAGCTATCGAAGTGTGGCTCTGTTGCCCTCTCCACGGC
 CTTGGTTGATGATGCTGCGCGGCCCTTCTGGACTTTTTCCACAGGAACCGCGAATAATTCGATAGAACACACG
 AGCATGTGCTTTCAATTTATTTAAAAACCAAGAACATACATAACATTTTATCAGCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTATTACAGCTGTTACTACTTAAACACATTCATCTCATTATTATTATTATT
 ATTTATCCATCCTTAAACCTTAGCAGTGTCTTTGTACGATCTCATAATCGATCACCCTTCACTACTTCTCAGCAGCTCCA
 ACTCCGAGTTGTTGATGTTACGGAACATGAGAACACCGTTATCACCGTCAACGATTTGGCAAGACCTGAAAGACTTCCA
 AAGTGACTTCCACATGTTCTCGTGCCTAGACCTGTAGTGTCTTTCCATAACTTTCTTGATAGCCTCAGAAGCAGGTCTAG
 CGTTGTAGAATGGGATCCTAGAACAGTAGTGGTGAAGCACATGAGTCTCGATGATATCATGGAAGATGTGAGGTCCGATG
 AATCCGAACCTTTCTATCGATAGTAGCAGCAGCACCTTAGCGAAAGTCCATTTCTCAGCGTTGTAATGAGGCATAGTAGG
 ATCAGTGTGCTGAAGGAATGTGATGAAAACGAGCCAGTGGTTAACCCAGATGTAAGGAACGAACAGTTGATGAAAAGGG
 ACCATCCTCCGAATTTCTGTACCAAGAGTAAGAACGATTTCCCTGGGTGAGGATTCAGATCAGAAGGAAGATGTAG
 AGAGCATCTCTTTGCTCGAAAAGTGGAGAGGTAAGCCAGAAGTGGTTCCATTTCCAAGAAAGAACATCAGGGTAAAGTTG
 TCTGTAAACGTTAACGAAGAGGTAAGCGATCCATCTCCAAGTTGTTGAACAAGAGCTCGTAAAGGGTTCTAAGTGGAG
 AATCCTCAGAGTACTCAGCGAGGTTACCGAAGAAGTCTTAGACTTCTTGAATTCCTCTTTGGTGGCAGGAACGAAAACC
 ATATCTCTGGTCATGTGTCCAGTAGCCTTATGGTCTTTCCATGAGAGTACTTCCAGCTGAAGTAAGGAACCATAAAGTA
 AGAGTGAAGGGTCCATCCAACGAAATCGTTCACGATTCGGTAACTCAGAGAAAGCTTGATGTCCCACTCATGAGCGAGAA
 CCCAGATTCGGTTCCGAAAAGTCTTGAACGTAAGTGAAGGGCCGAAAAGTGAACCTTGATGATGCTGTTAGAGGTG
 TAAGAGATGAGGAGAGGTAAGGATCTTATGGTAAGGTATCCGGTGGTAAGCATGCAGAAGATATCTCTGAACACGTA
 GTAGAGAGAGGTAGCCAATCTTCTCTCGTAACACTCATGAGGGATAGCTCCAAGGATGCTTGTGTTGAAATCAGGAA
 CAGAGAACCGTTCCGTTGGTATCGATAGCACTTTTGGAACCTTGTGCTCGGTGTTGCTAGAAGATCCTCTGTTCTTA

Фиг. 6 (продолжение)

GGAGTAGCATGGTCTTGTATGCTGGTTACGCCACCAAGCACCAGACATTCACATCCAAGTCCGTAACAAGCAACTTG
GATAGCTCTGTGCGAAAGCAATGTTCCAGTGGAGAGTAATGTCCACCCTCATGCATAAGCCATCCACATCTTCCCTGAA
CAACTCCAAGCATAGCGATTCAGCGAAAGTGTATCCATGCCAGATAAGAGCAGCACCAGCAACATGCATAGCGATAACC
