

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048062**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.23

(51) Int. Cl. *A01H 6/20* (2018.01)

(21) Номер заявки
202290612

(22) Дата подачи заявки
2020.08.26

(54) **ЛИНИЯ NUBJ1207 BRASSICA JUNCEA**

(31) **62/891,908**

(56) US-A1-20180016591
US-A1-20130338387
US-A1-20130189682

(32) **2019.08.26**

(33) **US**

(43) **2022.07.14**

(86) **PCT/US2020/048038**

(87) **WO 2021/041570 2021.03.04**

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

(72) Изобретатель:
**Гао Вэньсянь (US), Белиде Сринивас,
Бузза Грег (AU), Девайн Малкольм
(CA), Гороро Нельсон, Леонфорте
Антонио, Макаллистер Джэйсон,
Петри Джэймс, Шрестха Пушкар,
Сингх Суриндер, Чжоу Сюэ-Жун (AU)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(57) Настоящие варианты осуществления обеспечивают новую линию Brassica juncea, продуцирующую DPA (DPA-Juncea), обозначенную как NUBJ1207. Варианты осуществления также обеспечивают семена, растения и части растений (включая ДНК) линии NUBJ1207 DPA-Juncea, а также способы получения растения Brassica, полученного путем скрещивания линии NUBJ1207 DPA-Juncea с самой собой или с другой линией Brassica. Эти варианты осуществления также обеспечивают способы получения продуцирующего DPA растения Brassica, содержащего в своем генетическом материале один или несколько трансгенов, а также трансгенные растения и части растений, полученные этими способами. Эти варианты осуществления дополнительно обеспечивают продуцирующие DPA линии или линии скрещивания и части растений, полученные из линии NUBJ1207 DPA-Juncea, способы получения линий канолы или частей растений, полученных из линии NUBJ1207, и продуцирующие DPA растения Brassica, сорта и их части, полученные в результате использования этих способов. Эти варианты осуществления также обеспечивают гибридные семена, растения и части растений, полученные путем скрещивания линии NUBJ1207 DPA-Juncea с другой линией Brassica или канолы.

B1

048062

048062

B1

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/891908, поданной 26 августа 2019 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей (первоначально представленный в формате ASCII через EFS-Web 26 августа 2019 г. в виде файла размером 2914 байт под названием 87376_0015PRO_ST25.txt, созданного 20 июня 2019 г.), который подан одновременно с настоящим документом и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящие варианты осуществления относятся к новой и особой линии Brassica juncea, производящей DPA, обозначенной NUBJ1207.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Длинноцепочечные омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты (ω 3 LCPUFA) хорошо известны за их важную роль в рационе питания человека. Δ 7,10,13,14,17-докозапентаеновая кислота (DPA) ω 3 LCPUFA способствует различным аспектам здоровья человека, от состояния сердца и сосудов до развития мозга и его функционирования на протяжении всей жизни. Остается потребность в наземном источнике DPA.

Сущность настоящего изобретения

Настоящие варианты осуществления обеспечивают растение, производное растение или растение-потомок, часть растения или семена DPA-линии NUBJ1207 Brassica juncea ("DPA-Juncea"), репрезентативный образец семян которой был зарегистрирован под инвентарным номером ATCC PTA-125954 (см. приложение). Один из аспектов вариантов осуществления обеспечивает способ получения семян DPA-Juncea, предусматривающий скрещивание двух растений Brassica и сбор полученных семян, причем по меньшей мере одно из двух растений Brassica представляет собой линию NUBJ1207 DPA-Juncea или ее потомство.

Подробное описание настоящего изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами, реактивами и т.д., описанными в настоящем документе, и поэтому может быть изменено. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определен 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 для предоставления определений терминов, несоответствующих тем, которые представлены в настоящем документе. Эти публикации представлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не должно быть истолковано как признание того, что авторы изобретения не имеют права датировать более поздним числом такое раскрытие из-за предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления как о дате или представлении, так и о содержании этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием 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 в контексте явно не указано иное. В данном описании, если не указано иное, термины "содержать", "содержит" и "содержащий" использованы включительно, а не исключительно, так что указанное целое число или группа целых чисел могут включать одно или несколько других неуказанных целых чисел или групп целых чисел. Термин "или" является включающим, если он не изменен, например, на "либо". Таким образом, если в контексте не указано иное, слово "или" означает любой элемент определенного списка и также включает в себя любую комбинацию элементов данного списка.

Все значения являются приблизительными, так как состав жирных кислот может колебаться в зависимости от условий окружающей среды. Значения обычно выражены в процентах площади, что приблизительно соответствует массовым процентам от общего количества жирных кислот или массовым процентам от общего количества семян. Соответственно, за исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать как используемые во всех случаях с термином "примерно".

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, как и те, которые обычно понимает специалист в данной области техники. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определен исключительно формулой изобретения. Для того, чтобы настоящее раскрытие можно было легче понять, сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения изложены в под-

робном описании.

Настоящие варианты осуществления обеспечивают линию Brassica, которая продуцирует DPA ω 3 LCPUFA в масле из своих семян, в частности, линию, имеющую признак линии NUBJ1207 *B. juncea*. ω 3 LCPUFA известны в данной области техники, и соответствующее обсуждение этих и других жирных кислот см., например, в патенте США № 10570405.

Brassica juncea принадлежит к семейству растений Cruciferae (Brassicaceae), широко известному как семейство крестоцветных. Обычно *B. juncea* имеет бледно-зеленую листву с несколькими волосками на первых листьях и листовые пластинки, идущие далеко вверх по черешку; растения достигают 1-2 метров в высоту; нижние листья глубоко разделены на доли; верхние листья узкие, цельнокрайние, не вьющиеся; цветки бледно-желтые, раскрываются постепенно вверх от основания продолговатого соцветия; стручки (плоды) слегка прижаты и имеют длину от 2,5 до 5 см, не считая "носика" длиной от 0,5 до 1 см; семена круглые и могут быть желтыми или коричневыми. *B. juncea* представляет собой амфидиплоид (геном AABB, $2n=36$) *B. gara* (геном AA, $2n=20$) и *B. nigra* (геном BB, $2n=16$).

Brassica juncea подвида *juncea* выращивают в основном для получения ее семян. В частности, масличные семена *B. juncea* выращивают в качестве специи (семена горчицы) в Северной Америке, но их также используют в качестве источника растительного масла в Азии и других странах. Почти все масличные семена *B. juncea*, которые выращивают (в основном на Индийском субконтиненте), имеют высокое содержание как эруковой кислоты, так и глюкозинолатов, но некоторые сорта с низким содержанием глюкозинолатов и эруковой кислоты обеспечивают пищевое масло, соответствующее по качествам каноловому маслу. В частности, "каноловое масло" должно содержать менее чем 2% эруковой кислоты; и каноловый шрот определяют как один грамм воздушно-сухого безмасляного шрота, который должен содержать менее чем 30 мкмоль 3-бутенилглюкозинолата, 4-пентенилглюкозинолата, 2-гидрокси-3-бутенилглюкозинолата, 2-гидрокси-4-пентенил глюкозинолата или их смеси. См., например, "Codex Alimentarius: Fats, Oils & Related Products", Том 8 (2-е изд., Food & Agriculture Org. United Nations, Рим, Италия, 2001 г.). Примечательно, что масло из семян линии NUBJ1207 *B. juncea* содержит менее чем 1% эруковой кислоты.

По сравнению с более широко выращиваемыми видами канолы *B. napus* и *B. gara*, *B. juncea* более устойчива к стрессу при жаре и засухе. Как правило, *B. juncea* можно комбайнировать либо раздельным, либо прямым способом, потому что она более устойчива к внешнему воздействию, чем некоторые *B. napus*. Дополнительная информация о биологии, скрещиваниях и болезнях *B. juncea* легко доступна. См., например, Canadian Food Inspection Agency, Biology Document BIO2007-01, "Biology of Brassica juncea (Canola/Mustard)" (2012 год). Ни *B. juncea* дикого типа, ни *B. napus*, ни *B. gara* не продуцируют DPA в масле из семян.

"Линия" - это группа растений, которые в целом имеют очень мало различий с особями, разделяющими это обозначение. "Линия" также относится к гомогенной совокупности растений, имеющих по существу один и тот же генетический материал, которые демонстрируют небольшую генетическую вариацию между особями или вообще не имеют ее по меньшей мере по одному признаку, в частности, трансгенах, присутствующих в линии NUBJ1207, и полученную в результате выработку DPA. Термины "сорт" или "культivar" могут быть использованы взаимозаменяемо с термином "линия", но в целом первые два термина относятся к линии, подходящей для коммерческого производства. "Генетически полученный", используемый, например, во фразе "генетически полученный от родительских линий", означает, что рассматриваемая характеристика полностью или частично определена аспектом генетической структуры рассматриваемого растения.

