



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130792

(13) C2

(51) МПК

G01N 3/44 (2006.01)

G01N 21/01 (2006.01)

G01N 21/35 (2014.01)

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

A23L 33/12 (2016.01)

C12P 7/64 (2022.01)

C12N 15/82 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

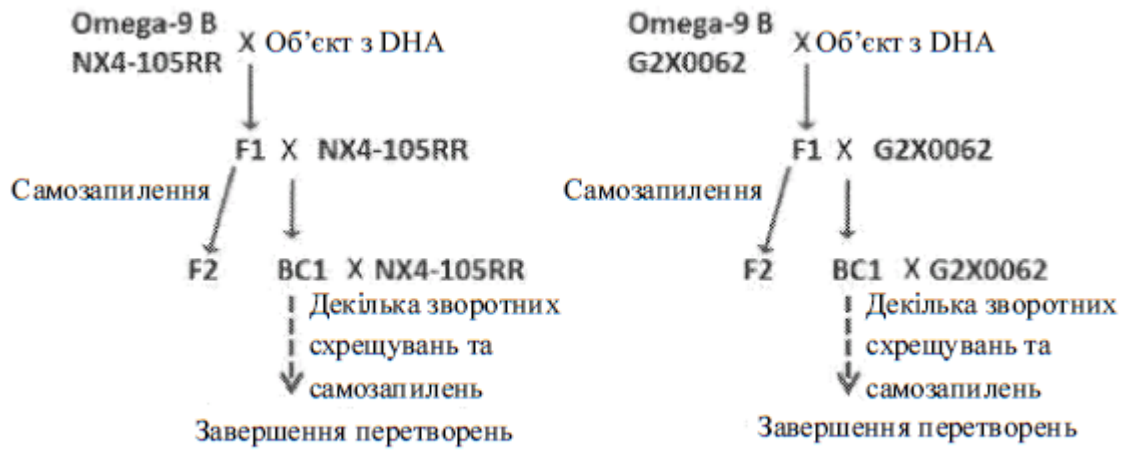
(21) Номер заявки:	а 2018 12022	(72) Винахідник(и):	Пудота Бала Бгаскар (US), Гашотт Даніель (US), Штольц Вірджинія (US), Уолш Теренс А. (US)
(22) Дата подання заявки:	22.05.2017	(73) Володілець (володільці):	КОРТЕВА АГРИСАЙЕНС ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	21.05.2026	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/347,728	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 20050250213 A1, 10.11.2005 US 20140203176 A1, 24.07.2014 US 20140359900 A1 04.12.2014 US 20050250212 A1, 10.11.2005 CHALERMKWAN SUKKASEM ET AL: "Rapid Chemometric Method for the Determination of 01eic and Linoleic Acid in Sunflower Seeds by ATR-FTIR Spectroscopy", CHIANG MAI J. SCI. LEOMARA FLORIANO RIBEIRO ET AL: "Prediction of linolenic and linoleic fatty acids content in flax seeds and flax seeds flours through the use of infrared reflectance spectroscopy and multivariate calibration", FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, May 2013 (2013-05) UA 41209 U, 12.05.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09.06.2016		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.01.2019, Бюл.№ 1		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	20.05.2026, Бюл.№ 20		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2017/033766, 22.05.2017		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ ПОЛІЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У НАСІННІ РОСЛИНИ**(57) Реферат:**

Пропоновано спосіб та/або систему, що мають переваги, які полягають в таких характеристиках, як економічна вигода, економія часу, інформативність та простота у використанні для здійснення інтрогресії ознак. Способи включають визначення наявності омега-

UA 130792 C2

3-жирних кислот (наприклад, докозагексаєнної кислоти або DHA; докозапентаєнної кислоти або DPA; альфа-ліноленової кислоти або ALA та ейкозапентаєнної кислоти або EPA) за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR). Застосування FTIR дозволяє проводити аналіз олії, що міститься в насінні, з використанням багатовимірної моделі FTIR в середньому ІЧ-діапазоні. Пропоновані спосіб та/або система забезпечують переваги неруйнівного аналізу з одержанням інформації для сприяння інтрогресії ознак та інших варіантів застосування в селекції.



Фіг. 1

Дана заявка претендує на пріоритет і перевагу на підставі попередньої заявки на патент США № 62/347728, поданої 9 червня 2016 р. Повний зміст даної заявки/даних заявки(заявок) у такий спосіб включено у дану заявку за допомогою посилання.

Передумови винаходу

Певні жирні кислоти в насінні, у тому числі омега-3-жирні кислоти (наприклад, докозагексаєнова кислота або DHA; докозапентаєнова кислота або DPA; альфа-ліноленова кислота або ALA та ейкозапентаєнова кислота або EPA), продовжують користуватись підвищеним попитом на ринку завдяки своїм корисним для здоров'я властивостям. Визначення профілів жирних кислот популяції насіння є трудомістким і вимагає багато часу. Загальноприйняті способи передбачають відбір зразків насіння й екстрагування компонентів, що становлять інтерес, із зразка насіння для аналізу. Дані способи приводять до руйнування насіння. Неруйнівний аналіз насіння є важливим, оскільки він забезпечує відбір об'єктів з необхідними ознаками, при цьому насіння зберігається життєздатним.

