



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119026** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 15/01 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 1/06 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

A01H 6/08 (2018.01)

A01H 6/14 (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 00941**

(22) Дата подання заявки: **01.07.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.04.2019**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.07.2014, Бюл.№ 14**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2019, Бюл.№ 8**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **РСТ/EP2011/061165,
01.07.2011**

(72) Винахідник(и):

**Леон Альберто Хав'єр (AR),
Самбельї Андрес Даніель (AR),
Рейд Роберто Хуан (AR),
Мората Моніка Маріель (AR),
Каспар Маркос (AR)**

(73) Власник(и):

**ЕДВАНТА ІНТЕРНЕТШЛ БВ,
Strawinskylaan 1143, Tower C-11, NL-1077
XX Amsterdam, The Netherlands (NL)**

(74) Представник:

**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

**HONGTRAKUL V ET AL. A SEED SPECIFIC
DELTA-12 OLEATE DESATURASE GENE IS
DUPLICATED, REARRANGED, AND
WEAKLY EXPRESSED IN HIGH OLEIC ACID
SUNFLOWER LINES. THE PLANT GENOME,
CROP SCIENCE SOCIETY OF AMERICA,
MADISON, WI, US. 01.09.1998, vol. 38, № 5,
P. 1245-1249**

US 4627192 A, 09.12.1986

**Lacombe S ET AL. Genetic, molecular and
expression features of the pervenets mutant
leading to high oleic acid content of seed oil in
sunflower. O.C.L. OLEAGINEUX CORPS
GRAS LIPIDES, EDITIONS JOHN LIBBEY
EUROTEXT, MONTROUGE, FR. 1 January
2002, vol. 9, № 1, P. 17-23**

(54) НУКЛЕОТИДНА ПОСЛІДОВНІСТЬ, ЯКА КОДУЄ УКОРОЧЕНИЙ БІЛОК ОЛЕАТ-ДЕСАТУРАЗИ СОНЯШНИКА З НИЗЬКОЮ ФЕРМЕНТАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеної нуклеотидної послідовності, яка містить передчасний стоп-кодон в SEQ ID NO: 5, і кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що має низьку ферментативну активність, рослини соняшника, здатного виробляти насіння із вмістом олеїнової кислоти від 80 до 95 % відносно сумарного процентного вмісту жирних кислот насіння, насіння вказаної рослини соняшника; способу одержання вказаної рослини; застосування вказаного насіння для одержання олії та способу одержання олії.

UA 119026 C2

Даний винахід стосується виділених нуклеотидних послідовностей, які кодують мутантний білок олеат-десатурази соняшника, мутантного білка, рослин, що виробляють білок, насіння і олій, що виробляються рослиною, способів отримання мутантних послідовностей і застосувань білка і рослини.

5 РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Кислий фермент олеат-десатурази (OLD) залучений до ферментативного перетворення олеїнової кислоти в лінолеву кислоту. Мікросомний OLD клонували і охарактеризовували з використанням маркерної технології за допомогою Т-ДНК (T-DNA tagging, Okuley, et al. (1994) Plant Cell 6:147-158). Нуклеотидні послідовності вищих рослин, кодуючі мікросомний OLD, були описані в документі WO94/11516 PCT Lightner et al.

Соняшник, як правило, культивується для отримання насичених жирних кислот (пальмітинової і стеаринової) і ненасичених жирних кислот (олеїнової і лінолевої). Вміст стеаринової кислоти завжди нижче ніж 10 % (Guston et al. (1986) The lipid handbook, Chapman and Hall Great Britain), звичайно від 3 до 7 %. Що стосується вмісту ненасичених жирних кислот, то існує два типи насіння соняшника: звичайний соняшник, який має вміст лінолевої кислоти від 10 15 50 % до 70 % (Knowles (1988) Recent advances in oil crops breeding, AOCS Proceedings), і соняшник з високим вмістом олеїнової кислоти, який має вміст лінолевої кислоти 2-10 % і олеїнової кислоти від 75 % до 90 % (Soldatov (1976) Chemical mutagenesis in sunflower breeding, Proceedings of the 7th International Sunflower Conference, 352-357). Також існує лінія соняшника, 20 яка має високий вміст пальмітинової кислоти від 22 до 40 % (Ivanov et al. (1988) Sunflower Breeding for High Palmitic Acid Content in the Oil, Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Vol II, 453-465), і інша лінія соняшника з низьким вмістом насичених жирних кислот (менше ніж 6 %) (EP-A-0496504).

З метою реагування на потреби в рослинних оліях, які цікавлять, як для промисловості, так і 25 для харчового споживання людиною, були зроблені зусилля з поліпшення сортів насіння олійних культур, сфокусовані на модифікації жирнокислотного складу насіння, наприклад, за допомогою стандартних програм схрещування, мутагенезу або трансгенезу.

Мутації, як правило, індукуються за допомогою дуже високих доз радіації або хімічним мутагенезом (Gaul (1964) Radiation Botany 4:155-232). Високі дози, що перевищують летальну 30 дозу 50 % (LD₅₀), і, як правило, летальні дози 90 % (LD₉₀) максимізують процентний вміст можливих мутацій.

Мутагенез, проведений Солдатовим у 1976 в популяції соняшника, дозволив отримати популяцію так званих мутантів "Первісток". Середній вміст олеїнової жирної кислоти (18:1) 35 насіння даного сорту складає вище, ніж 65 %, індивідуальний вміст складає від 60 до 80 %, в той час як в звичайних сортах (низький вміст олеїнової кислоти, LO) цей вміст становить приблизно 20 %. Популяція "Первісток" поширена по всьому світу і використовується в багатьох програмах схрещування з метою перетворення певних генотипів з низьким вмістом 18:1 в генотипи з високим вмістом 18:1 в їх насінні.

Акумуляція 18:1 в насінні залежить від двох ферментних реакцій: десатурація 18:0 40 (стеаринова кислота) до 18:1 і подальша десатурація 18:1 до 18:2 (лінолева кислота). Фермент олеат-десатураза (OLD) каталізує десатурацію 18:1 до 18:2 (Ohlrogge and Browse (1995) The Plant Cell, 7:957-970, Somerville and Browse (1996) Trends Cell Biol 6:148-153; Schwartzbeck (2001) Phytochemistry, 57:643-652).

Соняшникова олія за своєю природою багата 18:2 (55-70 %) і відповідно бідна 18:1 (20- 45 25 %). Традиційні сорти класифікуються як маючі низький вміст олеїнової кислоти (низькоолійні, LO). Оскільки існує високий запит серед споживачів на отримання більш здорової їжі у вигляді олій з високим вмістом олеїнової кислоти, то також існує запит на розробку рослин соняшника з високим вмістом олеїнової кислоти, які переважно приводять до отримання культур з таким же високим виходом, як і у звичайних сортів соняшника.

Дослідження, що проводяться Garces et al. в 1989 і 1991 (Garces et al. (1989) Phytochemistry 28:2597-2600; Garces and Mancha (1991) Phytochemistry 30:2127-2130), продемонстрували, що фенотип з високим вмістом олеїнової кислоти (високоолійні, HO) асоційований з помітним 50 зниженням активності ферменту OLD, який каталізує десатурацію 18:1 до 18:2 в HO-насінні під час критичних стадій синтезу ліпідного запасу, що пояснює акумуляцію 18:1.

Було продемонстровано, що мутація "Первісток" асоційована з генними дуплікаціями всередині гена OLD, що приводять до сайленсингу гена. Це зменшення в транскрипції OLD 55 пояснює зменшення кількості ферменту і, таким чином, низьку продемонстровану активність OLD (Hongtrakul et al. (1998) Crop Sci 38:1245-1249), що узгоджується з акумуляцією 18:1 в насінні соняшника. Це відкриття привело до розробки молекулярних маркерних характеристик

мутації, які можуть використовуватися в програмах схрещування для полегшення селекції НО-генотипів (WO2005/106022; Lacombe et al. (2001) Life Sci 324:839-845).

Традиційна соняшникова олія з високим вмістом 18:2 розглядається як здорова рослинна олія, яка має правильний смак, і розглядається як олія, що має перший клас якості на світовому ринку завдяки високому процентному вмісту в ньому поліненасичених жирних кислот. Вона використовується як салатна олія, кулінарна олія або для отримання маргарину.