"Потомство" означает всех потомков, включая дочерние растения и производные растения или растений, и включает в себя первое, второе, третье и последующие поколения; и может быть получено путем самоопыления растений или путем скрещивания с растениями с тем же или другим генотипами, и может быть модифицировано с помощью ряда подходящих методов генной инженерии. Культиген обычно относится к растениям, которые были преднамеренно изменены и выведены человеком. "T0" относится к первому поколению трансформированного растительного материала, "T1" относится к семенам, полученным от растений T0, семена T1 дают начало растениям T1, которые дают семена T2, и т.д., к последующему потомству Tx.

"Часть растения" включает в себя клетки растений, органы растений, протопласты растений, культуры тканей клеток растений, из которых растения могут быть регенерированы, каллусы растений, группы побегов растений и клетки растений, которые находятся в растениях или частях растений в неизменном виде, такие как зародыши, пыльца, семязачатки, семена, плоды, листья, цветы, ветки, плоды, стебли, корни, кончики корней, пыльники, семядоли, гипокотили, зародышевые корешки, отдельные клетки, гаметы, культуры клеток, культуры тканей и тому подобное. Семядоля - это тип семенного листа; это небольшой лист, содержащийся в зародыше растения. Семядоля содержит запасующие питательные вещества ткани семян. Зародыш представляет собой небольшое растение, содержащееся внутри зрелого семени. "Клетки растения" также охватывают нерегенерируемые клетки растения. Потомство, производные, варианты и мутанты регенерированных растений также включены в объем настоящих вариантов осуще-

ствления при условии, что эти части содержат одну, две или три молекулы нуклеиновой кислоты, как показано на примере SEQ ID NO: 1 и 2, SEQ ID NO: 3 и 4 и SEQ ID NO: 5 и 6, молекулы которых характерны для DPA-Juncea NUBJ1207. Настоящие варианты осуществления также направлены на применение трансгенов элитного объекта NUBJ1207 в культуре клеток и культуре тканей растений. Варианты осуществления включают в себя растения и части растений от элитного объекта линии NUBJ1207, а также другие растения, полученные описанными способами.

По меньшей мере один вариант осуществления, описанный в настоящем документе, обеспечивает новую линию *V. juncea*, обозначенную NUBJ1207, которая продуцирует DPA в масле из своих семян. Другие аспекты настоящих вариантов осуществления относятся к семенам, растениям и частям растений NUBJ1207 DPA-Juncea; способам получения растения канолы, полученного путем скрещивания NUBJ1207 DPA-Juncea с самой собой или с другим генотипом канолы; и созданию вариантов путем мутагенеза или трансформации NUBJ1207 DPA-Juncea. Таким образом, настоящие варианты осуществления включают в себя любые такие способы с использованием линии NUBJ1207, включая самоопыление, обратное скрещивание, получение гибридов и скрещивания с популяциями. Все растения, полученные с использованием линии NUBJ1207 в качестве родительской, входят в объем настоящих вариантов осуществления. По меньшей мере в одном варианте осуществления линию NUBJ1207 DPA-Juncea используют в скрещиваниях с другими различными растениями канолы для получения гибридных семян первого поколения (F₁) и растений с улучшенными характеристиками. Соответственно, помимо *V. juncea*, примеры представителей рода *Brassica*, пригодных для использования в настоящих вариантах осуществления, включают в себя, но без ограничения, *V. napus*, *V. napobrassica*, *V. oleracea*, *V. carinata*, *V. gara* и *V. campestris*, а также любые другие растения, принадлежащие к роду *Brassica*, допускающие скрещивание между видами *Brassica*. Как правило, "масличное растение" относится к любому из видов *V. napus*, *V. gara* (или *campestris*) или *V. juncea*.

Фенотипические характеристики линии NUBJ1207 DPA-Juncea, помимо продукции DPA в масле из семян, включают в себя следующее.

Таблица 1
Описательная информация для NUBJ1207 DPA-Juncea*

Виды	<i>Brassica juncea</i>
Лист: Форма	Продолговатая
Лист: Количество долей	Несколько
Лист: Ширина средней жилки	Узкая
Лист: Длина	От короткой до средней
Время цветения	От среднего до позднего
Цветок: Цвет лепестков	Желтый
Растение: Высота в зрелом состоянии	Высокое
Стручок: Длина	Средняя
Стручок: Длина носика	От короткой до средней
Цвет семян	Коричневый
Семя: Урожайность	Средняя
Семя: % Масла	От низкого до умеренного**
Семя: % Эруковой кислоты	0,04%
Семя: % EPA C20:5n3	0,65%
Семя: % DPA C22:5n3	13,37%
Семя: % DHA C22:6n3	(следы)
*Австралийские наблюдения за осенним посевом; ** Относительно <i>Brassica</i> , не продуцирующей DPA	

Описанная в настоящем документе DPA-Juncea может быть линией А, линией В или линией R. Линия представляет собой линию с мужской стерильностью; В подобна "А" по всем признакам, но она относится к линии с мужской фертильностью; R восстанавливает фертильность в гибриде F1 при скрещивании с линией В. Поскольку линию В используют для поддержания фертильности, ее также можно назвать линией-закрепителем. Линия-восстановитель представляет собой сорт опылителя, используемый для опыления линии с мужской стерильностью для получения потомства F1, обладающего мужской фертильностью и, таким образом, дающего семена при самоопылении. Инбредная линия может позволить восстановить фертильность потомства линий с мужской стерильностью, с которыми ее скрещивают. Таким образом, гибридные линии могут быть выращены из семян F1, полученных путем скрещивания двух инбредных (чистых) линий, одна из которых может обладать мужской стерильностью.

Для селекции чистых линий потомство селекций отдельных растений (самоопыляющихся) хранят отдельно и не собирают вместе. Ожидаемый результат - набор генетически гомогенных линий. Соответственно, чистая линия может быть потомком одного самоопыленного гомозиготного растения.

Соответственно, настоящие варианты осуществления обеспечивают способ введения желаемого признака в DPA-линию *Juncea* NUBJ1207, причем способ предусматривает скрещивание растения NUBJ1207 с растением другого генотипа *Brassica*, которое содержит желаемый признак, для получения растений-потомков, при этом желаемый признак выбран из группы, состоящей из мужской стерильности, устойчивости к гербицидам, устойчивости к насекомым, модифицированного метаболизма жирных кислот, модифицированного метаболизма углеводов, модифицированной урожайности семян, модифицированного процентного содержания масла, модифицированного процентного содержания белка, модифицированной устойчивости к полеганию и устойчивости к бактериальным заболеваниям, грибковым заболеваниям или вирусным заболеваниям; отбор одного или более растений-потомков, обладающих желаемым признаком, для получения отобранных растений-потомков; скрещивание отобранных растений-потомков с растениями NUBJ1207 для получения растений-потомков обратного скрещивания; отбор растений-потомков от обратного скрещивания, которые обладают желаемым признаком и по существу всеми физиологическими и морфологическими характеристиками линии NUBJ1207, для получения отобранных растений-потомков от обратного скрещивания; и повторение этих этапов три или более раз для получения отобранных растений-потомков четвертого поколения или выше от обратного скрещивания, которые содержат желаемый признак и по существу все физиологические и морфологические характеристики линии NUBJ1207, как описано в настоящем документе. В этот аспект вариантов осуществления включено растение, полученное способом, в котором растение обладает желаемым признаком (т. е. выработкой DPA) и по существу всеми физиологическими и морфологическими характеристиками линии NUBJ1207.

"Селекция" включает в себя все способы развития или размножения растений и включает в себя как внутри- и межвидовые, так и внутри- и межлинейные скрещивания, а также все подходящие методы традиционной селекции и искусственной селекции. Желаемые признаки (например, DPA-признак NUBJ1207) могут быть перенесены на другие линии, культивары или культигены канолы или *B. juncea*; или с помощью методов традиционной селекции, и также могут быть переданы другим видам *Brassica*, таким как *B. napus* и *B. gara*, путем межвидового скрещивания. Как способы традиционной селекции, так и способы межвидового скрещивания, а также другие способы переноса генетического материала между растениями хорошо известны в данной области техники.