У патенті США № 6809819 розкрито спосіб визначення вмісту масел у насінні з використанням методики випарювального виявлення світлорозсіювання. Спосіб передбачає екстрагування масла зі зразка насіння із застосуванням розчинника, випаровування розчинника у потоці газу з утворенням частинок масла, спрямування світла у потік газу та частинок масла з метою забезпечення відбитого світла від частинок масла та визначення вмісту масел на основі відбитого світла.

У публікації патентного документа США № 2012/0092663 розкрито спосіб аналізу насіння або зерен за допомогою трансмісійної раманівської спектроскопії (TRS) з визначенням складу насіння, наприклад, вмісту білків та масел.

Кількісний аналіз вмісту масел або жирних кислот у насінні часто виконують за допомогою стандартних способів, таких як аналіз у ближньому інфрачервоному діапазоні (NIR), ядерна магнітно-резонансна візуалізація (NMR), екстракція в апараті Сокслета, прискорена екстракція розчинником (ASE), мікрохвильова екстракція та надкритична флюїдна екстракція. Після екстрагування масла компоненти жирних кислот гідролізують та дериватизують перед розділенням за допомогою газової або рідинної хроматографії. Дані способи вимагають багато часу та є непридатними для високопродуктивного скринінгу насіння.

Ознаки, які безперервно варіюють внаслідок генетичного впливу та впливу навколишнього середовища, зазвичай позначаються як "кількісні ознаки". Кількісні ознаки можуть відрізнятись від "якісних" або "дискретних" ознак залежно від двох факторів: різновидів впливу навколишнього середовища на експресію генів, які забезпечують безперервне розподілення фенотипів; та складного патерну сегрегації, викликаного полігенним успадкуванням. Ідентифікація однієї або більше ділянок геному, пов'язаних з експресією кількісної ознаки, забезпечила виявлення локусів кількісних ознак (QTL). QTL були використані для інтрогресії ознак або інших варіантів застосування в селекції на генетичному рівні. Однак у випадку інтрогресії ознак та інших варіантів застосування в селекції часто рішення необхідно приймати залежно від показників складу насіння рослин, а не генетичного аналізу.

Отже, існує необхідність у винаходах, які є придатними для забезпечення високопродуктивних, неруйнівних та/або здійснюваних у стислі терміни підходів для селекції рослин та/або інтрогресії ознак.

Стислий опис винаходу

Передбачено способи та/або системи, що мають переваги, які полягають в таких характеристиках, як економічна вигода, економія часу, інформативність та простота у використанні для здійснення інтрогресії ознак. Передбачені способи включають визначення наявності омега-3-жирних кислот (наприклад, докозагексаєнової кислоти або DHA; докозапентаєнової кислоти або DPA; альфа-ліноленової кислоти або ALA та ейкозапентаєнової кислоти або EPA) за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR). Застосування FTIR дозволяє проводити аналіз масла, що міститься в насінні, з використанням багатовимірної моделі FTIR в середньому ІЧ-діапазоні. Передбачені способи та/або системи можуть підтримувати цілісність насіння та надавати інформацію для сприяння інтрогресії ознак та інших варіантів застосування в селекції.

Даний винахід пов'язаний зі способами та системами для визначення наявності поліненасичених жирних кислот (PUFA) у частині рослини, прискорення інтрогресії у трансгенні рослини та/або усунення сайленсінгу генів у трансгенних рослин, при цьому інфрачервону спектроскопію з перетворенням Фур'є (FTIR) використовують без оцінювання фенотипів фактичних рослин. В одному аспекті передбачений спосіб визначення наявності поліненасичених жирних кислот (PUFA) у частині рослини. Даний спосіб передбачає:

(а) одержання зразка частини рослини;

(b) здійснення інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), що передбачає першу смугу поглинання від хвильового числа, яке становить приблизно 3800 см^{-1} , до хвильового числа, що становить приблизно 2600 см^{-1} ;

5 (c) порівняння результату FTIR-спектроскопії зі стадії (b) з існуючими еталонними результатами FTIR-спектроскопії; та

(d) прогнозування того, чи містить зразок щонайменше одну PUFA.

В одному варіанті здійснення передбачений спосіб додатково передбачає другу смугу поглинання від хвильового числа, що становить приблизно 7400 см^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 5400 см^{-1} . В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину. У додатковому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину каноли. В 10 іншому варіанті здійснення PUFA передбачає омега-3-поліненасичену жирну кислоту. У додатковому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена жирна кислота передбачає докозагексаєнову кислоту (DHA). В іншому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена жирна кислота вибрана з групи, що складається з докозагексаєнової кислоти (DHA), 15 докозапентаєнової кислоти (DPA), альфа-ліноленової кислоти (ALA), ейкозапентаєнової кислоти (EPA) та їх комбінацій. В іншому варіанті здійснення рослина вибрана з групи, що складається з каноли, сої, соняшника, бавовнику, Brassica, ріпаку, арахісу, кукурудзи, пшениці, рису, люцерни та вівса. В іншому варіанті здійснення рослина являє собою трансгенну рослину. В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає клітину трансгенної рослини. В іншому варіанті здійснення рослина являє собою рослину, одержану шляхом зворотного схрещування, першого 20 покоління, другого покоління, третього покоління, четвертого покоління, рослину, одержану шляхом зворотного схрещування, п'ятого покоління або їх комбінації.