Шляхом модифікації профілю жирних кислот в соняшниковій олії може бути розроблена нова соняшникова олія, що має більш високу стійкість до окиснення в порівнянні із звичайною олією. Ця олія повинна містити рівень щонайменше 18:1 55-65 % відносно сумарного вмісту жирних кислот. Користь даної олії в її високій стійкості до окиснення після процесу екстракції і стабільності смаку смажених продуктів. Соняшникова олія з високою концентрацією 18:1 не має потреби в гідрогенізації для підвищення стабільності і не утворює транс-жирних кислот.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Метою даного винаходу є пропозиція виділеної нуклеотидної послідовності, що кодує мутантний білок олеат-десатурази (OLD), що володіє низькою ферментною активністю. Ця більш низька ферментна активність при експресії в рослині, конкретно в рослині соняшника, спричиняє підвищення кількості олеїнової кислоти в рослинній олії або в рослинній олії з насіння в порівнянні з існуючими рослинами.

Таким чином, винахід додатково стосується виділеної нуклеотидної послідовності, що включає вставку, яка змінює рамку зчитування, чия нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок OLD соняшника. У переважному втіленні вставлена нуклеотидна послідовність включає передчасний стоп-кодон і кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2. Кодуюча послідовність укороченого білка олеат-десатурази може являти собою нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:3 або SEQ ID NO:4.

Згідно з наступним аспектом в даному винаході пропонується укорочений білок олеат-десатурази, що включає не більш ніж 110 амінокислот з N-кінцевої області. У переважному втіленні амінокислотна послідовність складається з SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2.

Згідно з іншим аспектом даний винахід стосується рослини соняшника, що включає два алелі OLD з вставкою, що кодує укорочений білок OLD. Кожний алель включає нуклеотидну послідовність, яка має вставку, що включає передчасний стоп-кодон, і де вказана послідовність кодує укорочений білок OLD. У переважному втіленні нуклеотидна послідовність являє собою SEQ ID NO:3 або SEQ ID NO:4. Мутантна рослина виробляє насіння із вмістом олеїнової кислоти від 80 % до 95 % по відношенню до сумарного процентного вмісту жирних кислот в насінні.

У наступному втіленні винахід стосується рослини соняшника, здатної виробляти насіння, із вмістом олеїнової кислоти від 80 до 95 % по відношенню до сумарного процентного вмісту жирних кислот в насінні, причому рослину отримують шляхом схрещування рослини лінії 29065, яка має реєстраційний номер NCIMB 41733, або лінії 29066, яка має реєстраційний номер NCIMB 41734, з іншою рослиною, і шляхом селекції в F2 з отриманням рослин, які виробляють насіння, що мають вміст олеїнової кислоти від 80 до 95 % по відношенню до сумарного процентного вмісту жирних кислот в насінні.

У винаході також пропонується насіння соняшника, яке включає два алелі OLD з вставкою, що кодує укорочений білок олеат-десатурази. Кожний алель включає нуклеотидну послідовність, яка має вставку, що включає передчасний стоп-кодон, і де вказана послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази. Нуклеотидна послідовність може являти собою послідовність, представлену в SEQ ID NO:3 або SEQ ID NO:4. Амінокислотна послідовність білка олеат-десатурази може являти собою послідовність, представлену в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2. У переважному втіленні насіння являє собою насіння лінії 29065, характерний зразок насіння, який був депонований під реєстраційним номером NCIMB 41733, або насіння лінії 29066, характерний зразок насіння, який був депонований під реєстраційним номером NCIMB 41734.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу пропонується соняшникова олія, яка має вміст олеїнової кислоти від 80 % до 95 % по відношенню до сумарного вмісту жирних кислот в олії, яку можна отримати або отримують з насіння соняшника, яке включає два алелі OLD, які містять вставку і кодують укорочений білок олеат-десатурази. У переважному втіленні олію отримують з насіння лінії 29065, характерного зразка насіння, яке було депоноване під реєстраційним номером NCIMB 41733, або з насіння лінії 29066, характерного зразка насіння, яке було депоноване під реєстраційним номером NCIMB 41734.

У даному винаході додатково пропонується застосування насіння соняшника для екстракції олії. У переважному втіленні насіння являє собою насіння лінії 29065, характерний зразок насіння, який був депонований під реєстраційним номером NCIMB 41733, або насіння лінії 29066, характерний зразок насіння, який був депонований під реєстраційним номером NCIMB 41734.

Винахід додатково стосується потомства заявленого насіння, де вказане потомство включає вставку в гені, який кодує білок олеат-десатурази, в якому така вставка приводить до синтезу укороченого білка олеат-десатурази.

Винахід додатково стосується способу отримання рослини соняшника з високим вмістом олеїнової кислоти, який включає наступні стадії:

а) мутагенез частини рослини соняшника;

б) отримання щонайменше одного потомства мутантної рослини, і

с) ідентифікація і селекція щонайменше однієї рослини, отриманої в стадії б), що включає нуклеотидну послідовність, яка має вставку, що включає передчасний стоп-кодон, і де вказана нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази. В одному втіленні укорочений білок олеат-десатурази включає послідовність, що складає не більш ніж 110 амінокислот з N-кінцевої області олеат-десатурази соняшника, наприклад, білок, представлений в SEQ ID NO:1 або SEQ ID NO:2.

Згідно з іншим аспектом у винаході пропонується спосіб отримання високоолійної соняшникової олії, що включає екстракцію олію з насіння, характерний зразок насіння був депонований під реєстраційним номером NCIMB 41733 або NCIMB 41734.

ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1 представлений графік процентного вмісту олеїнової кислоти по відношенню до всіх основних жирних кислот для гомозиготних рослин для високоолійної мутації "Первісток", для ліній 29065 і 29066, отриманих в схрещуваннях 20342 × 29065; 20342 × 29066; 20340 × 29065 і 20340 × 29066. У всіх випадках процентні вмісту олеїнової кислоти в рослинах F₂, які несуть мутації за даним винаходом в гомозиготному статусі (mut 29065 Hm і mut 29066 Hm, відповідно) порівнюються з рослинами F₂, які несуть мутацію "Первісток" в гомозиготному статусі (mut "Первісток" Hm). Точки характеризують значення і сегменти всередині боксів характеризують середні значення.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується мутантної нуклеотидної послідовності, що кодує олеат-десатуразу, яка має вставку, де вставлена послідовність включає передчасний стоп-кодон і, таким чином, білок олеат-десатурази соняшника є укороченим. Кодований укорочений білок олеат-десатурази має більш низьку ферментну активність, що приводить до отримання рослини або частин рослини, такої як насіння, яке акумулює велику кількість олеїнової кислоти.

Укорочена амінокислотна послідовність може являти собою будь-яку послідовність, яка включає не більш ніж перші 110 амінокислот з N-кінцевої області білка олеат-десатурази соняшника. У переважному втіленні укорочена амінокислотна послідовність може являти собою послідовність, представлену в SEQ ID NO:1, або послідовність, представлену в SEQ ID NO:2.

Нуклеотидні послідовності, піддані мутації за допомогою вставки, включають передчасний стоп-кодон, який приводить до синтезу укороченого білка OLD соняшника. Потрібно розуміти, що будь-яка нуклеотидна послідовність, яка кодує білок олеат-десатурази, який включає не більш ніж перші 110 амінокислот N-кінцевої області OLD соняшника дикого типу, наприклад, один з ліній HA89, знаходиться в рамках даного винаходу.

Нуклеотидні послідовності, які включають вставку, яка містить передчасний стоп-кодон, наприклад, послідовності, представлені в SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4, знаходяться в рамках даного винаходу.

Різні лінії соняшника були піддані мутації, наприклад, лінії HA89 і 29010, для отримання насіння з високим вмістом олеїнової кислоти. Відібрані мутації в кодуючій послідовності гена олеат-десатурази соняшника, являють собою мутації, шляхом вставки послідовностей, які включають передчасний стоп-кодон, причому вказані нуклеотидні послідовності кодують укорочені білки олеат-десатурази.