Линия NUBJ1207 *B. juncea* была получена путем трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, с использованием генетической конструкции pJP3416_GA7-modB ("modB"), которая включает в себя семь генов, способных содействовать накоплению омега-3-жирных кислот в семенах. Вкратце, конструкция modB содержит гены, кодирующие Δ6-десатуразу, клонированную из микроводоросли *Micromonas pusilla*, Δ6-элонгазу и Δ5-элонгазу, клонированные из микроводоросли *Pyramimonas cordata*, Δ5-десатуразу, клонированную из микроводоросли *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразу, клонированную из дрожжей *Pichia pastoris*, Δ12-десатуразу, клонированную из дрожжей *Lachancea kluyveri*, и Δ4-десатуразу, клонированную из *Pavlova salina*, каждые из которых имеют подходящие промоторы и терминаторы транскрипции. См., например, патенты США № 10570405 (фиг. 1), № 10563218, № 10125084, № 9718759 и № 9932541. После вставки в *B. juncea* (линию с низким содержанием эруковой кислоты, низким содержанием глюкозинолатов), из которой была получена NUBJ1207, ген Δ4-десатуразы modB был усечен и стал неработоспособным.

Генетический анализ показал, что NUBJ1207 содержит три рекомбинантных трансгенных локуса, каждый из которых имеет отдельные трансгенные вставки, содержащие каскеты экспрессии, причем каждая вставка расположена в отдельной хромосоме. В частности, трансгенная вставка в хромосоме A06 NUBJ1207 содержит усеченную последовательность MAR (640 п.о. участков прикрепления матрицы Rb7 *Nicotiana tabacum*), промотор FA-элонгазы 1 *Arabidopsis thaliana* (ProArath-FAE1), ген Δ6-элонгазы *P. cordata*, терминатор лектина *Glycine max* (Ter_Glyma-Lectin), промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, кодирующую последовательность фермента фосфинотрицинацетилтрансферазы (PAT), терминатор нопалинсинтазы *A. tumefaciens* (TER_Agrtu-NOS) и последовательность левой границы *A. tumefaciens*, используемую для переноса Т-ДНК (LB). Вставка трансгена в хромосому B07 NUBJ1207 включает в себя последовательность правой границы *A. tumefaciens*, используемую для переноса Т-ДНК (RB), терминатор конглинина 2 *Linum usitatissimum* (TER_Linus-Cnl2), Δ6-десатуразу *M. pusilla* и усеченный промотор конглинина 2 *L. usitatissimum* (PRO_Linus-Cnl2) (отсутствует 5' 228 п.о.). Трансгенная вставка в хромосоме A08 NUBJ1207 содержит RB, TER_Linus-Cnl2, Δ6-десатуразу *M. pusilla*, PRO_Linus-Cnl2; Pro_Arath-FAE1, Δ5-элонгазу *P. cordata*, Ter_Glyma-лектин; промотор напина *B. napus* (PRO_Brana-Fp1), Δ5-десатуразу *P. salina*, TER_Agrtu-NOS; терминатор конглинина 1 *L. usitatissimum* (TER_Linus-Cnl1), Δ15/ω3-десатуразу *P. pastoris*, промотор конглинина 1 *L. usitatissimum* (PRO_Linus-Cnl1); и PRO_Linus-Cnl2, также 21 пару оснований Δ4-десатуразы *P. salina*. (Следует отметить, что вышеописанные каскеты экспрессии отражают конструкцию вектора, в которой гены не расположены в одной и той же ориента-

ции 5'-3'). Кроме того, что касается трансгенной вставки в A08, усеченная последовательность $\Delta 4$ -десатуразы кодирует только первые семь N-концевых аминокислотных остатков фермента, и не ожидается, что она будет иметь активность $\Delta 4$ -десатуразы, что согласуется с наблюдаемым содержанием жирных кислот в линии NUBJ1207 масла из семян.

Три трансгенные вставки в линии NUBJ1207 обеспечивают большинство генов из бинарного вектора modB, за исключением генов $\Delta 12$ -десатуразы и $\Delta 4$ -десатуразы. Однако *V. juncea* содержит эндогенные гены $\Delta 12$ -десатуразы и $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразы, так что активность $\Delta 12$ -десатуразы дополнена эндогенным геном. Кроме того, линия NUBJ1207 содержит две копии трансгена $\Delta 6$ -десатуразы. Эти трансгенные вставки обеспечивают поток метаболитов, который превращает олеиновую кислоту (ОК) в DPA, но не обеспечивает дальнейшего превращения DPA в DHA из-за отсутствия активности $\Delta 4$ -десатуразы.

Соответственно, вариант осуществления обеспечивает семена линии *Brassica juncea*, обозначенной NUBJ1207, репрезентативный образец семян которой был зарегистрирован под инвентарным номером ATCC PTA-125954, причем указанные семена содержат в своем геноме: первый трансгенный локус, расположенный на первой хромосоме, содержащий $\Delta 6$ -элонгазу *P. cordata* и фосфинотрицинацетилтрансферазу; второй трансгенный локус, расположенный на второй хромосоме, содержащий $\Delta 6$ -десатуразу *M. pusilla*; и третий трансгенный локус, расположенный на третьей хромосоме, содержащий $\Delta 6$ -десатуразу *M. pusilla*, $\Delta 5$ -элонгазу *P. cordata*, $\Delta 5$ -десатуразу *P. salina*, $\Delta 15/\omega 3$ -десатуразу *Pichia pastoris* и нефункциональную часть $\Delta 4$ -десатуразы *P. salina*.

Полученное из первоначальных трансформантов потомство самоопыляли, а затем была использована система педигри селекции растений для получения настоящего варианта осуществления, линии NUBJ1207. Некоторые из критериев, используемых для селекции в различных поколениях, включают в себя: содержание DPA (в% от общего количества жирных кислот в семенах), силу роста, фертильность, стойкость, устойчивость к заболеваниям, содержание масла, степень зрелости. Таким образом, NUBJ1207 представляет собой трансгенную *Brassica*, которая является генетически стабильной, однородной, и при оценке не было обнаружено нетипичных растений. Линия NUBJ1207 показала генетическую стабильность и однородность, как показано в описательной информации фенотипа. Ее самоопыляли в достаточном количестве поколений с особым вниманием к однородности типа растений. Линию размножали с постоянным наблюдением за однородностью.

Первичной фенотипической характеристикой NUBJ1207 является выработка заметных количеств DPA в масле из своих семян. Как показано в настоящем документе, большая масса семян NUBJ1207 обычно содержит около 10% DPA или более (в процентах от общего количества жирных кислот в семенах).

По меньшей мере один вариант осуществления относится к способам получения растения DPA-*Brassica* путем скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, причем первое или второе растение представляет собой растение из линии NUBJ1207 *Brassica juncea*. По меньшей мере в одном варианте осуществления как первое, так и второе родительские растения могут происходить из линии NUBJ1207. Предусмотрены любые способы селекции с использованием линии NUBJ1207: самоопыление, обратные скрещивания, гибридная селекция, скрещивания с популяциями. Любые растения, полученные с использованием линии NUBJ1207 *V. juncea* в качестве родителя, входят в объем настоящих вариантов осуществления. Например, линия NUBJ1207 *V. juncea* может быть скрещена с линией *V. juncea* с низким содержанием глюкозинолатов, соответствующим по качествам каноле, для получения DPA-*V. juncea* с низким содержанием глюкозинолатов.

Дополнительные способы согласно настоящим вариантам осуществления предусматривают введение векторов экспрессии, введенных в ткани растений, с использованием способа прямого переноса генов, такого как доставка с помощью микрочастиц, инъекция ДНК, электропорация или с использованием трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. В некоторых вариантах осуществления трансгенный вариант NUBJ1207 может содержать по меньшей мере один дополнительный трансген (в дополнение к присутствующим в NUBJ1207), например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дополнительных трансгенов. Соответственно, настоящее изобретение также относится к супертрансформированным вариантам заявленной линии NUBJ1207 или вариантам, полученным путем скрещивания NUBJ1207 с одним или несколькими другими трансгенными *Brassica*. Такие трансгены экспрессируют под контролем регуляторных последовательностей (например, промоторов, энхансеров, встроенных последовательностей, терминаторов), которые хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления желаемым признаком может быть один или несколько из следующих признаков: устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям, модифицированная урожайность семян, модифицированное процентное содержание масла, модифицированное процентное содержание белка, модифицированная устойчивость к полеганию или модифицированный метаболизм жирных кислот или углеводов. Специфическим геном может быть любой ген, известный в данной области техники или перечисленный в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь этим, маркерный ген, полинуклеотид (молекулу нуклеиновой кислоты), придающий устойчивость или толерантность к имидазолинону, сульфонилмочевине, глифосату, глюфосинату, 2,4-D, дикамбе, L-фосфинотрицину, триазину, ингибитору