В одному варіанті здійснення у способі вводять поправку на варіації базового рівня. В іншому варіанті здійснення у способі вводять поправку на перешкоди, пов'язані з випаровуванням води. У додатковому варіанті здійснення у способі вводять поправку на варіації базового рівня та перешкоди, пов'язані з випаровуванням води. В іншому додатковому варіанті здійснення кореляцію визначають за допомогою моделі з використанням даних, які розподіляються між набором для калібрування та набором для попередньої валідації за допомогою застосування генетичного алгоритму.

30 В іншому аспекті передбачена комп'ютеризована система для інтрогресії ознак рослин. Дана система містить:

(a) базу даних, що містить існуючі еталонні результати інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) для зразків, які містять щонайменше одну поліненасичену жирну кислоту (PUFA), і для зразків, що не містять PUFA;

35 (b) щонайменше один зразок частини рослини;

(c) виготовлений на замовлення тримач зразка, виготовлений із металевого сплаву, що не відбиває світло; та

(d) пристрій, здатний здійснювати вимірювання за допомогою FTIR-спектроскопії.

В одному варіанті здійснення результати FTIR-спектроскопії передбачають першу смугу поглинання від хвильового числа, що становить приблизно 3800 см^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 2600 см^{-1} . У додатковому варіанті здійснення результати FTIR-спектроскопії додатково передбачають другу смугу поглинання від хвильового числа, що становить приблизно 7400 см^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 5400 см^{-1} . В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину. У додатковому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину каноли. В іншому варіанті здійснення PUFA передбачає омега-3-поліненасичену жирну кислоту. У додатковому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена жирна кислота передбачає докозагексаєнову кислоту (DHA). В іншому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена жирна кислота вибрана з групи, що складається з докозагексаєнової кислоти (DHA), докозапентаєнової кислоти (DPA), альфа-ліноленової кислоти (ALA), ейкозапентаєнової кислоти (EPA) та їх комбінацій. В іншому варіанті здійснення рослина вибрана з групи, що складається з каноли, сої, соняшника, бавовнику, Brassica, ріпаку, арахісу, кукурудзи, пшениці, рису, люцерни та вівса. В іншому варіанті здійснення рослина являє собою трансгенну рослину. В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає клітину трансгенної рослини. В іншому варіанті здійснення рослина являє собою рослину, одержану 50 шляхом зворотного схрещування, першого покоління, другого покоління, третього покоління, четвертого покоління, рослину, одержану шляхом зворотного схрещування, п'ятого покоління або їх комбінації.

В іншому аспекті передбачено спосіб прискорення інтрогресії у трансгенні рослини та/або усунення сайленсingu генів у трансгенних рослин. Даний спосіб передбачає:

(a) одержання інформації за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) від частини рослини щодо ознаки, що становить інтерес;

(b) відбір насіння від рослини, від якої одержана частина рослини і яка експресує вказану ознаку, на підставі результатів FTIR, одержаних на стадії (a);

5 (c) висаджування насіння зі стадії (b);

(d) збирання насіння нащадків зі стадії (c);

та повторення стадій (a) - (d) протягом щонайменше трьох поколінь.

В одному варіанті здійснення результати FTIR-спектроскопії передбачають першу смугу поглинання від хвильового числа, що становить приблизно 3800 см^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 2600 см^{-1} . У додатковому варіанті здійснення результати FTIR-спектроскопії додатково передбачають другу смугу поглинання від хвильового числа, що становить приблизно 7400 см^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 5400 см^{-1} . В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину. У додатковому варіанті здійснення частина рослини передбачає насінину каноли. В іншому варіанті здійснення ознака, що становить інтерес, передбачає наявність щонайменше однієї поліненасиченої жирної кислоти (PUFA). У додатковому варіанті здійснення PUFA передбачає омега-3-поліненасичену жирну кислоту. В іншому додатковому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена кислота передбачає докозагексаєнову кислоту (DHA). В іншому варіанті здійснення омега-3-поліненасичена жирна кислота вибрана з групи, що складається з докозагексаєнової кислоти (DHA), докозапентаєнової кислоти (DPA), альфа-ліноленової кислоти (ALA), ейкозапентаєнової кислоти (EPA) та їх комбінацій. В іншому варіанті здійснення рослина вибрана з групи, що складається з каноли, сої, соняшника, бавовнику, Brassica, ріпаку, арахісу, кукурудзи, пшениці, рису, люцерни та вівса. В іншому варіанті здійснення рослина являє собою трансгенну рослину. В іншому варіанті здійснення частина рослини передбачає клітину трансгенної рослини.