Мутантне насіння за винаходом депонували згідно з Будапештською угодою в колекцію Національної Бібліотеки Промислових, Харчових і Морських Бактерій (NCIMB) 20.07.2010 під наступними реєстраційними номерами: лінія 29065 відповідає реєстраційному номеру NCIMB 41733, і лінія 29066 відповідає реєстраційному номеру NCIMB 41734.

Даний винахід стосується всього насіння і рослин, конкретно, насіння соняшника і рослин, які несуть в своєму геномі мутацію, яка приводить до отримання укороченого білка олеат-десатурази, що має ферментну активність, яка є зниженою в порівнянні з існуючими

ферментами олеат-десатурази, що приводить до більш високого вмісту олеїнової кислоти в олії з насіння. В одному втіленні мутація являє собою вставку, яка несе стоп-кодон. Інші мутації, які приводять до отримання укорочення олеат-десатурази максимум до 110 амінокислот, також знаходяться в рамках даного винаходу. Такі рослини і насіння, які мають більш високий вміст олеїнової кислоти в олії, можуть бути отримані шляхом схрещування з рослинами депонованих ліній 29065 (NCIMB 41733) або 29066 (NCIMB 41734) і селекції потомства рослин, які мають більш високий вміст олеїнової кислоти. Селекція здійснюється відповідним чином в F₂, оскільки мутація, що приводить до укорочення, повинна переважно бути присутньою гомозиготно для більш низької ферментної активності, щоб приводити до більш високого вмісту олеїнової кислоти. Альтернативно, мутантний ген може бути привнесений в рослину соняшника за допомогою генетичної інженерії, конкретно, з використанням мутантного гена олеат-десатурази, описаного в даному документі, або з використанням будь-якого іншого гена, що приводить до отримання такого ж укороченого продукту експресії довжиною не більш ніж 110 амінокислот.

Мутантні рослини і насіння за винаходом можуть бути отримані з використанням різних схем мутагенезу. У переважному втіленні мутагенний агент, такий як EMS, в концентрації від 5 до 15 % ін'єктується в квіткові головки рослин, насіння збирає і потім застосовує рентгенівське випромінювання.

Після мутагенезу аналізували жирнокислотний профіль мутантного насіння M2 і батьківського насіння, і відбирали ті, які демонстрували високий вміст олеїнової кислоти, наприклад, вище 80 % в порівнянні із вмістом жирних кислот насіння, переважно приблизно 90 % в порівнянні з сумарним вмістом жирних кислот насіння.

В іншому переважному втіленні мутантні рослини і насіння отримували за допомогою застосування рентгенівського випромінювання. Потім жирнокислотний профіль насіння M2 порівнювали з жирнокислотним профілем батьківського насіння, і відбирали те, яке демонструвало високий вміст олеїнової кислоти, наприклад, що має вище 80 % по відношенню до сумарного вмісту жирних кислот в насінні, переважно, приблизно 90 % в порівнянні з сумарним вмістом жирних кислот в насінні.

Олія, отримана з будь-якого насіння соняшника за винаходом, має вміст олеїнової кислоти вище, ніж 80 % по відношенню до сумарного вмісту жирних кислот в насінні, переважно, вище ніж 85 % і більш переважно, вище ніж 90 %.

Здійснювали направлені схрещування між лініями, які належать Advanta Semillas, з високоолійним фенотипом, які є носіями мутації "Первісток" (20342 і 20340), і високоолійними мутантами 29065 і 29066 за винаходом: 20342 × 29065; 2042 × 29066; 20340 × 29065 і 20340 × 29066. Рослини F₁, отримані в кожному схрещуванні, були самозапилюваними, і їх насіння (F₂) збирали. Насіння F₂ з кожного схрещування висаджували в полі в Балькарсе в сезон 2008/2009.

За допомогою застосування специфічних молекулярних маркерів, гомозиготні рослини ідентифікували на предмет мутації "Первісток" і мутацій 29065 і 29066, отриманих в кожному схрещуванні. Вказані рослини були самозапилюваними, і насіння збирали індивідуально. Групу з 30 насінин відбирали з кожної рослини, висівали в блок і визначали жирнокислотний склад олії за допомогою газової хроматографії.

У всіх випадках гомозиготні рослини з мутаціями 29065 і 29066 демонстрували середні процентні вмісту олеїнової кислоти, що перевищують їх відповідні значення у рослин з мутацією "Первісток" (див. Таблицю 3 і Фіг. 1).

Нуклеотидні і амінокислотні послідовності порівнювали з відповідними послідовностями лінії HA89 соняшника дикого типу (SEQ ID NO:5 і SEQ ID NO:6). Ці послідовності були ідентичні відповідним послідовностям лінії 29010 соняшника дикого типу.

Винахід ілюструється наступними прикладами, які не треба розглядати як обмеження рамок винаходу. Навпаки, потрібно з всією ясністю розуміти, що для фахівця в даній галузі можливо після прочитання даного опису застосувати інші втілення, модифікації і еквіваленти винаходу, не виходячи при цьому за рамки даного винаходу і/або прикладеної формули винаходу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

1.1 Мутагенез за допомогою рентгенівського випромінювання (отримання лінії 29065)

Насіння M0 лінії 29010, власність Advanta Semillas SAIC, піддавали мутагенезу за допомогою застосування рентгенівського випромінювання. Випромінювання проводили в Інституті Генетики "Edward A. Favret", CICVyA-CNIA, INTA-Castelar, Аргентина. Пристрій для рентгенівського випромінювання Philips MG 160, 4KW з максимальною потужністю 160 кВ, 19 мА і з споживанням енергії 120 кВ, 15 мА. Використовували час експонування і дози становили 7 хв. 55 сек і 144 Гр, відповідно, з відстанню між фокусом джерела і об'єктом (насіння) 40 сантиметрів.

Опромінене насіння висівали 12 грудня 2005 в 12 рядів по 100 метрів довжиною в Балкарці з номером партії CA05-6347. Квіткові головки отриманих 1606 рослин упаковували в мішечки перед цвітінням з метою отримання насіння з допомогою самозапилення, M2. Квіткові головки в кожному ряду збирали і обмолочували індивідуально. Насіння M2 з 1606 рослин аналізували за допомогою газової хроматографії (GC) для визначення жирнокислотного складу в 30 індивідуальних насіннях M2 на рослину. Мутантна рослина CA05-6347-725 демонструвала фенотип з високим вмістом олеїнової кислоти, і була названа 29065.

1.2 Мутагенез за допомогою ін'єкції EMS і подальшого опромінення за допомогою рентгенівського випромінювання (отримання лінії 29066)

Сімдесят п'ять рядів насіння лінії HA89 висівали в Біотехнологічному Дослідницькому Центрі Advanta Semillas SAIC в Балькарсе (Буенос-Айрес, Аргентина) в сезон 2004/5 і ідентифікували під номером партії CA04-3, і 40 рядів під номером партії CA04-1501. Кожний ряд становив 6 метрів в довжину.

Квіткові головки піддавали мутагенезу за допомогою ін'єкції EMS (етиловий ефір метансульфокислоти) в дозах 5, 10 і 15 % з використанням відповідного протоколу мутагенезу. Кожну рослину M0 упаковували в мішечки перед цвітінням з метою отримання самозапилюваного насіння M1. Квіткові головки рослин кожної обробки EMS збирали, обмолочували і зберігали. Квіткові головки рослин піддавали мутагенезу за допомогою ін'єкції з використанням EMS (етиловий ефір метансульфокислоти) в дозах 5, 10 і 15 % з використанням протоколу, описаного в WO2006/024351 і WO2008/071715. EMS являє собою мутагенний агент, який індукує транзиції G/C в A/T (Jander et al. (2003) Plant Physiol. 131:139-146). З метою отримання самозапилюваного насіння M1 кожен рослину M0 покривали нейлоною сіткою перед цвітінням. Квіткові головки рослин кожної 5 % обробки EMS збирали, обмолочували і ідентифікували (партія CA04-3).

Вказане насіння M1 потім піддавали мутагенезу за допомогою застосування рентгенівського випромінювання. Опромінення проводили в Інституті Генетики "Edward A. Favret", CICVyA-CNIA, INTA-Castelar, Аргентина. Пристрій для рентгенівського випромінювання Philips MG 160, 4KW з максимальною потужністю 160 кВ, 19 мА і з споживанням енергії 120 кВ, 15 мА. Використовували час експонування і дози становили 7 хв. 55 сек. і 144 Гр, відповідно, з відстанню між фокусом джерела і об'єктом (насіння) 40 сантиметрів.