гидроксифенилпируватдиоксигеназы, ингибитору протопорфириногенаоксидазы, феноксипропионовой кислоте, циклогексону или бензонитрилу; полинуклеотид, кодирующий полипептид *Bacillus thuringiensis*, полинуклеотид, кодирующий фитазу, полинуклеотид, кодирующий 1-ацилглицерин-3-фосфатацилтрансферазу (LPAAT), галактинолсинтазу или синтетический фермент рафинозы; или полинуклеотид, придающий устойчивость к черной ножке, белой ржавчине или другим распространенным заболеваниям канолы. Такие трансгены и родственные методы хорошо известны в данной области техники, см., например, патенты США № 9718759, № 8143488. В качестве альтернативы, DPA-признак из таких трансгенных вариантов осуществления может быть получен путем скрещивания канолы, содержащей по меньшей мере один трансген, как было выше описано, с NUBJ1207. Например, выработка DPA может быть увеличена путем интрогрессии NUBJ1207 с трансгенной хромосомой A02 *B. napus*, описанной в патенте США № 10563218. Признак выработки DHA, а также DPA может быть получен путем интрогрессии в NUBJ1207 по меньшей мере одной полной вставки modB, такой как, например, трансгенная хромосома A05, описанная в патенте США № 10570405 (один локус, содержащий две конструкции modB). Соответственно, трансгены или другие фенотипические признаки могут быть введены в NUBJ1207, или признак продуцирования DPA- NUBJ1207 может быть введен в другие линии *Brassica* или канолы с использованием методов традиционной селекции, таких как интрогрессия или обратное скрещивание, хорошо известных в данной области техники. Методы селекции растений канолы, которые могут быть использованы для получения потомства NUBJ1207, включают в себя, например, рекуррентную селекцию, групповую селекцию, массовую селекцию, мутационную селекцию, обратное скрещивание, селекцию с использованием метода педигри, культуру тканей, селекцию со свободным опылением, улучшенную селекцию с полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов, улучшенную селекцию с генетическим маркером, получение удвоенных гаплоидов. Часто используют комбинации этих методов. Выведение сортов *Brassica* в программе селекции растений, как правило, требует разработки и оценки гомозиготных сортов. См., например, патент США № 2018/0016591, патент США № 8143488; Downey et al., Rapeseed & Mustard, at 437 in Principles of Cultivar Devel. (Fehr (ed.), Macmillan & Co., NY, 1987); Thompson, Breeding winter oilseed rape *Brassica napus*, 7 Adv. Appl. Biol. 1-104 (1983); Ward et al., Oilseed Rape (Farming Press Ltd., Warefaredeale Road, Ipswich, Suffolk, 1985).

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления NUBJ1207 и ее потомство можно идентифицировать не только по ее фенотипическому признаку (т.е. выработке DPA), но с помощью идентификации ее генотипа. Как описано в Примере 3 в настоящем документе NUBJ1207 имеет уникальный генетический профиль, обеспеченный не только его трансгенами, но и содержащий уникальные последовательности ДНК в участках соединений, созданные при вставке трансгенных кассет в геном *B. juncea*. В частности, части генетической конструкции GA7-modB присутствуют в трех локусах, каждый из которых находится на отдельной хромосоме (хромосомы A08, A06 и B07), создавая шесть уникальных участков соединений, каждое из которых имеет уникальную последовательность ДНК.

Маркерный профиль NUBJ1207 может быть распознан с использованием таких методик, как RFLP, случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (AP-PCR), ДНК-амплификационный фингерпринтинг (DAF), амплифицированные области, охарактеризованные последовательностью (SCAR), полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP), SSR, также называемые микросателлитами или SNP. См., например, Glick, et al., Methods in Plant Molec. Biol. & Biotechnol. (CRC Press, Boca Raton, 1993). Примером анализа для идентификации участков соединений NUBJ1207 является анализ конкурентной аллель-специфической ПЦР (KASP), метод которого приведен в качестве примера в Патенте США 2018/0016591.

В настоящее время канолу признают все более важной масличной культурой и источником шрота во многих частях мира. Линия NUBJ1207 DPA-*Juncea* или ее потомство могут быть использованы в производстве масла, шрота или других продуктов питания или кормов, включая пищевые добавки или фармацевтические препараты, в соответствии с известными методиками. Предпочтительно масло, полученное из NUBJ1207 DPA-*Juncea*, имеет низкое содержание эруковой кислоты (менее чем 1%). Глюкозинолаты могут быть обнаружены во фракции шрота обработанных семян, и их можно свести к минимуму способами, известными в данной области техники.

В соответствии с Будапештским договором заявители депонировали семена NUBJ1207 DPA-*B. juncea* в Американской коллекции типовых культур (ATCC®), расположенной по адресу: 10801 University Blvd., Манассас, Вирджиния, 20110-2209 США, под инвентарным номером РТА-125954. Заявители выполнили требования 37 Свода федеральных правил §§ 1.801-1.809. Заявители не имеют права отказываться от каких-либо ограничений, налагаемых законом на передачу биологического материала или его транспортировку в коммерческих целях. Заявители не отказываются от каких-либо прав, предоставленных патентным законодательством, или прав селекционеров.

Соответственно, аспект настоящего варианта осуществления обеспечивает семена линии *Brassica juncea*, обозначенной NUBJ1207 (NUBJ1207 DPA-*Juncea*), репрезентативный образец семян которой был депонирован под инвентарным номером АТСС РТА-125954. По меньшей мере в одном варианте осуществления обеспечено растение *Brassica* или его часть, содержащая геном семян NUBJ1207 DPA-*Juncea*, полученная путем выращивания семян NUBJ1207 DPA-*Juncea*, например семена, пыльца, семядоля, по-

лусемядоля, культура тканей регенерируемых клеток или семязачаток. Культура тканей или регенерируемые клетки в соответствии с одним вариантом осуществления регенерируют растения, способные проявлять все морфологические и физиологические характеристики NUBJ1207 DPA-Juncea, и могут состоять из листьев, пыльцы, зародышей, корней, кончиков корней, плодов, цветков, семязачатков и стеблей. В другом варианте осуществления обеспечено растение Brassica или его части, обладающие всеми физиологическими и морфологическими характеристиками NUBJ1207 DPA-Juncea. Другой вариант осуществления обеспечивает клетки линии NUBJ1207 B. juncea, репрезентативный образец семян которой был депонирован под инвентарным номером ATCC PTA-125954.

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает способ получения семян Brassica, предусматривающий выращивание или культивирование NUBJ1207 DPA-Juncea, репрезентативный образец семян которой был депонирован под инвентарным номером ATCC PTA-125954, для получения семян и сбора семян. Это выращивание или культивирование можно проводить в теплице, под навесом или в открытом поле. Это выращивание или культивирование может быть осуществлено в коммерческих масштабах. По меньшей мере, в одном варианте осуществления предложена композиция, содержащая масло, шрот или белок шрота, полученные с применением этого способа. Масло может быть нерафинированным, рафинированным или обогащенным одной или несколькими жирными кислотами.

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает способ производства масла или шрота, предусматривающий получение семян NUBJ1207 DPA-Juncea или ее родственного потомства и обработку семян для получения масла или шрота. По меньшей мере, в одном варианте осуществления обеспечена композиция, содержащая масло из семян NUBJ1207 DPA-Juncea или ее родственного потомства. Масло может быть нерафинированным, рафинированным или обогащенным одной или несколькими жирными кислотами. По меньшей мере в одном варианте осуществления обеспечена композиция, содержащая шрот из семян NUBJ1207 DPA-Juncea или ее родственного потомства.

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает растение Brassica или его части, полученные из NUBJ1207 DPA-Juncea (например, потомство), причем растение или его части были трансформированы таким образом, что их генетический материал содержит один или несколько трансгенов, функционально связанных с одним или больше регуляторными элементами, присутствующими помимо трансгенов в линии NUBJ1207 Brassica juncea. Соответственно, по меньшей мере в одном варианте осуществления представлен способ получения растения Brassica, генетический материал которого содержит по меньшей мере один трансген в дополнение к трансгенам линии NUBJ1207, предусматривающий скрещивание растения NUBJ1207 или растения, полученного от него, со вторым растением другой линии Brassica, так что генетический материал потомства, полученного в результате скрещивания, экспрессирует дополнительный по меньшей мере один трансген. В качестве альтернативы по меньшей мере один вариант осуществления обеспечивает способ получения растения Brassica, которое содержит в своем генетическом материале по меньшей мере один трансген в дополнение к трансгенам линии NUBJ1207, предусматривающий введение в NUBJ1207 по меньшей мере одного дополнительного трансгена. В таких способах генетический материал потомства, полученного в результате скрещивания или трансформации, экспрессирует желаемый дополнительный признак. Дополнительный трансген может придавать устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к бактериальным заболеваниям, устойчивость к грибковым заболеваниям, устойчивость к вирусным заболеваниям или стерильность.