TCAGCAAGTCTGTAAGCAACATGAGGAAGAGAAGGCTCGAACATCCCTCAGCCTCAAGTTGCTTGGTGAACCTTTGGAA
ATCAGCGATAAGATCAGCCCTTCTTGGAGAGTATCCCTTGTGAACAGGACGAGAGGAAAGAGACTTAAGCATCTTGTCCAG
CCTTAGCAGATCTAACATGGAAGTCTTGTAGCATCGGTAGCATCAGTCCAACTTGGTAAGCAATGATCTTCCACCA
GGGTGTCTCTTAACGAAGTTGGTAACATCGTAAGCCCTATCTCCGATAACAAGCTCTTCTTGTCTGCTCTTGAGGAGT
ATCAACTTCGTGAAGTTGAGCAGAAGGAGGAGCAGCATAAGAGTAAGAGTCCCTTGGAGGCATGGTATGGTAATTTGAAA
TGTAATTTGTAATGTTGTTTGTGTT
GTATCGATGAGTTTGGTTGAGTAAAGAGTGAAGCCGATGAGTTAATTTATAGGCTATAAAGGAGATTTGCATGGCGAT
CACGTGTAATAATGCATGCACGCATGTGATTGTATGT
CAAGTGGCGAAGAAAAAATCTCCCGCGCTGCATGCTATGTGTAACTGTAGCTAATGTTCTGGCATGGCATCTTATG
AACGATCTTTTTAAAAACAAGGTAAAACTTAACCTCATAAAATTAAAAAAAAAAACGTTTACTAAGTTGGTTAAAAAG
GGGATGAGACTAGAATCTAATTAATCTATTCAGACTAAATAGTATAAGTATTTTTTTAATCAATAAATAATAATTAATA
ATTTATAGTAGGAGTGAATTAATTAATAATATTTTTTTAATCATTTAAAGAACTTATATCTTTAAATGACAAGA
GTTTTAAATGGGAGAGTGTATCATATGACAAGTAGGATTAATGTGTATAGTTTACATGCATACCGATAAGTTGTGA
AAGATAACATTAATATATAACAATGACAATCACTAGCGATCGAGTAGTGAGAGTCTGTTTATACACTTCTTCCCTC
GATCTGTGCATGGCGCGGCCCGCGCGCCGCTTATCACTGCTTCTTAGCACCTTAGACTTGTACCTCTTACG
GTAGAAGTTGGCGAAGAGAACAACATGTTCCACATAACCCAGAGTTGAAGGTAAGGAAGCCAGAAAGCGGTATTTGAA
CGTAAGCGGTGTAGATAGAGTGAAGACACAGATACAGAAGTGAAGCATCTGGATCTGGGTGATGACTTCTCCAGAAA
CAGTTAACTCCAAGAGCAGCAAGTCCGTAGTAAGAGTACATGATCACGTGCACGAAGGTGTTAACAGAAGATCCGAAGTA
GCAATCTCCAACAGGCTCAAGCTTATAACAACGAACCATGACCAGATGAGAAGAGTGTGGTGGTAGATGTGAAGGAAA
AAGCTGGTCAACTTCTTCTCATCACCATGAAGAAGGTGTGCGAGAAGCTCAACGTACTTGTGTTGATGAAGCCAG
ATAACCTGAGAGATTTCCCAAGAGTTAGCAGTCAATCAGGGATGTTTCCCAAACTTAAAGTCCCTGAGCCCTATGAGA
AGTAACGAAAAGGTAGATGCAGTAGCTGTTGAAGAAGTCTGGTAGAAGTTGTAACAGGATAGCCTTCTTGTAGTCCGA
AAGGTTGAGATCTGTTCTGCATGATACGCTTCCGAAGTAGATGAAGAGGAGGTATCCAATAGTTCCGATAGTAGGTCCC
CAGTACTCAACTGCATGAAGTAAGCAGGAACCTTCTCAGAAGCTGGGATATCAGGGTTAGCCACATTTGAGGTAACGTA