Опромінене насіння висівали 12 грудня 2005 в 16 рядів по 100 метрів довжиною в Балькарсе з номером партії CA05-6362. Квіткові головки отриманих 555 рослин упаковували в мішечки перед цвітінням з метою отримання насіння з допомогою самозапилення, M2. Квіткові головки в кожному ряду збирали і обмолочували індивідуально. Насіння M2 з 555 рослин аналізували за допомогою газової хроматографії (GC) для визначення жирнокислотного складу в 30 індивідуальному насінні M2 на рослину. Мутантна рослина CA05-6362-263 демонструвала фенотип з високим вмістом олеїнової кислоти, і була названа 29066.

Таблиця 1

Демонструє метод мутагенезу, що використовується для кожної мутантної лінії за винаходом, нуклеотидна послідовність і амінокислотна послідовність укороченого білка олеат-десатурази

Лінія	Метод мутагенезу	Розмір вставки в парах основ	Нуклеотидне положення вставки в OLD-кодуючій ділянці	Мутантна нуклеотидна послідовність за винаходом	Послідовність передбаченого укороченого білка OLD
29065	Рентгенівське опромінення для насіння	785	310	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:1
29066	5 % EMS-ін'єкція в квіткові головки з подальшим рентгенівським опроміненням зібраного насіння	4872	201	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:2

Приклад 2

Аналіз жирнокислотного складу жирних кислот олії з насіння за допомогою газової хроматографії

Насіння соняшника розрізали по сагітальній осі і вміщували в 2-мл скляні пробірки, що містять метанол, толуол, диметоксипропан і сірчану кислоту в співвідношенні 66:28:4:2. Пробірки закривали і інкубували протягом однієї години при 80 °С. Їм давали можливість охолодитися при кімнатній температурі і потім додавали 1 мл гептану (Garces and Mancha (2003) Analytical Biochemistry 317:247-254). Метиллові ефіри жирних кислот, присутні у верхній фазі (гептан) відділяли на газовому хроматографі Agilent 6890 за допомогою автоматичного пристрою для відбору зразків Model 7683B. Температура ін'єкції становила 240 °С, а також використали хроматографічну колонку Durabond 15 метрів довжиною з внутрішнім діаметром 250 мкм і 250 мкм плівку (J & W Scientific) при 200 °С. Газ H₂ використали як робочий газ під тиском 9,56 фунтів/кв. дюйм, з швидкістю потоку 1,7 мл/хв., і з середньою швидкістю 69 см/сек. Метилловий ефір детектували за допомогою детектора іонізації полум'я (FID) при 300 °С. Результати інтегрували і аналізували з використанням програмного забезпечення Chem32 Agilent Technologies. Відносні кількості кожної жирної кислоти вимірювали по відношенню до стандартного розчину метилованих жирних кислот (Alltech).

У Таблиці 2 представлені аналізи жирнокислотного складу, що проводяться за допомогою газової хроматографії на зразках насіння з мутантних рослин за винаходом.

Таблиця 2

Лінія	% жирних кислот			
	P	S	O	L
29065	2,9	2,7	93,3	1,1
29066	4,4	3,7	90,6	1,3

P: пальмітинова кислота; S: стеаринова кислота; O: олеїнова кислота; L: лінолева кислота

Таблиця 3. Порівняння рівня олеїнової кислоти (%) насіння соняшника з гомозиготних рослин F2 (Hm) для мутацій 29065 і 29066 в порівнянні з гомозиготними рослинами F2 (Hm) для мутації "Первісток". Процентний вміст для обох, Hm 29065 і 29066, був значно вищим, ніж відповідні значення для Hm "Первісток".

Таблиця 3

Популяція	Гомозиготна мутація високого вмісту олеїнової кислоти	Середній процентний вміст олеїнової кислоти	Стандартне відхилення	n
20340 × 29065	29065	87,50	1,08	12
	"Первісток"	82,86	5,38	18
20340 × 29066	29066	87,91	2,56	114
	"Первісток"	86,26	2,64	90
20342 × 29065	29065	89,08	3,56	56
	"Первісток"	75,81	11,15	57
20342 × 29066	29066	88,90	2,17	37
	"Первісток"	87,17	2,08	41

n: кількість рослин F2, чий жирнокислотний склад аналізували за допомогою газової хроматографії

Приклад 3

Секвенування генів соняшника, які кодуєть поліпептид, який має активність олеат-десатурази

Для аналізу секвенування зразки тканини брали з кожного мутанта з високим вмістом олеїнової кислоти, виділяли геномну ДНК і розводили до базової концентрації 100 нг/мкл. З метою отримання кодуєчої послідовності повнорозмірної олеат-десатурази мутантів з високим вмістом олеїнової кислоти 29065 і 29066 і початкових ліній 29010 і HA89 (дикий тип), використали специфічні праймери, сконструйовані для гена. Їх використали для ампліфікації за допомогою ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) і отримання двох ДНК сегментів (амплікони), що перекриваються, які перекривали весь ген OLD. Послідовність сконструйованих праймерів показана нижче:

1-ий амплікон OLD1-F2
(705 п.о.) OLD1-R2

GAAAAGTCTGGTCAAACAGTCAACAT (SEQ ID NO:7)
CCGATGTCGGACATGACTATC (SEQ ID NO:8)

2-ий амплікон OLD1adv-F2 AAATACTTTAACAACACAGTGGGC (SEQ ID NO:9)
 (733 п.о.) OLD1-R3 CCAGAACCAGGACAACAGCCATTGTC (SEQ ID NO:10)

Всі праймери є специфічними для гена олеат-десатурази. Наступні концентрації використали для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в кінцевому об'ємі 25 мкл: 1X буфер (Invitrogen), 0,2 мм dNTP (GE Healthcare), 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 мкМ кожного праймера, 0,5 мкл Platinum Taq (5 Од/мкл) (Invitrogen) і 100 нг геномної ДНК. KLA-реакцію за допомогою ПЛР здійснювали на комп'ютерній системі GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer). Умови циклу: початкова стадія денатурації при 94 °C протягом 1 хвилини з подальшими 35 циклами, що складаються з 94 °C протягом 45 секунд, 57 °C протягом 45 секунд і 72 °C протягом 70 секунд, і кінцева стадія елонгації 72 °C протягом 10 хвилин.

У випадку двох мутантів, що виявили високий вміст олеїнової кислоти (29065 і 29066), продукт ампліфікації не можна було отримати з використанням праймерів OLD1-F2 і OLD1-R2. Це приводило до твердження, що мутанти мають великі сегменти ДНК, вставленої в ділянку, поміщену між цими праймерами, внаслідок мутагенної обробки за допомогою рентгенівського випромінювання. Це буде означати, що завдяки великому сегменту, фланкованому праймерами OLD1-F2 і OLD1-R2, продукту ампліфікації не отримають.

З метою встановлення нуклеотидної послідовності вставлених сегментів, генерували геномні бібліотеки для кожного з мутантів (29065 і 29066) з метою здійснення "хромосомної прогулянки" за допомогою ПЛР з використанням системи GenomeWalker™ Universal Kit Protocol-at-a-Glance (Clontech), відповідно до інструкцій виробника.