25 Короткий опис графічних матеріалів

На фіг. 1 представлена схема селекції з інтрогресією, що використовується у представлених прикладах. Схрещування виконували між трансгенним об'єктом 035 з DHA (гомозиготна рослина T2) у ролі чоловічого батьківського організму та структурами з омега-9 у ролі жіночих батьківських організмів (NX4-105RR або G2X0062).

30 На фіг. 2 зображено ілюстративний спектр FTIR для насінини каноли, що містить необхідну кількість DHA (у даному випадку приблизно 5 % за вагою ліпідів у насініні).

На фіг. 3 зображено ілюстративний спектр FTIR для насінини каноли, що не містить DHA, яку можна виявити (тобто приблизно 0 % за вагою ліпідів у насініні).

Докладний опис даного винаходу

35 Насінина каноли є основним світовим джерелом корисного для здоров'я масла, зокрема через те, що вона містить порівняно високу кількість поліненасичених жирів і порівняно низьку кількість насичених жирів. Одержання більш корисних для здоров'я масел є основним пріоритетом харчової промисловості. З цією метою змішування інших корисних для здоров'я масел, наприклад низьконасиченого жирами масла каноли, з іншими корисними для здоров'я маслами, такими як DHA, стає більш загальноприйнятим. Омега-3-жирні кислоти (наприклад, докозагексаєнова кислота або DHA; докозапентаєнова кислота або DPA; альфа-ліноленова кислота або ALA та ейкозапентаєнова кислота або EPA) являють собою довголанцюгові поліненасичені жирні кислоти (PUFA), необхідні для багатьох біологічних функцій, і можуть бути пов'язані з нормальним розвитком головного мозку, нормальним функціонуванням серця та розвитком і функціонуванням очей. На сьогодні основним джерелом омега-3-жирних кислот є все більш доступна риба або риб'ячий жир.

Деякі дослідники почали модифікувати канолу у такий спосіб, що омега-3-жирні кислоти (наприклад, DHA) можуть бути утворені самою рослиною, при цьому зникає необхідність змішування та значно знижується вартість омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA). Однак такі спроби утворення омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA) у рослин зриваються через довготривалий процес селекції, інтрогресії ознак і відбору тих рослин, які є найбільш ефективними щодо утворення таких омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA). Передбачено системи та способи аналізу цілісного насіння неруйнівним чином із застосуванням інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), при цьому вміст омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA) у насінні може бути визначено до висаджування, у такий спосіб знижується число стадій (і, отже, необхідність сезонів посадки) для розвитку продуктивних ліній каноли, які експресують високі рівні омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA).

60 Передбачено інфрачервону спектроскопію з перетворенням Фур'є (FTIR) як швидкий та надійний неруйнівний спосіб відбору з метою сприяння прийняттю точних та узгоджених рішень щодо відбору насіння в популяціях з інтрогресією за допомогою кількісної оцінки вмісту омега-3-

жирних кислот (наприклад, DHA) у насінні рослин (наприклад, насінні каноли). Традиційні способи вимірювання таких властивостей потребують більш високих кількостей зібраного зерна, висаджування декількох тисяч популяцій з інтрогресією, що піддаються селекції, відбору зразків рослин через 3 тижні після висаджування, підтвердження зиготності в лабораторних умовах

5 щодо генів ознак, аналізу й обробки даних і виключення нульових та інших популяцій з метою збереження рослин лише з високим вмістом омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA). Системи та способи, передбачені в даному документі, дозволяють піддавати одне зерно неруйнівним чином скануванню/скринінгу FTIR з виключенням нульових об'єктів та ідентифікацією насіння, що містить необхідну кількість омега-3-жирних кислот (наприклад, DHA) до

10 висаджування/селекції. Отже, системи та способи, передбачені у даному документі, можуть прискорювати процес селекції, пов'язаний з інтрогресією у рослини, процес прийняття рішень, пов'язаних з сортуванням об'єктів та визначенням характеристик об'єктів, підвищувати ефективність та відчутно знижувати як вартість, так і час.

Фраза "приблизно", що використовується в даному документі, означає на 10 відсотків

15 більше або менше, ніж указане значення або діапазону значень, але передбачається, що вона не надає для будь-якого значення або діапазону значень лише це більш широке визначення. Передбачається, що кожне значення або діапазон значень, яким передуює термін "приблизно", також охоплюють варіант здійснення із заявленим абсолютним значенням або діапазоном значень.

Фраза "трансформований" або "трансформація", що використовується в даному документі, стосується введення ДНК в клітину. Фрази "трансформант" або "трансгенний" відносяться до клітин рослин, рослин тощо, які були трансформовані або піддані процедурі трансформації. Введена ДНК зазвичай знаходиться у формі вектора, що містить вставлену ділянку ДНК.

Фраза "трансгенна рослина", що використовується в даному документі, стосується рослини, геном якої було змінено в результаті стабільної інтеграції рекомбінантної ДНК. Трансгенна рослина включає рослину, відновлену з початково трансформованої клітини рослини та нащадків трансгенних рослин із більш пізніх поколінь або схрещувань трансформованої рослини.