Другой вариант осуществления обеспечивает способ получения растения канолы, происходящего из линии NUBJ1207 Brassica, предусматривающий: (a) скрещивание линии NUBJ1207 B. juncea со вторым растением канолы для получения потомства семян канолы; и (b) выращивание указанного потомства семян канолы в условиях выращивания растений, для получения растения канолы, полученного из линии NUBJ1207 Brassica. Этот вариант осуществления может дополнительно включать в себя: (c) скрещивание растения канолы, полученного из NUBJ1207, с самим собой или другим растением канолы для получения дополнительных семян потомства канолы, полученного из NUBJ1207; (d) выращивание указанного потомства семян канолы этапа (c) в условиях выращивания растений, для получения дополнительных растений канолы, полученных из NUBJ1207; и (e) повторение этапов скрещивания и выращивания от (c) до (d) от нуля (0) до десяти (10) раз для получения дополнительных растений канолы, полученных из NUBJ1207, при этом растения канолы, полученные из NUBJ1207, экспрессируют по меньшей мере два признака NUBJ1207, выбранных из выработки DPA, и по меньшей мере одного дополнительного агрономически желаемого признака. Родственные варианты осуществления обеспечивают растение канолы, полученное из NUBJ1207, или его части, полученные такими способами.

В другом варианте осуществления представлен способ получения семян Brassica, предусматривающий скрещивание первого родительского растения Brassica со вторым родительским растением Brassica и сбор полученных в результате семян Brassica первого поколения, причем указанное первое или второе родительское растение Brassica представляет собой растение Brassica линии NUBJ1207. В частности, первое родительское растение Brassica отличается от второго родительского растения Brassica, и полученные семена представляют собой гибридные семена Brassica первого поколения (F1). Родственные варианты осуществления обеспечивают дополнительные этапы обратного скрещивания отобранных гиб-

ридных растений F1 с линией NUBJ1207 или с другим растением Brassica, обладающим желаемым признаком, для получения потомства семян обратного скрещивания; и выращивание полученных в результате обратного скрещивания потомства семян и отбор растений-потомков обратного скрещивания, которые обладают желаемым признаком; и повторение этапов обратного скрещивания и выращивания на отобранных растениях-потомках обратного скрещивания в течение от одного до десяти поколений для получения растения-потомка Brassica, полученного из линии NUBJ1207 Brassica juncea. В родственном варианте осуществления потомство, происходящее из линии NUBJ1207 Brassica juncea, может быть получено путем самоопыления (самооплодотворения) потомства F1.

В другом варианте осуществления представлен способ получения инбредной линии Brassica, предусматривающий: (a) посев коллекции семян, содержащей семена гибрида, одним из родителей которого является NUBJ1207 Brassica, причем указанная коллекция также содержит семена NUBJ1207 Brassica; (b) выращивание растений канолы из указанной коллекции семян; (c) идентификацию инбредного растения из указанной инбредной линии; (d) отбор указанного инбредного растения; и (e) регулирование опыления таким образом, чтобы сохранить гомозиготность указанного инбредного растения. Семена инбредной линии NUBJ1207 Brassica были депонированы под инвентарным номером ATCC PTA-125954. В некоторых вариантах осуществления этого способа инбредная линия Brassica может представлять собой V. juncea или V. napus.

По меньшей мере в одном варианте осуществления представлен способ получения двойного гаплоидного сорта, предусматривающий: (a) выделение цветочной почки растения F1 согласно настоящему документу; (b) выделение гаплоидной микроспоры; (c) помещение гаплоидной микроспоры в культуру; (d) индуцирование микроспоры для того, чтобы дифференцировать в зародыш, и затем в проросток; (e) идентификацию того, содержит ли проросток диплоидный набор хромосом, причем диплоидный набор хромосом возник в результате удвоения хромосом; и продолжение выращивания проростка, если он содержит диплоидный набор хромосом.

В другом аспекте настоящих вариантов осуществления обеспечены новые молекулы нуклеиновых кислот (например, молекулы ДНК), реализованные в виде участков соединений трансгенных вставок и генома V. juncea, и клетки или композиции, содержащие такие нуклеиновые кислоты. В иллюстративном варианте осуществления представлена молекула ДНК, включающая в себя одну, две или три молекулы ДНК, выбранные из: (a) молекулы ДНК, содержащей последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, (b) молекулу ДНК, содержащую последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4, или (c) молекулу ДНК, содержащую последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6. Примером композиции согласно этому аспекту может быть шрот, содержащий такие молекулы ДНК. По меньшей мере, в одном варианте осуществления представлены растения (такие как растения Brassica), семена, части растений, шрот и т.д., как описано в настоящем документе, содержащие такие молекулы ДНК.

Родственный вариант осуществления обеспечивает клетку, содержащую одну, две или три молекулы нуклеиновой кислоты, выбранные из: (a) молекулы ДНК, содержащей последовательность, представленную как SEQ ID NO: 1, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 2, (b) молекулы ДНК, содержащей последовательность, представленную как SEQ ID NO: 3, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 4, (c) молекулы ДНК, содержащей последовательность, представленную как SEQ ID NO: 5, и последовательность, представленную как SEQ ID NO: 6. Клетка может быть клеткой V. juncea. Клетка может присутствовать в растении, семенах или части растения, как описано в настоящем документе. Клетка может присутствовать в шроте (например, в шроте из семян).

Другой аспект обеспечивает способ использования молекулы ДНК из SEQ ID NO: 1-NO: 6 или ее части. Такое использование, например, включает в себя идентификацию присутствия по меньшей мере одного из локусов, характерных для NUBJ1207. Вариант осуществления обеспечивает способы обнаружения молекул ДНК, такие как амплификация молекулы ДНК, содержащей последовательность из по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов из одной из SEQ ID NO: 1-NO: 6. В конкретном варианте осуществления способ может предусматривать анализ KASP. Родственный вариант осуществления обеспечивает одноцепочечную часть любой из нуклеиновых кислот из SEQ ID NO: 1-NO: 6, такую как праймер или зонд.

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает способ обнаружения присутствия объекта NUBJ1207 в образце, содержащем растительную ДНК, причем способ предусматривает приведение указанного образца в контакт по меньшей мере с одним праймером, который связывается по меньшей мере с одним трансген-фланкирующим участком соединения генома Brassica, как показано в последовательностях SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6. В этом способе может быть использован анализ генотипирования KASP™. Родственный вариант осуществления относится к растению, растительному материалу или материалу, полученному из растения, идентифицированного с помощью таких способов. Другой родственный вариант осуществления включает в себя набор, содержащий компоненты для осуществления таких способов.

По меньшей мере, в одном варианте осуществления представлен способ обнаружения присутствия

объекта NUBJ1207 в образце, содержащем ДНК растения, причем указанный способ предусматривает: (а) приведение указанного образца в контакт с первым праймером, который связывается с фланкирующим участком соединения генома Brassica NUBJ1207, и вторым праймером, который связывается с трансгеном NUBJ1207; (b) проведение полимеразной цепной реакции указанного образца; и (c) полученные характеристики ампликонов, генерируемых между указанными праймерами.

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает геномную ДНК инбредной линии NUBJ1207 *B. juncea*, причем репрезентативные семена указанной инбредной линии были депонированы под инвентарным номером ATCC PTA-125954. Родственный вариант осуществления обеспечивает растительную клетку, содержащую: (а) ДНК, имеющую последовательность, показанную по меньшей мере в одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6, (b) ДНК, имеющую по меньшей мере 95% идентичность по меньшей мере с одной из последовательностей SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6, или (c) совокупность (а) или (b).

Другой аспект настоящих вариантов осуществления обеспечивает семена линии NUBJ1207 *B. juncea* или полученных из нее растений (т.е. потомства или родственного потомства), содержащие около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19 или около 20% включительно, ДПА (в % от общего количества жирных кислот в масле из семян). В другом варианте осуществления обеспечена коллекция семян, содержащая по меньшей мере 95% семян линии NUBJ1207 *B. juncea* или растений, полученных из нее, причем указанные семена содержат около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19% или около 20% включительно, ДПА (в % от общего количества жирных кислот в масле из семян). Конкретный вариант осуществления обеспечивает масло из семян, полученное из таких семян или коллекции семян.