Використовуючи нуклеотидну послідовність гена олеат-десатурази ліній HA89 і 29010 як еталон, "хромосомну прогулянку" здійснювали як в 5'-напрямку, так і в 3'-напрямку смислового ланцюга кожного мутанта. Наступні специфічні праймери використовувалися для кожного з мутантів:

Мутант 29065

Перший раз	OLD1-Walk3'-F1	AACCACCCTTCACCATCGGCG (SEQ ID NO:11)
	OLD1-Walk3'-F2	ACCCGTTCTGTTCTCCTACGT (SEQ ID NO:12)
	OLD1-Walk5'-R1	AGTGGCAGGCGAAACGGTCA (SEQ ID NO:13)
	OLD1-Walk5'-R2	AGCCGAGAGTGAGAGTGACG (SEQ ID NO:14)
Другий раз	MUT29010HO-W2-5'-1	ATGATCGCAGTCCCCAAAAG (SEQ ID NO:15)
	MUT29010HO-W2-5'-2	CCAATCAGCCTACAATAACAA (SEQ ID NO:16)
	MUT29010HO-W2-3'-1	AAGGGACGAGTAAAGACGAG (SEQ ID NO:17)
	MUT29010HO-W2-3'-2	TCGTCGACCCATTGATAATC (SEQ ID NO:18)

Мутант 29066

Перший раз	OLD1-Walk3'-F1	AACCACCCTTCACCATCGGCG (SEQ ID NO:11)
	OLD1-Walk3'-F2	ACCCGTTCTGTTCTCCTACGT (SEQ ID NO:12)
	OLD1-Walk5'-R1	AGTGGCAGGCGAAACGGTCA (SEQ ID NO:13)
	OLD1-Walk5'-R2	AGCCGAGAGTGAGAGTGACG (SEQ ID NO:14)
Другий раз	MUTHA89HO-W2-5'-1	GGAAAACAGGGTTATTGGCA (SEQ ID NO:19)
	MUTHA89HO-W2-5'-2	CAACAAAGCACGCACCCACA (SEQ ID NO:20)
Третій раз	MUTHA89HO-W52-1	TCATGGTAGTCAACTCCCTC (SEQ ID NO:21)
	MUTHA89HO-W52-2	CGCTTTCTTTCTTCGGGCAA (SEQ ID NO:22)
	MUTHA89HO-W32-1	GCTAATCGTGATCCACAGGC

		(SEQ ID NO:23)
	MUTHA89HO-W32-2	GCCCCACGACACTTACCAGA
		(SEQ ID NO:24)
Четвертий раз	MUTHA89HO-W53-1	CCCAACTCTATATTTTCAAG
		(SEQ ID NO:25)
	MUTHA89HO-W53-2	ACTTGAAAGTTTGGTTTCGG
		(SEQ ID NO:26)
	MUTHA89HO-W33-1	AGGGAACGGGGCAACATTTG
		(SEQ ID NO:27)
	MUTHA89HO-W33-2	GCCGCCTAACGAGAGACTT
		(SEQ ID NO:28)

5 Два мікролітри кожного продукту, які отримували в результаті кожної ПЛР, аналізували за допомогою електрофорезу на агарозному гелі, і концентрацію ДНК оцінювали шляхом порівняння з маркером молекулярної маси Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Залишковий продукт ПЛР очищали з використанням Gel Wizard® SV (Promega) і Системи PCR Clean-Up System (Promega). Очищені ПЛР-продукти секвенували з використанням системи циклічного секвенування BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), відповідно до інструкцій виробника.

10 Файли секвенування олеат-десатурази, отримані для кожного амплікона, збирали з використанням Програми збирання послідовності CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Отримані внаслідок ДНК-послідовності олеат-десатурази порівнювали з послідовностями олеат-десатурази лінії HA89, депонованими в GenBank (реєстраційний номер AY802989) з використанням програми Clustal W версії 2.1 (<http://www.clustal.org>), ідентифікуючої нуклеотидні вставки, присутні в мутантах 29065 і 29066, які, як було продемонстровано, мають розмір 785 пар основ (п.о.) і 4872 п.о., відповідно. Крім того, аналіз мутантних послідовностей OLD і

15 відповідної послідовності дикого типу продемонстрував, що у випадку мутанта лінії 29065 вставка 785-п.о. була локалізована в нуклеотидному положенні 310 кодуючої ділянки гена OLD, в той час як вставка мутантної лінії 29066 розміром 4872 п.о. була локалізована в нуклеотидному положенні 201.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Advanta Semillas
Zambelli, Andres

<120> НУКЛЕОТИДНІ ПОСЛІДОВНОСТІ, ПІДДАНІ МУТАЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ ВСТАВКИ, ЯКА КОДУЄ УКОРОЧЕНІ БІЛКИ ОЛЕАТ-ДЕСАТУРАЗИ, БІЛКИ, СПОСОБИ І ЗАСТОСУВАННЯ

<130> truncated oleato desaturase

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 104

<212> БІЛОК

<213> Helianthus annuus

<400> 1

Met Gly Ala Gly Glu Tyr Thr Ser Val Thr Asn Glu Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15

Asp Arg Val Pro His Ala Lys Pro Pro Phe Thr Ile Gly Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu Thr Arg Ser Phe
35 40 45

Ser Tyr Val Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ala Val Leu Tyr His Ile
50 55 60

Ala Thr Thr Tyr Phe His His Leu Pro Thr Pro Leu Ser Ser Ile Ala
65 70 75 80

Trp Ala Ser Tyr Trp Val Val Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp
85 90 95

Val Ile Ala His Glu Cys Gly Leu
100

<210> 2

<211> 71

<212> БІЛОК

<213> Helianthus annuus

<400> 2

Met Gly Ala Gly Glu Tyr Thr Ser Val Thr Asn Glu Asn Asn Pro Leu
1 5 10 15

Asp Arg Val Pro His Ala Lys Pro Pro Phe Thr Ile Gly Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu Thr Arg Ser Phe
35 40 45

Ser Tyr Val Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ala Val Leu Tyr His Ile
50 55 60

Ala Thr Thr Cys Lys Phe Trp
65 70

<210> 3
 <211> 1922
 <212> ДНК
 <213> Helianthus annuus

<400> 3

```

atgggtgcag gagaatacac gtctgtgacc aacgaaaaca acccactcga tcgagtcocct      60
catgcaaaac cacccttcac catcgggcat ctgaaaaaag ccatcccacc aactgcttc      120
cagcggctgc taaccogttc gttctcctac gtgctgtctg acctcaccat aaccgctgtc      180
ctctaccaca ttgccaccac ctacttcac cactcccca cccctttgtc atccatcgca      240
tgggcctctt actgggtagt ccaaggctgc gtcctcacg gagtctgggt catcgccac      300
gaatgtggtc tgtgaaaaat ggtatgaaca tccaatacaa aactcaaaga ataacataaa      360
acacaagaga agcgacaaaa acgtgacaga aaactttatt atttaacca aaccgaaaaa      420
caccocccaa accctagatc tcaagaagat gagatctgtg taatacaatg aacaaataca      480
acagatcagt aagatctatt gactgagaaa acaaaataaa ccaaaaacat acacagagat      540
aacaagttct ttgaaacaca accgtgattt ctacaagaaa tcactaagac tatcggtga      600
gacaactccg gctggagaca gcaacaactg aagacaacag caacaattac tcagacaacg      660
gctgattaca gcgacaaata cgaacttgaa accctaactg cctgtaaaga accagagaaa      720
gatgaaaata taattgtgag agagtaataa ctagaaaaga attttggggg tgaacaagag      780
agaactgtgt gcgtaacaat tgaggattaa tcatagaaat atccagaacc tctcatttta      840
tatcagttgt tgaataaatt acactttagt ccaagagata tgttgatgat gatcgagtc      900
ccaaaagtt tcacaaacca ccctcagact tccagctatt ataaccaact cacgaacaaa      960
caataacaac cgtatatacc aatcagccta caataacaag cctaaagacg tatatccagc     1020
ccagtaaata aagagcccaa tcataacatg ttgcaacctg gatgacaacc caagcttgac     1080
atttttaaca tggtcaccat gcgttttagtg attatcaatg ggtcgacgac actgtgggct     1140
ttgtttccca ctcgctctta ctcgctccctt acttttcgtg gaaatatagt caccacgcc     1200
accattccaa cactggatca ctcgagcggg acgaggtttt cgtccocaaa tcccgatcga     1260
aagtcocgtg gtactogaaa tactttaaca acacagtggg ccgcattgtc agtatgttcg     1320
tcactctcac tctcggtgg cccttgtaact tagctttcaa tgtgtcgggc cgaccctatg     1380
accgtttcgc ctgccactac gtcccaacca gcctatgta caatgaacgt aaacgttacc     1440
agatagtcac gtccgacatc gggattgtta tcacatcggt catcctttat cgtgttgcta     1500
tggcaaaagg gttggtttgg gtgatttgcg tctatggggg tccgttgatg gttgtgaacg     1560
cgtttctggt gttgatcact tatcttcaac atactcacc tggcttgccg cattatgata     1620
gctcggaatg ggaatggtta aagggagcat tggcgacagt ggaccgtgac tatggtgtgt     1680