Фраза "рекомбінантна ДНК", що використовується в даному документі, стосується ДНК, яка була розроблена генетичним шляхом та сконструйована за межами клітини, у тому числі ДНК, що передбачає ДНК, яка трапляється у природі, або cDNA, або синтетичної ДНК.

Фраза "генотип", що використовується в даному документі, стосується генетичної компоненти фенотипу і може бути опосередковано охарактеризована за допомогою маркерів або безпосередньо охарактеризована за допомогою секвенування нуклеїнових кислот. Придатні маркери включають фенотипову характеристику, метаболічний профіль, генетичний маркер або

35 деякий інший тип маркера. Генотип може визначати алель щонайменше для одного локусу генетичного маркера або гаплотип щонайменше для одного вікна гаплотипу. У деяких варіантах здійснення генотип може являти собою один локус, а в інших він може визначати повногеномний набір локусів. В іншому варіанті здійснення генотип може відображати

40 послідовність частини хромосоми, цілої хромосоми, частини геному або цілого геному.

Фраза "фенотип", що використовується в даному документі, стосується характеристик клітини або організму, що можна виявити і які являють собою прояв генної експресії.

Фраза "елітна лінія", що використовується в даному документі, стосується будь-якої лінії, що утворилась в результаті селекції та відбору щодо кращих агрономічних показників. Елітна

45 рослина являє собою будь-яку рослину з елітної лінії.

Фраза "рослина", що використовується в даному документі, включає дводольні рослини та однодольні рослини. Приклади дводольних рослин включають тютюн, Arabidopsis, сою, томат, папаю, канолу, соняшник, бавовник, люцерну, картоплю, виноград, голубиний горох, горох, Brassica, нут, цукровий буряк, ріпак, кавун, диню, перець, арахіс, гарбуз, редьку, шпинат, кабачок, броколі, білоголову капусту, моркву, кольорову капусту, селеру, пекінську капусту, огірок, баклажан та салат-латук. Приклади однодольних рослин включають кукурудзу, рис, пшеницю, цукрову тростину, ячмінь, жито посівне, сорго, орхідеї, бамбук, банан, комиш, лілії, овес, цибулю, просо та тритикале.

Термін "рослина", що використовується в даному документі, також включає цілу рослину та

55 будь-якого нащадка, клітину, тканину або частину рослини. Термін "частини рослини" включає будь-яку(будь-які) частину(частини) рослини, у тому числі, наприклад та без обмеження: насінину (включаючи зрілу насінину та незрілу насінину); живець рослини; рослинну клітину; культуру рослинних клітин; орган рослини (наприклад, пилок, зародки, квіти, плоди, пагони, листя, корені, стебла та експланти). Рослинною тканиною або органом рослини може бути

60 насінина, каліус або будь-яка інша група рослинних клітин, яка організована в структурну або

функціональну одиницю. Культура рослинних клітин або тканин може бути здатна до регенерації рослини, що має фізіологічні та морфологічні характеристики тієї рослини, з якої була одержана клітина або тканина, та регенерації рослини, що має фактично однаковий генотип з такою рослиною. На відміну від цього деякі рослинні клітини не можуть бути регенеровані з утворенням рослин. Регенеративними клітинами в культурі рослинних клітин або тканин можуть бути клітини зародків, протопласти, меристематичні клітини, калюс, пиллокс, клітини листків, пиляків, коренів, кінчиків коренів, шовковистих маточок, квітів, зерен, колосків, початків, листової обгортки або стебел.

Частини рослин включають придатні для збору частини та частини, придатні для розведення рослин-нащадків. Частини рослин, придатні для розведення, включають, наприклад та без обмеження: насінину; плід; живець; паросток; бульбу та кореневий паросток. Придатна для збору частина рослини може являти собою будь-яку придатну частину рослини, включаючи, наприклад та без обмеження: квітку; пиллокс; паросток; бульбу; листок; стебло; плід; насінину та корінь.

Фраза "ознака", що використовується в даному документі, відноситься до фізіологічної, морфологічної, біохімічної або фізичної характеристики рослини, або конкретного рослинного матеріалу, або клітини рослини. У деяких випадках ця характеристика є видимою для людського ока, наприклад розмір насінини або рослини, або може бути виміряна за допомогою біохімічних методик, у тому числі виявлення вмісту білку, крохмалю або масла в насінині або листі, або за допомогою спостереження метаболічного або фізіологічного процесу (наприклад, за допомогою вимірювання поглинання діоксиду вуглецю), або за допомогою спостереження рівня експресії гена або генів (наприклад, за допомогою нозерн-блот-аналізу, RT-PCR, аналізів експресії генів на мікрочипах), або систем експресії репортерних генів, або за допомогою сільськогосподарських спостережень, у тому числі стійкості до стресу, врожайності або стійкості до патогенів.