В следующем аспекте представлен способ получения содержащего ДПА-семян Brassica, предусматривающий этапы: (а) интрогрессии признака ДПА NUBJ1207 в элитную линию Brassica, которая обладает мужской стерильностью; (b) интрогрессии признака ДПА NUBJ1207 во вторую элитную линию Brassica, которая является фертильной; (c) скрещивания двух линий (а) и (b) для получения гибридного потомства; (d) выращивания семян гибридного потомства; и (e) сбор семян, полученных путем культивирования гибридного потомства.

Примеры

Пример 1. Опыт культивирования (Северная Америка).

Семена, полученные из линии В, полученной из элитного объекта NUBJ1207, имели следующий профиль жирных кислот, определенный с помощью газовой хроматографии (табл. 2).

Таблица 2

Профиль жирных кислот линии В NUBJ1207 *B. juncea* (объединенные семена)

Жирная кислота	Процент (Площадь %)*
C16:0	3,8
C18:0	2,5
C18:1n9c (OA)	40,1
C18,1n7c	2,8
C18:2n6c (LA)	7,4
C18:3n3 (ALA)	16,9
C18:4n3 (SDA)	1,1
C20:1n9c	1,3
C20:4n3 (ETA)	3,1
C22:5n3 (DPA3)	13,2
*Исключая менее 1,0% площади.	

Семена высевали весной в зоне 7 Северной Америки. Во время культивации конкретные агрономические характеристики отслеживали около еженедельно, как показано в следующей табл. 3.

Таблица 3
От всходов до уборки урожая линии NUBJ1207 в летних испытаниях

Наблюдение	Время (Дни)
Всходы	1
v2-v4	9
v4-v6	14
Раннее цветение/Начало цветения	35
Цветение	43
Конец цветения	49
Завязывание семян	60
Завязывание семян	70
Созревание семян	79
Уборка	86
Содержание DPA (% от общего количества жирных кислот)	13,23%

Пример 2. Опыты культивирования (Австралия).

Четыре линии продуцирующих DPA *V. juncea*, в том числе NUBJ1207, были выращены в полевых условиях под отдельными навесами в Австралии, и содержание жирных кислот в зрелых семенах (объединенных группой) проанализировано с помощью газовой хроматографии (в качестве альтернативы жирные кислоты семян могут быть измерены с использованием ЯМР высокого разрешения). Содержание жирных кислот для жирных кислот, присутствующих в количестве более, чем 1% (% от общего количества жирных кислот), показано на табл. 4 ниже. Данные показывают согласованность между поколениями полученными от множества растений, и поколениями, полученными от одного растения.

Таблица 4
Сравнение содержания жирных кислот в масле из семян (более 1%)

линия	Влажность семян % масс.	Масло семян % масс.	Пальмитиновая (C16)	Стеариновая (C18)	Олеиновая (C18:1)	Цис-вакценовая (C18:1n7c)	Линолевая (C18:2n6c)	ALA (C18:3n3)	SDA (C18:4n3)	Гондоиновая (C20:1n9c)	ETA (C20:4n3)	DTA (C22:4n3)	DPA3 (C22:5n3)	Другие	Сумма EPA, DPA, DHA
1	6,3	37,4	4,0	2,6	41,3	2,9	7,9	16,7	1,1	1,4	3,4	1,8	11,3	3,7	12,2
2	6,2	38,2	3,8	2,7	43,5	2,9	7,9	16,6	1,0	1,3	3,3	1,9	10,3	3,3	10,7
3	6,4	36,1	3,9	2,6	41,3	2,9	7,4	16,6	1,1	1,2	3,7	2,4	11,7	3,7	12,3
NUBJ 1207	6,5	36,1	3,8	2,6	40,6	2,9	7,4	17,3	1,1	1,3	3,8	2,1	12,1	3,6	12,7

NUBJ1207 DPA-Juncea была выращена в полевых условиях на юго-востоке Австралии зимой 2017 года. Семена были посеяны в мае, в результате растения начали цвести через 139 дней после посева, и семена были собраны через 218 дней после посева.

Данные пула семян, полученных от одного растения от сибсов NUBJ1207, выращенных под навесом, показаны на табл. 5 ниже. Данные показывают согласованность между "сибсами" поколения T5.

Таблица 5

Сравнение содержания жирных кислот в масле из семян (более 1%) у гибридов NUBJ1207

Растение	Пальмитиновая (С16)	Стеариновая (С18)	Олеиновая (С18:1)	Цис-вакценовая (С18:1n7c)	Линолевая (С18:2n6c)	ALA (С18:3n3)	SDA (С18:4n3)	Гондоиновая (С20:1n9c)	ЕТА (С20:4n3)	ДРА3 (С22:5n3)	Другие	Сумма EPA, DPA, DHA
1	3,57	2,34	41,40	2,77	7,05	17,75	1,05	1,31	3,53	11,77	5,87	12,36
2	3,65	2,49	40,74	2,77	6,41	17,23	1,05	1,28	3,56	12,74	6,28	13,42
3	3,57	2,29	41,17	2,75	6,88	17,47	1,00	1,26	3,40	12,55	5,95	13,23
4	3,68	2,40	41,17	2,66	7,55	18,68	0,91	1,22	3,54	10,87	5,76	11,42
5	3,78	2,10	36,46	2,97	6,23	16,13	1,14	1,25	3,71	17,35	7,03	18,13
6	3,68	2,37	37,72	2,81	7,37	17,81	1,15	1,26	3,62	14,23	6,23	14,94
7	3,78	2,68	38,77	3,05	7,11	17,36	1,12	1,23	3,58	13,37	6,13	14,03
8	3,57	2,28	41,26	2,72	7,23	17,61	1,02	1,29	3,56	12,05	5,84	12,65
9	3,69	2,54	38,84	2,73	6,59	18,02	1,05	1,27	3,57	13,61	6,24	14,32
10	3,54	2,45	42,30	2,65	7,50	17,75	0,95	1,31	3,47	10,87	5,65	11,43
11	3,58	2,46	39,92	2,78	7,23	17,61	1,10	1,28	3,41	13,04	5,87	13,70
12	3,50	2,35	42,88	2,76	7,02	16,95	0,86	1,32	3,30	11,42	6,11	11,94
13	3,58	2,45	40,50	2,93	6,72	17,34	1,04	1,27	3,61	12,73	6,07	13,42
14	4,04	2,55	36,38	2,98	7,31	18,35	1,16	1,18	3,45	14,11	6,51	14,86
15	3,63	2,16	39,05	2,60	6,76	18,42	1,10	1,27	3,75	13,55	6,01	14,26
16	3,91	2,39	40,70	2,87	7,82	17,53	1,16	1,22	3,12	11,24	5,60	12,64
17	3,57	2,50	40,45	2,72	7,09	17,84	1,02	1,25	3,62	12,21	6,01	12,84
18	3,68	2,34	40,98	2,68	6,56	17,22	1,00	1,28	3,66	12,60	6,22	13,29
19	3,73	2,41	39,38	2,88	7,30	17,24	1,06	1,25	3,55	13,26	6,24	13,88
20	3,83	2,54	39,71	2,87	7,69	17,54	1,13	1,24	3,32	12,56	5,85	13,16

В другом эксперименте с десяти отдельных растений, выращенных под навесом, собирали плоды на разных стадиях зрелости и положении на растении, и анализировали семена. Приведенные ниже данные (табл. 6) показывают согласованность между плодами разной степени зрелости и разным положением на растении.