```

tgaacaaggt gttccatcat attaccgaca cacatgtggt gcaccatttg ttttcgacaa 1740
 tgccatcatta taatgcgatg gaagcacaga aggcgctgag accggtgctt ggggagtatt 1800
 atcggtttga caagaccccg ttttatgtag ccatgtggag agagatgaag gaatgtttgt 1860
 ttgtggagca agatgatgaa gggaaaggag gtgtgttttg gtacaagaat aagatgaatt 1920
 aa 1922

<210> 4
 <211> 6009
 <212> ДНК
 <213> Helianthus annuus

<220>
 <221> інші ознаки
 <222> (4156)..(4156)

<223> н являє собою а, с, г, або т

<400> 4

atgggtgcag gagaatacac gtctgtgacc aacgaaaaca acccaactga tcgagtcctt 60
 catgcaaaac cacccttcac catcggcgat ctgaaaaaag ccatcccacc aactgcttc 120
 cagcggctgc taaccgcttc gttctctac gtgtgtgtg acctcaccat aaccgctgtc 180
 ctctaccaca ttgccaccac ctgtaaattt tggtaatcag agagactaat tgcttttgtt 240
 ttctatttat catacacaga accacacatc aaaatcgaat acatatgaca cagcaaagag 300
 aaaaaaatgg aactaaccct aacaagataa gtctaaactt agataaggct aattcaaata 360
 aaacaattaa aaaataacta aacgtggcca gcaataact ccaatattcc cctcaagtt 420
 ggagcgtgca aatcttgcat cccaacttg acaagtaagc ttcgaagggtg ttgagctccc 480
 aacggttttg ttagcagatc agctatttgc atctttgaat cgatatgaag aggaaggatt 540
 tcttttgact ctaocgcttc tcgaacaaag aaacaatcca tctccacatg tttggttctt 600
 tcatggaaaa cagggttatt ggcaatgtgc ttgcgtgcc agttgtcaca aaatagcacg 660
 gttccatcat tttggggttc atcgagttct gccaaacaag cacgcacca caaaacttca 720
 ctgactgtgg atgccattgc cctgttattc agcttctgca gatgagcgag atactactga 780
 ctgcttcttt gacttccatg aaataggcgc tctccaagc aacaacaagt aacctgtaog 840
 agtagcgcct ggttgaaggg caacctaacc aatctgcac acagtatgac actaacctcg 900
 tccctccttc cttttgcaac aagattcctt gccctggag ccgccttcaa gtagcggagc 960
 accogaaccg cggcatccaa atggttttgt cgtgggtctc ccacgaattg gctaaggaca 1020
 tttacggaat aagtaatgtc tggctgtgtt gcctgtagg acaacaatct tccaaccagt 1080
 ctctgtact tgttggcatc aacottttgt tctcttccc ctttatcaag ctttagagtt 1140

tgttccatag gaaacccgct cggacgacat ccagtgagac cacaatcctc caaaatatcg	1200
agcgtatatt ttctttggct aagaacccaa ccaccttttg ttcgtgccac ttcgatgcct	1260
aaaaagtatt ttaatggacc caagtctttg atgctgaact gatcatgaag ttgagatttt	1320
acaaaacgaa tcctctcggt attattgcct accacgatga cgtcatccac gtaaattaaa	1380
gcgctacat acgtctcgcc ccttttgtaa atgaacaatg aataatcggc ttttgattga	1440
gaaaaacca atgctaacaa cgcttttgta aatttggtgt accagttgcg cgaggcttgc	1500
ttgagaccgt atattgactt tctaaggcgg cactctcgag tctcgggtctc tttcgaaaaac	1560
ccttgcgga gcttcatata cacctcttct tcgaggtcac catgtaagaa cgcgttgttg	1620
acatcaagtt ggtgtatgat ccagtctctt tttaacggcta aagtgagtag agacctcaca	1680
gtgaccagct ttgcaactgg agcaaacgtg tcatggtagt caactccctc caactgtgtg	1740
aaccctttg caaccagtct ggctttgtac ctttcgactt gaccatttgg cttgtattta	1800
actttgtata cccatttggg atcaatcgct ttctttcctt cgggcaactt ttcaagtgtc	1860
caggttccat ttcgttccaa ggcctttatt tcgtttttca ttgcctctcg ccacctgtca	1920
tcctgtgtaa gcttcgtaaa aatttttcgg ctcacatcatg gacgtgatgg ccgcaagaaa	1980
agctttatgg ttatttgaaa atttgtcata aggagatgta attggcaaga ggatgtaccg	2040
tagaggagcc ttgatcggag tccgggtgtg catggttgac tgacgggggg agctttacgt	2100
ggtagtcttt aaacogagct ggcggaactc gtgatcgttg cgagggtcgc aacattgggc	2160
tcgttggttg ttcttggggc tcggtcctgg atgggctcgc atcttcaact gacctatgtg	2220
tcaccaactg ttcttcgtca ttgttaggcc cactgttttc ggcattttca gattgtattg	2280
gcccaatata atcatcactt tcaagatcaa tttcgattgg gcccaactct atattttcaa	2340
gaaaatcacc tcccaactca tttctttggc cactgttcac gtgggtatta tcatgaccaa	2400
ctttgtgatt ttgttggaac tcatttaata tttcttcac tccactatga cttgaaagtt	2460
tggtttcggg tgaaaacggg aatgtttctt caacgaactt aacatccga ctaacaataa	2520
ttttcttctt ttccaaatca tagattttgt accctttcgt cccaaaagga tatccaagaa	2580
acaaccctgc ttttctctt ggagcgaaat tatccccgat tcgtttcggg attccaaaaa	2640
tacgttaagc acccaaaaac ccgcatgtgg tcataaacag gttgtcgttt aaaaatgact	2700
tcatacgggg ttttgatatt gaggactttt gacggtaacc tattgatgat ataggcggcc	2760
gtcaagacac attccccca aaaccttatt ggtaagttgg cttcgaaacg aagtgcccg	2820
gcaatctcta gaaggtgtcg gtgctttctc tctactacc cttttgttg tggggtgtgc	2880
gggcaagtcg tttcgagttc aatgccccga tcaactgtaa atgttttcat gcgatttgag	2940
gtgaactcac ccccggtgt cgcattctgat tcgtttgaca ctcttcttgt attgcgtttg	3000