Незважаючи на те, що даний винахід було описано з посиланням на конкретні способи та варіанти здійснення, буде зрозуміло, що різні модифікації та зміни можуть бути виконані без відхилення від даного винаходу. Всі публікації, цитовані в даному документі, явно включені в даний документ за допомогою посилання з метою описати та розкрити композиції та методології, які можна застосовувати у зв'язку з даним винаходом. Всі цитовані патенти, заявки на патенти та інформація про послідовності у згадуваних веб-сайтах та базах даних громадського користування також включені за допомогою посилання.

Приклади

Приклад 1

Режим роботи FTIR - насіння каноли (*Brassica napus*) поміщали у виготовлені на замовлення 96-лункові планшети для мікротитрування. Матеріал планшети виготовляли з металевого сплаву, що не відбиває світло, із заглибленнями для того, щоб він вмщав круглу насінину. Завантажені планшети потім вносили у пристрій для здійснення інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) фірми Bruker, що містив Vertex Tensor 27, обладнаний планшетним зчитувачем HTS-XT. Детектор MCT (модель 316) охолоджували за допомогою рідкого азоту та інтенсивність всієї відбиваючої поверхні (золоту мішень) використовували для калібрування системи.

Сканування FTIR проводили в діапазоні хвильових чисел від 7500 см^{-1} до 600 см^{-1} з роздільною здатністю 8 см^{-1} та швидкістю обертання дзеркал 20 кГц. Одержували тридцять два послідовних зображення та для хемометричного прогнозування використовували середнє значення на зразок. Систему контролювали за допомогою програмного забезпечення OPUS 7.0. Калібрувальну модель будували в OPUS за допомогою технології Quant 2. Першу похідну з 17 гладкими точками та поправкою на множинне розсіювання (MSC) застосовували для утворення калібрувальних спектрів. Це калібрування валідували для одержання значення R^2 90,56, RMSEP 0,438 та RPD 3,27.

Моделі - окремі насінини каноли (*Brassica napus*) від різних сортів зважували і потім сканували за допомогою FTIR з подальшим визначенням вмісту в них масел та відносної кількості жирних кислот за допомогою способу розділення (наприклад, розкритого в публікації патенту США № 2014/0359900 A1). Потім реєстрували вміст DHA (ваг. % від ліпідів) та вводили в OPUS Quant2 (Bruker Optics Ltd).

Таблиця 1

Ілюстративний відносний склад жирних кислот (представлено середній %)

Назва зразка	C22:6 (%)	C18:1 (%)	C18:3 (%)	TSFA (%)	Масло (%)
Сегрегант DH12075	0,0	72,0	2,1	7,1	40,9
Середньостатистична лінія, вирощена в полі	0,0	71,8	1,8	6,8	42,0
Середньостатистична лінія, вирощена з використанням GH	0,0	73,3	2,0	7,0	33,2
Трансгенна лінія з PUFA-синтазою	1,5	65,1	5,8	7,5	35,6
Трансгенна лінія з низькою TSFA	0,0	76,8	2,8	4,0	38,8

В таблиці 1 представлено ілюстративний відносний склад вибраних жирних кислот (C22:6, C18:1 та C18:3, загальна кількість насичених жирних кислот) та вміст масел на основі кількісно визначених метилових естерів жирних кислот (FAME) відносно ваги насіння. Загальна кількість насичених жирних кислот (TSFA) являла собою суму C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0 та C24:0. Більшість насіння, включеного в модель, являла собою трансгенне насіння, одержане в результаті експресії PUFA-синтаз (2696 насінин). Насіння з низькою TSFA вирощували у теплицях із трансгенних об'єктів, що експресують десатуразу жирних кислот грибів. Таке насіння додавало більше варіабельності у вмісті TSFA, однак також підвищувало вміст C18:1. Запатентовані лінії каноли від Dow AgroSciences вибирали з метою підвищення варіабельності у відносному вмісті C18:1 та C18:3. Зрештою вирощене у полі та теплиці насіння також додавали до моделі з метою підвищення варіабельності у вмісті масел (від 25 % до 42 %). Усі ці варіації кількості та якості масел сприяли тому, що модель була більш надійною для подальшої інтрогресії ознаки DHA у стандартних або високоолеїнових лініях каноли.

На фіг. 2 зображено ілюстративний спектр FTIR для насінини каноли, що містить необхідну кількість DHA (у даному випадку приблизно 5 % за вагою ліпідів у насінині). На фіг. 3 зображено ілюстративний спектр FTIR для насінини каноли, що не містить DHA, яку можна виявити (тобто приблизно 0 % за вагою ліпідів у насінині).

Приклад 2

Схрещування виконували між трансгенним об'єктом 035 з DHA (гомозиготна рослина T2) у ролі чоловічого батьківського організму та структурами з омега-9 у ролі жіночих батьківських організмів (NX4-105RR або G2X0062), як проілюстровано на фіг. 1. Схрещування виконували між трансгенним об'єктом 035 з DHA (гомозиготна рослина T2) у ролі чоловічого батьківського організму та структурами з омега-9 від Dow AgroSciences у ролі жіночих батьківських організмів (комерційний сорт із вмістом омега-9 NX4-105RR від DAS або інбредний сорт каноли із вмістом омега-9 G2X0062 від DAS). Інбредний сорт G2 × 0062 було описано у патентах США №№ 8558065 та 8530726. Трансгенний об'єкт 035 з DHA було описано у публікації міжнародної заявки на патент WO 2015/081270.