Таблица 6

Сравнение плодов NUBJ1207 DPA-Juncea

Плод	Семена/Плод	Пальмитиновая (С16)	Стеариновая (С18)	Олеиновая (С18:1)	Цис-вакценовая (С18:1n7c)	Линолевая (С18:2n6c)	ALA (С18:3n3)	SDA (С18:4n3)	Гондоиновая (С20:1n9c)	ЕТА (С20:4n3)	ДРА3 (С22:5n3)	Другие	Сумма EPA, DPA, DHA
1	9	3,46	2,56	43,09	2,56	7,79	16,90	0,82	1,37	3,62	10,48	5,83	11,01
2	14	4,08	2,45	37,31	2,60	7,48	18,01	1,33	1,23	4,03	14,04	5,67	14,69
3	11	3,43	2,42	42,09	2,64	7,88	16,72	0,85	1,37	3,80	11,55	5,74	12,07
4	8	3,80	2,51	40,16	2,77	7,29	17,20	1,03	1,30	4,02	12,05	6,17	12,62
5	9	3,47	2,28	39,58	2,80	7,42	17,15	1,01	1,35	4,03	13,38	5,96	14,01
6	9	3,56	2,41	41,76	2,64	6,90	16,53	1,06	1,37	3,93	12,07	6,09	12,67
7	12	3,92	2,57	38,70	2,90	6,96	16,51	1,10	1,24	3,88	14,15	6,25	14,80
8	10	4,08	2,22	30,21	3,51	7,35	20,55	1,16	1,17	3,91	17,35	6,49	18,21
9	5	3,70	1,98	32,44	2,96	7,47	19,43	0,97	1,25	4,00	17,44	6,65	18,20

Плод	Семена/Плод	Пальмитиновая (C16)	Стеариновая (C18)	Олеиновая (C18:1)	Цис-вакценовая (C18:1n7c)	Линолевая (C18:2n6c)	ALA (C18:3n3)	SDA (C18:4n3)	Гондоиновая (C20:1n9c)	ЕТА (C20:4n3)	ДРА3 (C22:5n3)	Другие	Сумма EPA, DPA, DHA
10	13	3,70	2,68	39,57	3,06	6,54	16,22	0,95	1,27	3,82	14,05	6,23	14,75

Пример 4. Уникальные фланкирующие участки.

Описанные в настоящем документе способы и наборы полезны для идентификации в биологических образцах наличия растительного материала, содержащего конкретно трансгены в NUBJ1207, а также трансгенных растений Brassica, растительных материалов и семян, содержащих такой объект. Элитный объект NUBJ1207, описанный в настоящем документе, может быть идентифицирован по генотипу, который может быть охарактеризован с помощью профиля генетического маркера, который может идентифицировать растения того же культивара или родственного культивара или быть использован для определения или подтверждения методом педигри. Профили генетических маркеров могут быть получены с помощью таких методов, как полиморфизмы длины рестриционных фрагментов (RFLP), случайная амплификационная полиморфная ДНК (RAPD), полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами (AP-PCR), ДНК-амплификационный фингерпринтинг (DAF), амплифицированные области, охарактеризованные последовательностями (SCAR), полиморфизмы длины амплифицированных фрагментов (AFLP), повторы простых последовательностей (SSR) (также называемые микросателлитами) и полиморфизмы одиночных нуклеотидов (SNP).

Например, элитный объект NUBJ1207, описанный в настоящем документе, может быть идентифицирован с помощью создания генетической карты из образца растительного материала. Генетическая карта может быть создана с помощью обычного RFLP, анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР) или SSR, который идентифицирует приблизительное хромосомное расположение интегрированной молекулы ДНК, кодирующей чужеродный белок. См Glick & Thompson, *Methods in Plant Molec. Biol. & Biotechnol.* 269 (CRC Press, Boca Raton, FL, 1993). Информация на карте, касающаяся расположения хромосом, полезна для защиты прав собственности на рассматриваемое трансгенное растение. Например, карту области интеграции можно сравнить с аналогичными картами подозрительных растений, чтобы определить, имеют ли последние общее происхождение с рассматриваемым растением. Сравнение карт может включать в себя гибридизации, RFLP, ПЦР, SSR и секвенирование, все из которых являются обычными методами.

NUBJ1207 DPA-Juncea представляет собой инбредную линию от элитного объекта, которую можно охарактеризовать и идентифицировать по уникальным последовательностям ДНК в участках соединения генома родительского растения и вставленных трансгенных конструкций. Более конкретно, каждая из хромосом A08, A06 и B07 содержит 5'- и 3'-соединение, уникальное для DPA-Juncea.

Например, последовательность ДНК 5'-соединения на хромосоме A08 включает в себя 100 нуклеотидов В. juncea (выделено курсивом) и 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом):

5'-*TAATCAGAGAAAGCTTGATGTCCACACTCWTGAGCGAGRRSCCAGATTCCGGTTC*
CGAAAAGTCCTTGAACGTARGGTRTAARGRYYYAGAAAGTGAACCTTCAAACACTGAT
 AGTTTAAACTGAAGGCGGAAACGACAATCTGCTAGTGGATCTCCCAGTCACG
 ACGTTGTAAACGGGCGCCCCGCGGAAAGCTTGCG-3' (SEQ ID NO:1)

Например, последовательность ДНК 3'-соединения на хромосоме A08 включает в себя 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом) и 100 нуклеотидов В. juncea (выделено курсивом):

5'-AAGATACCCACTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACA
 TTACAATTACATTTACAATTACCATACCATGCCACCTAGCGCTGCTAAGACTGA
 TGGAAAGATCTTCTCCTAGATCTCCACTTGCAGATCTAAATCTTCTGCTGAGGCTCTTG
 ATGCTTTAAGGATGCTTCTACTGCTCTGTTGATGCTT-3' (SEQ ID NO:2)

Например, последовательность ДНК 5'-соединения на хромосоме A06 включает в себя 100 нуклеотидов В. juncea (выделено курсивом) и 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом):

5'-*TGTCICGGTGTACTAGAAGACCTCTGTTCWTAGGATCAGATCCAGTAACGGTAAC*
 AGCGCTCATGGTATGGTAATTGTAATGTAATGTAATGTTGTTTGTAAAAAA
 AATTAATTTTACTAACACATATATTTACTTATCAAAAATTTGACAAAGTAAGA
 TТААААТААТАТТСАТСТААСАААААААААССА-3' (SEQ ID NO:3)

Например, последовательность ДНК 3'-соединения на хромосоме A06 включает в себя 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом) и 100 нуклеотидов В. juncea (выделено курсивом):

5'-CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCACTAGTGATGTACGGTTAAAACCA
 CCCCAGTACATTA AAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCTTCCAA
 CGACAATYMMGTGGATAGCAAAAACCAATGATAACAACRGCAGTRRCAACGAACMY
 RAGAGGCCAGTTGTGGGAATCAACTTCTACCTCAAGTG-3' (SEQ ID NO:4)

Например, последовательность ДНК 5'-соединения на хромосоме B07 включает в себя 100 нуклеотидов *B. juncea* (выделено курсивом) и 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом):

5'-TTGGTCAACATCCACCAACAACATACTTTTGGACAATTTTATAGAAAACACTCAA
 TATGTGATTGATATATAATTTAAAAAATATTCATAGATTTTATCAAACACTGATAGTT
 TAAACTGAAGGCGGAAACGACAATCTGCTAGTGGATCTCCAGTCACGACGT
 TGTA AAAACGGGCGCCCGCGGAAAGCTTGCG-3' (SEQ IDNO:5)

Например, последовательность ДНК 3'-соединения на хромосоме B07 включает в себя 100 нуклеотидов трансгена (не выделено курсивом) и 100 нуклеотидов *B. juncea* (выделено курсивом):

5'-GCAAGCTAGGAGTAGGATAGAGACCTTAAACGTCGTTGGTGTGAAGAGTCA
 TCTTCAGACCTAATGGAGATAGATGTAGACGGCGGCACGAAGACTCTGACAAA
 AGACAATCAAAAAATATCAAAAAGATTAKTGTCTYTGATTAGCYAGYTTGAGAAGCAACT
 GTTACTAATCAACGTAGCACGACAACAACAGCTT-3' (SEQ ID NO:6)

Для идентификации NUBJ1207 DPA-Juncea праймеры, чтобы идентифицировать участки соединений, могут иметь любую подходящую длину, полученную от более длинной последовательности участков соединений. Длина последовательностей участков соединений, используемых для идентификации NUBJ1207 DPA-Juncea, может быть любой подходящей длины, которая обеспечивает идентификацию уникального участка соединения, например, по меньшей мере 10, или по меньшей мере 15, или 20 последовательных нуклеотидов от участка соединения трансгена и ДНК *B. juncea*.

Хотя предыдущие варианты осуществления были описаны более подробно в качестве иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что определенные изменения и модификации, такие как модификации и мутации одного гена, соматические варианты, варианты особи, выращенные из больших популяций растений настоящей инбредной линии, и тому подобное, могут быть применены в рамках объема изобретения, который ограничен исключительно прилагаемой формулой изобретения.