gattagattg caaaaactga ccaaaaaatc actcgcttca tttttatgcc ttattatata 3060
 aacccaaacg gcccgactaa aatcatcaac tatgggtgaga aaataactgc cagcagtgag 3120
 tgaaaacggt cgataaccac cccaaatgtc acagtgtatc atgtcaaaac aatcactagt 3180
 ttttattgaa cttgtttgaa atggcaatct agtcatttta gctttgacac acgaatcaca 3240
 aaaggaaggt ttcgaatcat tactagaaat gtttaaaaca tgaatacgtg acattttatc 3300
 atttgatggg tgtccaagtc ttctatgccg gttacttgaa gtcgttgacg ccatagctct 3360
 tcgatctttt cgcattggtc ccctctata aagtccccct ctgcacttac ccgttccaaa 3420
 tcaagttcct gtcctcaggc cctgtatgac aaagaaatca ggaaaaaacg tgacagcaca 3480
 ctgtaagtct ctcgtaggc ggctaattga caaaagggtg catttaaaat taggcacaaa 3540
 aagaactcct ttaattttta cccctccttt gaacaaatgt tgccccgttc ccttaaacag 3600
 ggacaacgtc ccatttagga attgtaacag gtgtctcctc attgttcaag gagagttttt 3660
 caagaaactc ccgaacacat gtcattgtat cgggtggctc cgtatccaga atccactcac 3720
 catcctcatt gattctacct gccatgtttg cctcgggtt gtcattggtt ttgttttgat 3780
 catcatgttt accaaacagc ttgttaaaca tctcactatg ttcattcgtt aatccaggta 3840
 ttttgcttgc ggtggactcg acaaggcggt ctttcggctt tgccgcttcc ttctttgtct 3900
 tcccgggcca ccattccgga tatccacca gtttaaaaca ccttcacga acatgtccat 3960
 cccgtccgca atgtgtgcaa tgaccctctt ggtaagtgtc gtgggctgt cagcatttag 4020
 cccaagtttt cttttgggc tgtggatcac gattagcagg ctgccaaagt tgaaaggctg 4080
 cggcttcggt cccagcgaca gttttcttcc cggttgcgat ggcccgtgc cttcgtcttt 4140
 ctgctacgaa gtgatnggt tctcctaggg acggcatggt ttctgtggcg agaactctgag 4200
 tgcgcatgac agaaaattct gcatctaacc ccattaaaaa ttcataaagc cgctcctttt 4260
 ctttaagatc cgtgattttc ttcccgaact cgcatttaca aagtcacag tcgcacgttg 4320
 ggagtgggaa gcaccgaatc caactcgtcc caaaaagcgc gcagcttggt gaaataagcc 4380
 gaaacggacg aaccctcttg acgcgtagt gtaattgact gtttcaactc gtatgttctc 4440
 tggggcgctt tcttttccaa aacgttcatg cagatcgttc cagatttcca gcgccgtatt 4500
 tgcgtacttc aactgttgc gtatttcctt ctccatggcg gtagttaacc acccttttat 4560
 catggcgtea cagcgcatcc actgcttgta acgcttatca gttttgtcgg gtttgggaag 4620
 ggttccatca acgaactcta tottgttttt ggcaaaaagg aaattcgtca tctcttgaat 4680
 ccaatccttg aaattgccat cggtgagagt ttcgtttacg tggagagttt ttggatagtc 4740
 tgacgggatgc aagtagcagg gcgaattcac gtcaggagca tcaccgccgc cggaagaacc 4800
 aggttggtct ccggccatga tcttcttgc attgatgatt ttaatgatga acgatctgct 4860

ctgataccat gtaaattttg gtcaatcaga gagactaatt gcttttggtt tctatttatt	4920
catacacaga accacacatc aaaatcgaat acatatacac agcaaagaga aaaaaatgga	4980
actaacccta acaagataag tctaaactta gataaggcta attcaaataa aacaattaaa	5040
aaataactaa acgtggccag caaataactc caatacttcc accacctccc cacccttttg	5100
tcattccatcg catgggcctc ttactgggta gtccaaggct gcgtcctcac cggagtctgg	5160
gtcatcgccc acgaatgtgg tcaccatgcg tttagtgttt atcaatgggt cgacgacact	5220
gtgggctttg ttctccactc gtctttactc gtcccttact tttcgtggaa atatagtac	5280
caccgccacc attccaacac tggatcactc gagcgggacg aggttttcgt ccccaaacc	5340
cgatcgaaag tcccgtggta ctcgaaatac tttacaaca cagtgggccc cattgtcagt	5400
atgttcgtca ctctcactct cggctggccc ttgtacttag ctttcaatgt gtcgggcccga	5460
ccctatgacc gtttcgcctg ccactacgtc ccaaccagcc ctatgtacaa tgaacgtaaa	5520
cgttaccaga tagtcatgtc cgacatcggg attgttatca catcgttcat cctttatcgt	5580
gttgctatgg caaaagggtt ggtttgggtg atttgctct atgggggttc gttgatggtt	5640
gtgaacgcgt ttctggtgtt gatcacttat cttcaacata ctaccctgg cttgccgc	5700
tatgatagct cggaaatggga atgggttaaag ggagcattgg cgacagtgga ccgtgactat	5760
ggtgtgttga acaagggtgtt ccattcatatt accgacacac atgtggtgca ccatttgttt	5820
tcgacaatgc ctcatataa tgcgatggaa gcacagaagg cgctgagacc ggtgcttggg	5880
gagtattatc ggtttgacaa gaacccgttt tatgtagcca tgtggagaga gatgaaggaa	5940
tggtttgttg tggagcaaga tgatgaaggg aaaggagggtg tggttttggt caagaataag	6000
atgaattaa	6009

<210> 5
 <211> 1137
 <212> ДНК
 <213> Helianthus annuus

<400> 5	
atgggtgcag gagaatacac gtctgtgacc aacgaaaaca acccactcga tcgagtcctt	60
catgcaaaac cacccttcac catcggcgat ctgaaaaaag ccattcccacc aactgcttc	120
cagcggctgc taaccgcttc gttctcctac gtgctgtctg acctcaccat aacgctgtc	180
ctctaccaca ttgccaccac ctacttccac cacctcccca cccctttgtc atccatcgca	240
tgggcctctt actgggtagt ccaaggctgc gtctcaccg gagtctgggt catcgccac	300
gaatgtggtc accatgcgtt tagtgattat caatgggtcg acgacactgt gggctttgtt	360

ctccactcgt ctttactcgt cccttacttt tcgtggaaat atagtcacca ccgccaccat 420
 tccaacactg gatcaactcga gcgggacgag gttttcgtcc ccaaatcccg atcgaaagtc 480
 ccgtgggtact cgaataactt taacaacaca gtgggccgca ttgtcagtat gttcgtcact 540
 ctcaactctcg gctggccctt gtacttagct ttcaatgtgt cgggccgacc ctatgaccgt 600
 ttcgcctgcc actaogtccc aaccagccct atgtacaatg aacgtaaacg ttaccagata 660
 gtcattgtccg acatcgggat tgttatcaca tcgttcatcc tttatcgtgt tgctatggca 720
 aaaggggttg tttgggtgat ttgcgtctat ggggttcctg tgatggttgt gaacgcgttt 780
 ctggtgttga tcaattatct tcaacatact caccctggct tgccgcatta tgatagctcg 840
 gaatgggaat ggtaaaggg agcattggcg acagtggacc gtgactatgg tgtgttgaac 900
 aaggtgttcc atcatattac cgacacacat gtggtgcacc atttgttttc gacaatgcct 960
 cattataatg cgatggaagc acagaaggcg ctgagaccgg tgcttgggga gtattatcgg 1020
 tttgacaaga ccccgtttta tgtagccatg tggagagaga tgaaggaatg tttgtttgtg 1080
 gagcaagatg atgaagggaa aggaggtgtg ttttggtaca agaataagat gaattaa 1137

<210> 6
 <211> 378
 <212> BIJOK
 <213> Helianthus annuus
 <400> 6

Met Gly Ala Gly Glu Tyr Thr Ser Val Thr Asn Glu Asn Asn Pro Leu
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Pro His Ala Lys Pro Pro Phe Thr Ile Gly Asp Leu Lys
 20 25 30
 Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Leu Thr Arg Ser Phe
 35 40 45
 Ser Tyr Val Leu Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ala Val Leu Tyr His Ile
 50 55 60
 Ala Thr Thr Tyr Phe His His Leu Pro Thr Pro Leu Ser Ser Ile Ala
 65 70 75 80
 Trp Ala Ser Tyr Trp Val Val Gln Gly Cys Val Leu Thr Gly Val Trp
 85 90 95
 Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp
 100 105 110
 Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Val Leu His Ser Ser Leu Leu Val Pro
 115 120 125
 Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His His Arg His His Ser Asn Thr Gly
 130 135 140

Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys Ser Arg Ser Lys Val
 145 150 155 160

Pro Trp Tyr Ser Lys Tyr Phe Asn Asn Thr Val Gly Arg Ile Val Ser
 165 170 175

Met Phe Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Phe Asn
 180 185 190

Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Arg Phe Ala Cys His Tyr Val Pro Thr
 195 200 205

Ser Pro Met Tyr Asn Glu Arg Lys Arg Tyr Gln Ile Val Met Ser Asp
 210 215 220

Ile Gly Ile Val Ile Thr Ser Phe Ile Leu Tyr Arg Val Ala Met Ala
 225 230 235 240

Lys Gly Leu Val Trp Val Ile Cys Val Tyr Gly Val Pro Leu Met Val
 245 250 255

Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro
 260 265 270

Gly Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Glu Trp Leu Lys Gly Ala
 275 280 285

Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu Asn Lys Val Phe His
 290 295 300

His Ile Thr Asp Thr His Val Val His His Leu Phe Ser Thr Met Pro
 305 310 315 320

His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Gln Lys Ala Leu Arg Pro Val Leu Gly
 325 330 335