Сканування за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) здійснювали, як викладено у прикладі 1 і такі результати FTIR показали, що ознака DHA в F1 проявляла себе як напівдомінантна порівняно з обома батьківськими організмами, а всі F1 були гемізиготними щодо ознаки DHA, як і очікувалось. Відповідно, результати FTIR використовували для прогнозування генетики ознак та відбору насіння DHA із зібраного насіння F1 до висаджування. Об'єкти, що відхиляються за DHA, які не містили DHA (оскільки схрещування являло собою процес ручного запилення), виключали до висаджування.

Крім того, насіння BC1F1 одержували в результаті схрещування гемізиготних рослин F1 із батьківськими рослинами з омега-9, як зображено на фіг. 1. Як і очікувалось, з огляду на менделівське успадкування у випадку одного локусу, 50 % насіння BC1F1 містило щонайменше 1 копію трансгена DHA (наявність DHA) і 50 % насіння BC1F1 не містило DHA, яку можна виявити. З огляду на ці зображення FTIR виконували прогнози щодо DHA, при цьому насіння BC1F1, що містить DHA, та насіння BC1F1, яке не містить DHA, висаджували окремо для молекулярного підтвердження трансгена DHA. Молекулярне підтвердження генів DHA здійснювали на підставі аналізів 5 трансгенів DHA, Pfa1, Pfa2, Pfa3, Het1 та Pat, як раніше розкрито у публікації міжнародної заявки на патент № WO 2015/081270 A1. У таблиці 2

представлені результати щодо насіння BC1F1, при цьому рослини, одержані з насіння BC1F1, що містять DHA, яку визначають за допомогою FTIR, були на 100 % позитивними після молекулярного підтвердження генів DHA, що валідувало результати скринінгу FTIR. Аналогічним чином рослини, одержані з насіння BC1F1, що не містять DHA, яку визначають за допомогою FTIR, були на 100 % негативними після молекулярного підтвердження генів DHA, що знову валідувало дані скринінгу за допомогою FTIR (дані не представлені). Відповідно, насіння BC1F1 з найвищим % DHA на підставі результатів FTIR відбирали для вдосконалення наступних поколінь з інтрогресією з одержанням покоління F2.

Таблиця 2

Узагальнення результатів сканування
FTIR насіння BC1F1 та молекулярне підтвердження генів DHA

Насіння BC1F1	Усе насіння, проскановане за допомогою FTIR	Насіння, що містить DHA, яку визначають за допомогою FTIR	Насіння, висаджене та взятє для зразка	Рослини з молекулярним підтвердженням генів DHA
035 x NX4-105RR	530	212	211	211
035 x G2X0062	530	136	123	123

Потім аналіз FTIR здійснювали щодо популяції F2 з метою прогнозування щодо DHA. Загалом 1174 насінини F2 сканували та висаджували у ролі фонового рівня для NX4-105RR і загалом 902 насінини F2 сканували та висаджували у ролі фонового рівня для G2X0062 (в результаті загалом 2076 насінин F2 для сканування FTIR та молекулярного підтвердження генів DHA). Результати підтверджували, що сканування FTIR сприяло відбору насіння, що містить найвищу кількість DHA, з метою збагачення популяції в гомозиготному стані та виключення ~50 % популяції F2 до висаджування. Відбір в F2 на підставі FTIR забезпечував зниження числа насінин, що підлягають висаджуванню, щонайменше на 75 %, що прискорювало весь процес інтрогресії/селекції і в той же час знижувало необхідну площу теплиці. Крім того, додаткові дані показали, що відбір позитивних щодо DHA трансгенних рослин може бути поліпшено завдяки відбору щодо вмісту DHA понад 0,75 % (виключення нульових об'єктів) на підставі сканування FTIR.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення наявності поліненасичених жирних кислот (PUFA) у насінні рослини, що містить щонайменше одну омега-3-поліненасичену жирну кислоту, вибрану з групи, що складається із докозагексаєнної кислоти (DHA), докозапентаєнної кислоти (DPA), ейкозапентаєнної кислоти (EPA), причому спосіб включає:

(a) одержання зразка, що містить одну або більше життєздатних насінин рослини;
(b) застосування детектора, охолодженого за допомогою рідкого азоту, для аналізу кожної з однієї або більше життєздатних насінин за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), що передбачає першу смугу поглинання від хвильового числа, яке становить приблизно 3800 cm^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 2600 cm^{-1} ;
(c) порівняння результату FTIR-спектроскопії етапу (b) з існуючими еталонними результатами FTIR-спектроскопії; та