TCCAAGAGTTCAGCAAGAGCAGCAGGGATAGCGATAGAGCCATGGTATGGTAATGTAATGTAATGTAATGTTGTT
TGTTGTTTGTGTT
TGATGGATCTCTTTTTGTGGTCCGTTACGTTTTACAAGCATGCATTTAGACATGTGTATACTCAAACTTGAAGCCCA
TACACATTTGTAATAAAGTAGTAGTCCACTGAAAGTTGCCAAAATAGCAAAATAGTACATTCAGAAATATATACTAAA
TTCATATATTTTCATGGAAAATTTCCGTTTTCCACTTAAAATAAAATGTACGTATAAACTTAGTCTTCTTTTAAAGCCAA
AAAAAGTCTCAAAATTTCTGTCTTAAACTACATTAATTTTTGAATGTGCTAAACTATGATTACATGTGCATTAATAAT
TTGAGGGAATGTGTGTTCTTAGATCTGATTGGCATACCCCTCGACTAATTTATGGGATCATGATATTTCTCGGGAATGTG
TTTATTCGCAAGTCTATTTCTTAACCTCAGTAAATAAGTGAAGTGAAGTTGTTAGTTAAGGCCAAATAGTCTAAAATATATTA
TTTGTAGTTTTGTACACAGCCAGGATTTGAATCTTAAGAGACTCTTAAAGTCTAAAATTAACAATCAGATCTTAGACCCTT
TCTAATTTGCATGAACGTAACCGGATACTGATTTTTTAATGTTTTCTTTGGTTCAAAAATCGCCACTCTTTGACAAAAA
CATTTCTCGAATAGGATTCAAACCTAAGAGCCTTTCAAATTCGTTCTTAATTTATGTCATCATCTTTAGTCTGCTCCCATC
TCTCATCGGTCTCAAGAACCCTCCTAGTCAATTAAGTACTACGTTTTATACACATTACATATACATACATTTACACAAC
TAGGAATTTAGTAGGGAACAAAGTTTCAACTTTCAACTAATAGGGTAAGCCTTCTGGTACATGGAAACCAACCAAT
CTACTAGGGTACCCTCAAGCATAACGACAAGGGTAAATAACATAGTACCAGAACATAATAAACAACAAAGTGCAGAAAGCA
AGACTAAAAAATTAGCTATGGACATTCAGGTTTCAATTTGAAACATCATATCTTAGTCTTGTGACCATCTTCTCTCT
GCTCTAGTTGAGAGGCCCTGGGACTAACGAGAGGTCAGTTGGGATAGCAGATCCTTATCCTGGACTAGCCTTCTGGTGT
TTCAGAGTCTTCGTGCCCGCTTACATCTATCTCCATAGGCTCTGAAGATGACTCTTACACCAACGACGTTTAAAGGTC
TCTATCCTACTCCTAGCTTGAATACCTGGCTTGAATACCTGGAGCATCGTGCACGATGATTGGACTGTGGAGGAGG
AGTGTGTGCTGATTTAGAGCTCCCGTTGGGTGATTTGACTTCGATTTTCAAGTTTGGCTTGTGAAATTTTTCAAGTTCC
ATTTGTGAAGCCTTTAGAGCTTGAAGCTTCTTCCATGTTAATGCCTTGATCGAATACTCCTAGAGAAAAGGGAAGTCGATC
TCTGAGTATGAAATCGAAGTGCATTTTTTTTTCAACGTGTCCAATCAATCCACAACAAAGCAGAAAGCAGGTAATCT
TTCATACTTATACTGACAAGTAATAGTCTTACCGTCATGCATAATAACGTCCTCGTTCTTCAAGAGGGGTTTTCCGACAT
CCATAACGACCCGAAGCCTCATGAAAGCATTAGGGAAGAACTTTGGTCTTCTTGTGCATGGCCTTTATAGGTGTGAGCC
GAGCTCGCAAATTTCCCGTCCGACTGGCTCCGCAAAATATTCGAACGGCAAGTTATGGACTTGCAACCATAACTCCACGGT