Glu Tyr Tyr Arg Phe Asp Lys Thr Pro Phe Tyr Val Ala Met Trp Arg
 340 345 350

Glu Met Lys Glu Cys Leu Phe Val Glu Gln Asp Asp Glu Gly Lys Gly
 355 360 365

Gly Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Met Asn
 370 375

<210> 7
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер OLD1-F2

<400> 7
 gaaaagtctg gtcaaacagt caacat

26

<210> 8
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер OLD1-R2

 <400> 8

 ccgatgtcgg acatgactat c 21

 <210> 9
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер OLD1adv-F2

 <400> 9

 aaatacttta acaacacagt gggc 24

 <210> 10
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер OLD1-R3

 <400> 10

 cсагаассаг гасаасагсс attgtc 26

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер OLD1-Walk3'-F1

 <400> 11

 аассасссстт сассатсггс г 21

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер OLD1-Walk3'-F2

 <400> 12

 асccgttcgt tctcctacgt 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>

<223> праймер OLD1-Walk5'-R1

<400> 13

agtggcaggc gaaacggtca

20

<210> 14

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер OLD1-Walk5'-R2

<400> 14

agccgagagt gagagtgacg

20

<210> 15

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUT29010HO-W2-5'-1

<400> 15

atgatcgacg tccccaagaag

20

<210> 16

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUT29010HO-W2-5'-2

<400> 16

ccaatcagcc tacaataaca a

21

<210> 17

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUT29010HO-W2-3'-1

<400> 17

aaggcagcag тааагасг

20

<210> 18

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUT29010HO-W2-3'-2

<400> 18

tcgtcgacc attgataatc

20

<210> 19

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W2-5'-1

<400> 19

ggaaaaacagg gttattggca

20

<210> 20

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W2-5'-2

<400> 20

саасааагса сгсасссаса

20

<210> 21

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W52-1

<400> 21

tcatggtagt caactccctc

20

<210> 22

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W52-2

<400> 22

cgctttcttt ccttcgggca a

21

<210> 23

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W32-1

<400> 23

gctaatacgtg atccacaggc

20

<210> 24

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W32-2

<400> 24

gssacagaca cttaccaga

19

<210> 25

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W53-1

<400> 25

sscaactcta tattttcaag

20

<210> 26

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W53-2

<400> 26

acttgaaagt ttggttcgg

20

<210> 27

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер MUTNA89HO-W33-1

<400> 27

agggaacggg gcaacatttg

20

<210> 28

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> праймер MUTHA89HO-W33-2

<400> 28

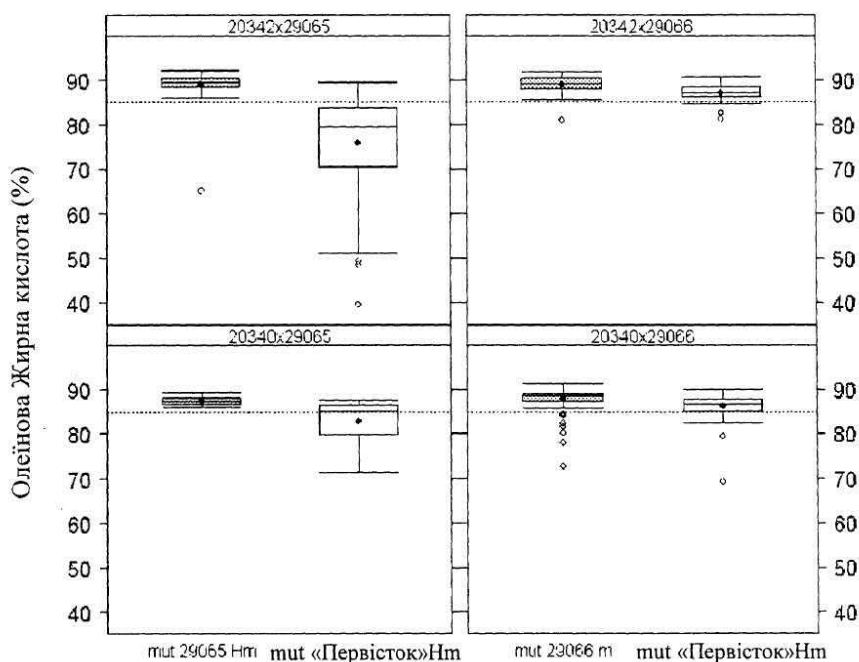
gccgcctaac gagagactt

19

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділена нуклеотидна послідовність, яка містить передчасний стоп-кодон в SEQ ID NO: 5, при цьому нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що має низьку ферментативну активність.
2. Послідовність за п. 1, де послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 і
- 10 SEQ ID NO: 2.
3. Послідовність за п. 1 або 2, де вказана нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4.
4. Укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що містить не більш ніж 110 перших амінокислот N-кінцевої ділянки олеат-десатурази дикого типу, при цьому олеат-десатурази
- 15 дикого типу SEQ ID NO: 6.
5. Білок за п. 4, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2.
6. Рослина соняшника, здатна виробляти насіння із вмістом олеїнової кислоти від 80 до 95 % відносно сумарного процентного вмісту жирних кислот насіння, при цьому рослина соняшника
- 20 включає ген олеат-десатурази, який має нуклеотидну послідовність, визначену в п. 1, при цьому нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що має низьку ферментативну активність.
7. Рослина за п. 6, де нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4.
- 25 8. Насіння соняшника, що має вміст олеїнової кислоти від 80 до 95 % відносно сумарного процентного вмісту жирних кислот в насінні, при цьому насіння соняшника включає ген олеат-десатурази, що включає нуклеотидну послідовність, визначену в п. 1, при цьому нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що має низьку ферментативну активність.
- 30 9. Насіння за п. 8, де нуклеотидна послідовність вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4.
10. Насіння за п. 8, де укорочений білок олеат-десатурази включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2.
11. Застосування насіння соняшника за будь-яким з пп. 8-10 для отримання олії.
- 35 12. Застосування за п. 11, де вказане насіння вибране з групи, яка складається з:
 - а) лінії 29065, яка має реєстраційний номер NCIMB 41733, і
 - б) лінії 29066, яка має реєстраційний номер NCIMB 41734.
13. Потомство насіння за будь-яким з пп. 8-10, яке **відрізняється** тим, що воно продукує вміст олеїнової кислоти від 80 до 95 % відносно сумарного процентного вмісту жирних кислот в насінні і включає передчасний стоп-кодон в гені, що має SEQ ID NO: 5, де вказаний передчасний стоп-кодон приводить до синтезу укороченого білка олеат-десатурази, що має низьку ферментативну активність.
- 40 14. Спосіб отримання рослини соняшника з високим вмістом олеїнової кислоти, який включає наступні стадії:
 - а) здійснення мутагенезу частини рослини соняшника;
 - б) отримання щонайменше одного потомства мутантної рослини, і
 - с) ідентифікація і селекція щонайменше однієї рослини, отриманої на стадії б), яка включає нуклеотидну послідовність, визначену в п. 1, при цьому нуклеотидна послідовність кодує укорочений білок олеат-десатурази соняшника, що має низьку ферментативну активність.
- 50 15. Спосіб за п. 14, де стадію мутагенезу здійснюють шляхом ін'єкції мутагенного агента в квіткову головку рослини.
16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що він додатково включає стадію опромінення насіння рентгенівськими променями.

17. Спосіб за п. 15, де мутагенний агент являє собою етиловий ефір метансульфокислоти в концентрації від 5 до 15 %.
18. Спосіб за п. 15, де стадію мутагенезу проводять шляхом опромінення насіння рентгенівськими променями.
- 5 19. Спосіб за п. 15, де укорочений білок олеат-десатурази включає послідовність, що складає не більш ніж 110 амінокислот N-кінцевої ділянки.
20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що послідовність укороченого білка олеат-десатурази вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2.
- 10 21. Спосіб отримання соняшникової олії з високим вмістом олеїнової кислоти, що включає екстракцію олії з насіння соняшника, вибраного з групи, яка складається з лінії 29065, яка має реєстраційний номер NCIMB 41733, і лінії 29066, яка має реєстраційний номер NCIMB 41734.



Фіг. 1