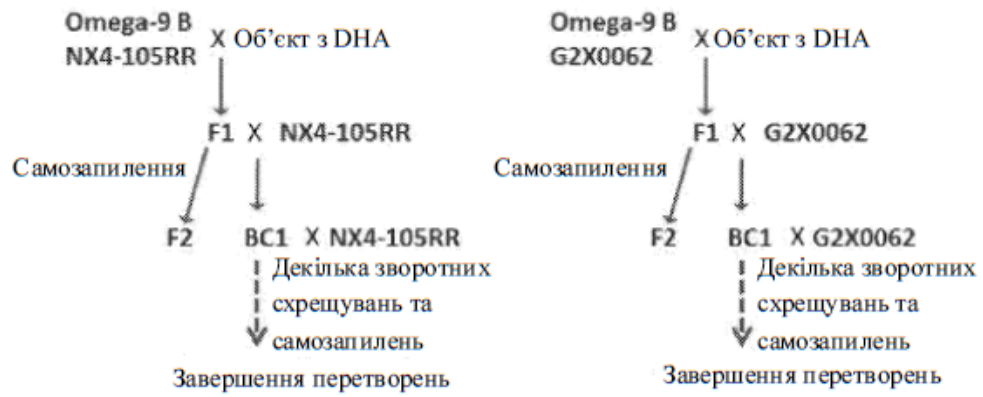
(d) прогнозування того, чи містить одна або більше насінин у зразку щонайменше одну PUFA, яка включає DHA, DPA або EPA, де насінини залишаються життєздатними для посіву після неруйнівного аналізу FTIR.

2. Спосіб за п. 1, який додатково передбачає другу смугу поглинання від хвильового числа, яке становить приблизно 7400 cm^{-1} , до хвильового числа, яке становить приблизно 5400 cm^{-1} .

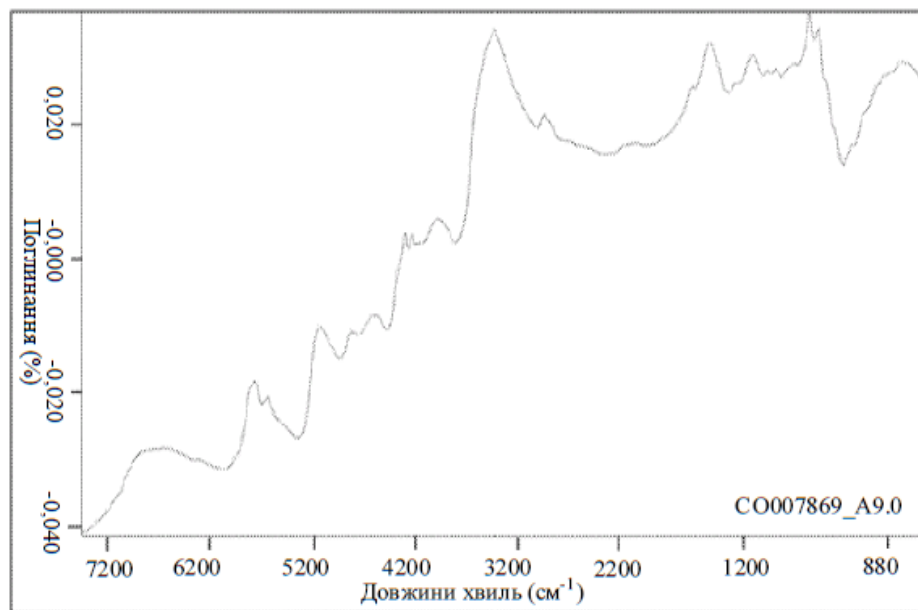
3. Спосіб за п. 1, де зразок передбачає насінину канולי.

4. Спосіб за п. 1, де насінини рослини вибрані з групи, що складається із насінин канולי, сої, соняшнику, бавовнику, Brassica, ріпаку, арахісу, кукурудзи, пшениці, рису, люцерни та вівса.

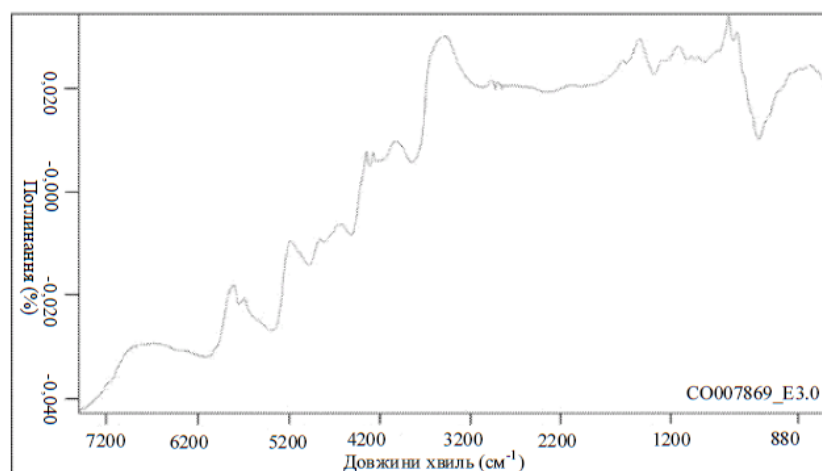
5. Спосіб за п. 1, де насінини походять з трансгенної рослини.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