ATTTAGCAGGACCTATTTGAAGACTCATCTCATGGAGCTTCAAGATGTGGTTGTGAGCAAAACCAATGACCGAAATCCAT
CACATGACGGACGTCAGTGGGTGAGCGAAACGAACAGGAAGCGCCTATCTTTCAGAGTCTGTGAGCTCCACACCGGAT
CCGGCAACTACGTTTGGGCAGGCTTCGCCGTATAGAGATGTTGAGGCAGACCCATCTGTGCCACTCGTACAATTA
GAGAGTGTTTTTTTTGTGATTTCTTAGTCTCTGTTGATGGTGTGAGCTCATATTTACATCGTATGGTCTCTCAACGTC
GTTTTCTGTGCATCTGATATCCCGTCAATTTGCATCCACGTGCGCCGCTCCCGTGCCAAGTCCCTAGTGTCTGACGACG
AAATTTGGTGGTGGTCCGCTGCCCTGTTGCTTACCAGTGGTGGAGGTTGATTTGGGGTCTCCGCGGCATGGTA
GTGGGTTGACGGTTTGGTGTGGGTTGACGGCATGATCAATTAATTTACTTCTTGGCTTCAAAATCTTTGGCAAAAACAAATTA

Фиг. 6 (продолжение)

TTAGATTAGAACTGAAACAGAGTATGATGAGACGGATTAAAGTCAGATTCCAACAGAGTTACATCTCTTAAGAAATAATGT
 AACCCCTTTAGACTTTATATATTTGCAATTAATAAATAAATTTAACTTTTACACTTTATATATAGTTTTAATAACTAAGT
 TTAACCACTCTATTATTATATCGAAACTATTTGTATGTCTCCCTCTAAATAAACTTGGTATTTGTTTACAGAACCTA
 TAATCAAATAATCAATACTCAACTGAAAGTTTGTGCAGTTAATTGAAGGGATTAAACGGCCAAAATGCACTAGTATTATCAA
 CCGATAGATTACACTAGATGGCCATTTCCATCAATATCATCGCCGTTCTTCTCTGTCCACATATCCCCTCTGAAACT
 TGAGAGACACCTGCACCTTCATTGTCCTTATTACGTGTTACAAAATGAAACCCATGCATCCATGCAAACTGAAGAATGGCG
 CAAGAACCCTTCCCCTCCATTTCTTATGTGGCGACCATTTCCACCATCTCCCCTATAAAAACACCCCATCACTTCA
 CCTAGAACATCATCACTACTTGTCTTATCCATCCAAAAGATACCCACTTAATTAATTTTACAACAATTAACCAACAACA
 AACAAACAACAATTAACAATTACATTTACAATTACCATACCATGTGCCCTCCTAAGACTGATGGAAGATCTTCTCCTAG
 ATCTCCACTTACCAGGTCTAAATCTTCTGCTGAGGCTCTTGATGCTAAGGATGCTTCTACTGCTCCTGTTGATCTTAAGA
 CTCTTGAGCCTCATGAGCTTGTCTACTTTGAGACTAGATGGGTTAGAGTTGAGGACGTTGAGTACGATGTGACTAAC
 TTCAGCACCCCTGGTGGATCTGTGATCTTCTACATGCTTGTAACTGCTGCTGATGCTACTGAGGCTTTCAAAGAATT
 CCACATGCTTCTCAAGGCTTGAAGATGCTTAGAGCTTTGCTTCTAGACCTGCTGAGATCAAGAGATCTGAGCTG
 AGGATGCTCCTATGCTTGAAGATTTCGCTAGATGGCGTGTGAGCTTGAAGAGATGGATTCTTCAAGCCTTCTATCACC
 CATGTGGCTTACAGACTTCTCGAGCTTCTGCTACATTCGCTCTTGAAGCTGCTCTTATGTACGCTGGATACCCCTATCAT