Перечень последовательностей

<110> НЬЮСИД НЬЮТРИШНЛ ОСТРЭЛЬЯ ПиТиВай ЛТД

<120> ЛИНИЯ NUBJ1207 BRASSICA JUNCEA

<130> 87376.0015\PRO

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 200

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность ДНК 5' соединения на хромосоме A08

<400> 1

taatcagaga aagcttgatg tccacactcw tgagcgagr r sccagattcc ggttccgaaa	60
agtccttgaa cgtarggtrt aargryyyag aaagtgaact tcaaactg atagttaa	120
ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag tcacgacgtt gtaaacggg	180
cgccccgcgg aaagcttgcg	200

<210> 2

<211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность ДНК 3' соединения на хромосоме A08

<400> 2
 aagataccса cttttасаас aattaccсаас аасаасаас аасаасаас attасаатта 60
 catttасаат taccатасаа tgccacctag cgctgctaag actgatggaa gatccttctcc 120
 tagatctcca cttgcagatc тааатcttct gctgaggctc ttgatgcttt aaggatgctt 180
 ctactgctct gttgatgctt 200

<210> 3
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность ДНК 5' соединения на хромосоме A06

<400> 3
 tgctcggtgt tactагаага cctctgttcw taggatcaga tccagtaacg gtaacagcgc 60
 tcatggtatg gтаатtgтаа atgтаатtgт atgттgttt gtttgтаааа ааааттаатт 120
 tttactaaca catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gтаагаттаа аатаататтс 180
 atctaасааа ааааааасса 200

<210> 4
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность ДНК 3' соединения на хромосоме A06

<400> 4
 cgcgcggtgt catctatggt actagatcac tagtgatgta cggttaaac caccцcagta 60
 cattаааааас gtccgcaatg tgттаттааg ttgtctaagc ttccaacgac аатymmgtgg 120
 atagсааааас саатgатаас аааcrgcagt rrcaacgaac myragaggcc agттgtggga 180
 atcaacttct acctcaagtg 200

<210> 5
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность ДНК 5' соединения на хромосоме B07

<400> 5
 ttggtcaaca tccaccaaca actattcttt ttggacaatt ttatagaaaa cactcaatat 60

gtgattgata tataatttaa aaaatatttc atagatttta tcaaactg atagtttaa 120
 ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag tcacgacggt gtaaacggg 180
 cgccccggg aaagcttgcg 200

<210> 6
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность ДНК 3' соединения на хромосоме В07

<400> 6
 gcaagctagg agtaggatag agaccttaaа cgctggtggt gtgaagagtc atcttcagac 60
 ctaatggaga tagatgtaga cggcggcacg aagactctga caaaagacaa tcaaaaaata 120
 tcaaaaagat taktgtcytg attagcyagy ttgagaagca actgttacta attcaacgta 180
 gcacgacaac aaacagcttt 200

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Семя, полезное для получения омега-3-докозапентаеновой кислоты (DPA), причем указанное семя происходит из инбредной трансгенной линии Brassica или ее потомства, обозначаемой NUBJ1207, причем репрезентативное семя указанной NUBJ1207 депонировано в Американской коллекции типовых культур (АТСС) под идентификационным номером РТА-125954, причем указанное семя идентифицировано с помощью генетического анализа соединения трансгенного локуса хромосомы А08, характеризующегося как содержащий SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные любой из указанных последовательностей или обоим из них, или их комплементы, трансгенного локуса хромосомы А06, характеризующегося как содержащий SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные любой из указанных последовательностей или обоим из них, или их комплементы, или трансгенного локуса хромосомы В07, характеризующегося как содержащий SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные любой из указанных последовательностей или обоим из них, или их комплементы.

2. Применение семени по п.1 для получения растения Brassica.

3. Применение семени по п.1 для получения масла, содержащего омега-3-докозапентаеновую кислоту (DPA).

4. Применение по п.3, где указанное масло семени содержит от около 5 до около 16% (мас.% от общего количества жирных кислот в масле) включительно омега-3 докозапентаеновой кислоты.

5. Применение по п.3, где масло содержит жирные кислоты в этерифицированной форме, причем жирные кислоты включают в себя пальмитиновую кислоту (С16), стеариновую кислоту (С18), олеиновую кислоту (С18:1), цис-вакценовую кислоту (С18:1n7c), линолевую кислоту (С18:2n6c), а-линолевую кислоту (С18:3n3), стеаридоновую кислоту (С18:4n3), гондоиновую кислоту (С20:1n9c), эйкозатетраеновую кислоту (С20:4n3), ω3-докозатриеновую кислоту (С22:4n3) и ω3-докозапентаеновую кислоту (С22:5n3);

при этом в общем содержании жирных кислот в указанном масле из семян:

уровень пальмитиновой кислоты составляет менее 5%, уровень стеариновой кислоты составляет менее 4%, уровень олеиновой кислоты составляет 35-48%, уровень цис-вакценовой кислоты составляет менее 4%, уровень линолевой кислоты составляет менее 9%, уровень α-линолевой кислоты составляет 15-20%, уровень стеаридоновой кислоты составляет менее 2%, уровень гондоиновой кислоты составляет менее 2%, уровень эйкозатетраеновой кислоты составляет менее 4,5%, уровень ω3-докозатриеновой кислоты составляет 1-3%, и уровень ω3-докозапентаеновой кислоты составляет 8%-15% включительно.

6. Клетка растения, полезная для идентификации растения Brassica, которое продуцирует омега-3-докозапентаеновую кислоту, причем клетка происходит из инбредной линии Brassica или ее потомства, обозначаемой NUBJ1207, депонированной в Американской коллекции типовых культур (АТСС) под идентификационным номером РТА-125954, и содержит по меньшей мере одно из следующего: (а) SEQ

ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные им, или их комплементы, (b) SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные им, или их комплементы, или (c) SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, последовательности, по меньшей мере на 95% идентичные им, или их комплементы, где указанные (a), (b) и (c) представляют собой соединения трансгенных локусов хромосом A08, A06 и B07, которые являются характерными для NUBJ1207.

7. Способ обнаружения присутствия объекта NUBJ1207 в образце, содержащем ДНК растения, где указанный способ включает приведение указанного образца в контакт с по меньшей мере одним праймером или зондом, который связывается с по меньшей мере одним трансген-фланкирующим участком соединения генома Brassica, как показано в SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

8. Способ по п.7, где указанный способ представляет собой анализ генотипирования на основе конкурентной аллель-специфической ПЦР.

9. Способ по п.7, где указанный способ включает: (a) приведение указанного образца в контакт с первым праймером, который связывается с трансген-фланкирующим участком соединения генома NUBJ1207 Brassica, и вторым праймером, который связывается с трансгеном NUBJ1207, причем указанный трансген выбран из гена Δ6-десатуразы *Micromonas pusilla*, Δ5-элонгазы *Pyramimonas cordata*, Δ5-десатуразы *Pavlova salina*, Δ15/ω3-десатуразы *Pichia pastoris*, Δ4-десатуразы *Pavlova salina* или Δ6-элонгазы *Pyramimonas cordata*; (b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и (c) получение характеристики ампликонов, генерируемых между указанными праймерами.

10. Геномная ДНК инбредной линии NUBJ1207 Brassica, причем репрезентативное семя указанной инбредной линии канола депонировано в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под идентификационным номером РТА-125954, где указанная геномная ДНК характеризуется как содержащая SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 или их комплементы, последовательности которых представляют собой соединения трансгенных локусов хромосом A08, A06 и B07, которые являются характерными для NUBJ1207.

11. Применение семени по п.1 для получения шрота.

12. Способ *in vitro* обнаружения наличия по меньшей мере одного трансгенного локуса объекта Brassica juncea NUBJ1207 или ее потомства в образце, содержащем ДНК растения, причем указанный способ включает:

(a) приведение указанного образца в контакт с:

праймером, который связывается с 5' трансгенным участком соединения на хромосоме A08, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 1, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, или ее комплемент;

праймером, который связывается с 3' трансгенным участком соединения на хромосоме A08, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 2, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2, или ее комплемент;

праймером, который связывается с 5' трансгенным участком соединения на хромосоме A06, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 3, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3, или ее комплемент;

праймером, который связывается с 3' трансгенным участком соединения на хромосоме A06, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 4, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4, или ее комплемент;

праймером, который связывается с 5' трансгенным участком соединения на хромосоме B07, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 5, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, или ее комплемент; или

праймером, который связывается с 3' трансгенным участком соединения на хромосоме B07, где указанный по меньшей мере один первый участок соединения содержит SEQ ID NO: 6, последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6, или ее комплемент;

(b) подвергание указанного образца полимеразной цепной реакции; и

(c) анализ ампликонов;

причем указанный способ является диагностическим для элитного объекта NUBJ1207, характеристика семени которого депонирована в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под идентификационным номером РТА-125954.

13. Способ по п.12, где способ представляет собой анализ генотипирования на основе конкурентной аллель-специфической ПЦР.

14. Растение или часть растения, которое идентифицировано способом по любому из пп.7, 8, 9 или 12.

15. Семя, которое идентифицировано способом по любому из пп.7, 8, 9 или 12.