 TGCTTCTGTTGTTACGGTGTCTTCTCGAGCTAGATGTGGATGGGTTCAACATGAGGGTGGACATAACTCTCTTACC
 GATCTGTTTACGTGGACAAGAGACTTCAGGCTATGACTTGTGGATTGCGACTTTCTACTTCTGGTGGATGTTGAACCCAG
 ATGCATAACAAGCACCATGCTACCCCTCAAAGGTTAGACAGATATGGATCTTGATACCACTCCTGCTGTGGCTTCTT
 CAACACTGCTGTTGAGGATAACAGACCTAGAGGATTCTCTAGAGCTTGGGCTAGACTTCAAGCTTGGACTTTCGTTCCCTG
 TTACCTCTGGACTTCTGTTCAAGCTTCTGGATCTACGTTCTCCACCTTAGACAAGTTCTCCGTAAGAAGAACTACGAA
 GAGGCTTCTGGATGCTCGTTTCTCATGTTGTTAGAACCCTGTTATCAAGCTTGTACTGGATACTCTGGCCTGTTGC
 TTACTGGTGGTCACTTTCGGAACCTGGATCGTTACATGTACCTTTCGCTCACTTCTACTTCTCATACTCACTCC
 CTGTTGTTCCATCTGATAAGCACCTTCTTGGGTTAACTACGCTGTTGATCACACCCTGATATCGATCCTTCTAGAGGA
 TACGTGAACCTGGCTTATGGGATACCTTAACTGTCAAGTTATCCACCCTTCCCTGATATGCTTCAATTCAGACAGCC
 TGAGGTTAGCAGAAATTCGTTCCCTTTCGCTAAGAAGTGGGACTCAACTCAAGGTGCTCTTACTACGCTGCTTGGGA
 AGGCTACTTCTTAACCTTGATAAGTGGGACAGCACTACTACGTTAACGAAAGGCTGAGAAGGCTCACTAATGATTA
 ATTAACAAGCTTATGTGACGTGAAATAAATACCGTAAATAATGTAATAATAAATAAATAAAGCCACAAGTGAGAAT
 GAGGGGAAGGGGAAATGTGTAATGAGCCAGTAGCCGCTGCTAATTTTGTATCGTATTGTCAATAAATCATGAATTTT
 GTGGTTTTTATGTGTTTTTTTAAATCATGAATTTTAAATTTTATAAATAAATCTCCAATCGGAAGAACAACATCCATAT
 CCATGCATGGATGTTCTTACCCTAATCTAGTTCTTGAGAGGATGAAGCATCACCGAACAGTTCTGCAACTATCCCTCA
 AAAGCTTTAAATGAACAACAAGGAACAGAGCAACGTTCCAAAGATCCCAAACGAAACATATTATCTATACTAATACTAT
 ATTTAATACTACTGCCCCGGAATCACATCCCTGAATGATTCCTATTAACAAGCCTTGTGGCGGGGAGAGTG
 ATCGCGCGGGCAGAGCAGCGGACTCGGAGACGAGGCTTGAAGATCTGAGTCGAACGGGCGGTACCGCGGCCGCAAG
 CTTTTCCGGGGCGCCGTTTTACAACGCTGCTGACTGGGAGATCCACTAGCAGATTGCTGTTTTCCCGCTTCAAGTTAAA
 CTATCAGTGTTCAGGACAGACCACCCAAGAACACACCAGTCACTCAGATGCAGCCTATCTCCGTGCCGGCTATTCCA
 GCTGATGAGTTGAGGATATAACTGATAACTATGGTCCAAAGTCTTGAATGGTGGGGCTCTTATGGAAGAGTGTTTTA
 CGGTGTTCTTAGAAGCGCAAGGCAAGCTGCTGCTTAAAGAGCTGGATTCTAGTAAGCAGCCTGATCAAGAGTTCTGCA
 AGGTACAATGCTACTTAAAGTAAATCAAACCGTTAAAGTTGAGTTGCTGCTTAGTTACTGATGTAATAATGTTAATAG
 GTATCAATGGTTTCGAGATTGAGACAAGACAATGTTGTTGCACTTCTGGGATATGCGTGTGATGGCCACTCCGTGTTCT
 TGCTTATGAGTTGCTCCTAATGGATCTCTTATGATATCTTCAATGGTAAAGTTATTAAGTCAAACAATGATTCGGTA
 CGACTGTAGATGTGAAGCTATTAACCTAATGAAATGTTGTTGAGTTTGTGGGTGTAAGGTAAGGAGTGAAGGAGCA
 CAGCCAGGACCTGTTCTGTCTGGAACAGAGAGTTAAATGCTGTTGTTGCGGCTAGGGGACTCGAGTACTTGCATGA
 GAAGGCGAACCTCATGTTGTCCACCGAGACATCAAATCCAGCAATGTGCTTTTTGTTGACGATGATGTTGCCAAGATTG
 CTGACTTCGATCTGTCTAACCAAGCCCTGACATGGCTGCTGCTCCTCACTCAACTCGTGTGCTGGGAACCTTTGGTTAT
 CACGCTCCAGAGTAAGCCCTTACTTGTATTTAATGAAATGTTTTTGTTCAGACTAATCAATGTGGTTACATTCAACTTGT
 GCTCAAAGACTTTTGGTTATTTATTTATCTTATGTTTTGAGGCACTAAGTCTCTCCTTGGAAATAATCTTTGACATATTTT
 GATTGCATCTCTTAATGACCATACTAGAGTCTTAAACACAACAATTTTTGTTTTGGTCTGCATTTTCAGGTATGCA
 ATGACCGGGACATGAGCACAAGAGTGTGCTATAGTTTTGGAGTTGTTCTGCTAGAGCTCCTCACAGGTCGTAAAGCC
 AGTTGATCATACCTTACCACGAGGACAGCAGAGTCTCGTTACATGGGTAATGCTTAGTGCAGCTCTGCTCTTTTTCTG
 GTTTACTCATATTGAGAAGAAAGGGAATGTGCTGCAACAATCATGTTGATTTTTGTGAGAGATTAGATAAATCATTATT
 AAATGAAAACCGCTTTGTGTGTGTATCAGGCAACTCTAAACTGAGTGAAGACAAGGTGAAGCAATGCTTGTGATGCAA
 GACTAAACGGAGAAATATCCTCCAAAGCTGTTGCCAAGGTAACCTTTTGTCAATGATGCTGTTGTGCTAGAGAAGGTT
 TACCTTAGGACACGACTTAGAACTGCTTCTCCATCACTTCCATCGTTTTTCGGTTCCTTCTAATGATCCCTGTTGAG
 GCCTAGATTGAAATACAAGTCTCTTCAAGGACAATAGAACSTAAGCATGATGATGATTTTTTTGGGAGTCTGATTTT
 GTTTTTTCTCTCTTATATGACTCCGGTAATGATCAGCTGGCTGCTGATGCTGCTATGTTGCAATACGAAGCAGACT
 TCAGGCCAAACATGAGCATAGTGGTGAAGGCTCTTCAAGCTCTCTCAATCCTCCTCGCTCTGCTCCTCAAACTCCTCAC
 AGGAACAATCCTTATGATGCTCCTCAATCTGATGCCAGCTTCTTCAATCATATCACTTATTTCAATTTGTTTTGTTTGA
 ATCCAATTTGTGTAATTCGTGAAAATAGGCTTTTATTTCTCACAATAGACATGAAAGTCTCACTTCCAAACCTGAATG
 GTGTTGCTCTATTTGTTATGTTATTTCAATGCTGCGATGTAAGTTTCTACTAATATACAATATGCGGAGGATGGATT
 ATTCATAATATACTCATTTGTTTGTGCC

(SEQ ID NO: 41)

Фиг. 6 (продолжение)



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2