

Даний винахід стосується рослин озимого олієнасіньного рапсу (WOSR) і, зокрема, пари рослин озимого олієнасіньного рапсу, яка є особливо придатною до продукування гібридного насіння. Конкретніше, одна рослина такої пари є рослиною з чоловічою стерильністю завдяки наявності в її геномі гена чоловічої стерильності, у той час як інша рослина такої пари несе в собі ген відновлення фертильності, здатний відвернути дію гена чоловічої стерильності. Пара рослин WOSR за даним винаходом поєднує в собі здатність утворювати гібридне насіння, що характеризується оптимальною повною агрономічною потужністю, генетичною стабільністю і здатністю адаптуватися до різного генетичного підґрунтя.

Усі цитовані тут документи включені у даний опис шляхом посилання.

Фенотипічна експресія трансгена в рослині визначається як структурою самого гена, так і місцем його знаходження в геномі рослини. Водночас наявність трансгена в різних місцях генома рослини буде впливати на весь фенотип рослини різним чином. Успішне з боку агрономічного або промислового виходу надання рослині економічно привабливої риси шляхом генетичної маніпуляції може стати довготривалим процесом, залежним від багатьох факторів. Фактична трансформація і регенерація генетично трансформованих рослин є лише першими стадіями процесу селекції, який включає у себе поширене визначення генетичних характеристик, розмноження й оцінку у польових випробуваннях.

Олієнасіньний рапс (OSR: oilseed rape) (*Brassica napus*, AACC, $2n=38$) є природним гібридом, що утворився внаслідок міжвидової гібридизації капусти (*Brassica Oleracea*, CC, $2n=18$) і ріпи (*Brassica campestris*, AL, $2n=20$). Озимий олієнасіньний рапс сіють в останню декаду серпня і першу декаду вересня, а збирають у липні наступного року, враховуючи потрібний помірний період яровизації. Скороспілі сорти рапсу сіють наприкінці березня -початку квітня, а збирають із середини серпня аж до вересня. Основні сорти OSR, які вирощуються сьогодні, є низько- і високоерукокислотними різновидами. Двічі низькокислотні різновиди (00) мають низькі кількісні рівні (як правило, менше 1%) ерукових кислот (важко перетравлюваних людиною) і низькі рівні глюкозинолатів (які утворюють важко перетравний борошняний побічний продукт для тварин). Використовувані сьогодні різновиди (00) включають в число вироблюваних з них продуктів олію для споживання людиною і високобілкове борошно в корм тваринам. Промисловістю з цих культур використовують сировину для фармацевтичних і гідролітичних олій. Різновиди високоерукокислотного рапсу (HEAR: High erucic acid rape) вирощуються спеціально для використання ерукової кислоти, що в них міститься - у середньому 50-60% олії. Сорти HEAR вирощують, головним чином, для одержання ерукамідів - добавки, що знижує тертя і знаходить застосування у поліетановому виробництві. Невелика частина цієї сировини використовується для вироблення бегенілового спирту, який додається у воскоподібну сиру мінеральну олію для поліпшення її текучості.

Олієнасіньний рапс є двостатеву рослиною і, як правило, на 60-70% самозапильованим. Одержання гібридів і введення генетичних варіацій як основи для селекції традиційно залежало від адаптації такого природного феномену, як самонесумісність і цитоплазматична чоловіча стерильність. Штучні способи регулювання запилювання, такі як ручна емаскуляція або застосування гаметоцидів, не знайшли широкого застосування у схрещуванні OSR через їхню обмежену практичність і високу вартість відповідно.

Для продукування рослин з чоловічою або жіночою стерильністю були розроблені трансгенні способи, які являють собою привабливу альтернативу традиційним способам. В EP 0344029 описана система одержання ядерної чоловічої стерильності, за допомогою якої рослини трансформуються геном чоловічої стерильності, який містить, наприклад, ДНК, що кодує барназу під контролем специфічного промотору тапетуму РТА29, котрий при введенні його в рослину забезпечує селективну деструкцію клітин тапетуму. Трансформація тютюну і олієнасіньного рапсу таким химерним геном давала рослини з повністю відвернутим утворенням пилку [Mariani et al. 1990, Nature 347: 737-741].

Для відновлення фертильності в потомстві рослини з чоловічою стерильністю була розроблена система, за допомогою якої рослина з чоловічою стерильністю схрещувалася з трансгенною рослиною, яка несла ген відновлення фертильності, котрий після експресії був здатний інгібувати або відвертати активність гена чоловічої стерильності [Патенти США №5,689,041 і 5,792,929]. Такий ген відновлення фертильності розміщується під керуванням промотору, який спрямовує експресію принаймні в ті клітини, в котрих експресується ген чоловічої стерильності. В роботі [Mariani et al., 1992, Nature 357:384-387] було показано, що стерильність, кодована геном рТА29:барнази, може в олієнасіньному рапсі бути відновлена химерним геном рТА29:барстар (рТА29:barstar). В роботі [De Block and De Brouwer, 1993, Planta 189:218-225] описаний цитохімічний і гістохімічний аналіз інших виведених рослин *Brassica napus*, які містять химерний ген рТА29:барнази один або разом з рТА29:барстар.

Була успішно здійснена трансформація виду *Brassica* за допомогою цілого ряду способів, включаючи агробактеріальне інфікування, як описано, наприклад, в [EP 0,116,718 і EP 0,270,882], бомбардування мікрочастками [Chen et al., 1994, Theor. Appl. Genet. 88:187-192] і пряме поглинання ДНК [De Block et al. 1989, Plant Physiol. 914:694-701; Poulsen 1996, Plant Breeding 115:209-225].

Проте в жодному з вищеперелічених документів не висловлюється думок і припущень, які б збігалися з ідеєю, покладеною в основу даного винаходу.

Даний винахід стосується пари рослин WOSR, особливо підходящих для продукування гібридного насіння. Зокрема, винахід стосується першої трансгенної рослини WOSR або її насіння, клітин чи тканин, які містять інтегровану в її геном касету експресії, що містить ген чоловічої стерильності, і другої трансгенної рослини WOSR або її насіння, клітин чи тканин, які містять інтегровану в її геном касету експресії, що містить ген відновлення фертильності, і гібридного насіння, одержуваного схрещуванням першої і другої рослин, яке містить ген чоловічої стерильності і/або ген відновлення фертильності, інтегровані в її геном.

В одному з варіантів здійснення винаходу перша рослина WOSR або її насіння, клітини чи тканини містять касету експресії рTHW107. У кращому варіанті здійснення винаходу перша рослина WOSR або її насіння, клітини чи тканини містять подію MS-BN1.

В іншому варіанті здійснення винаходу друга рослина WOSR або її насіння, клітини чи тканини містять касету експресії рTHW1118. У кращому варіанті здійснення винаходу рослина WOSR або її насіння, клітини чи

тканини містять подію RF-BN1. В особливо кращому варіанті здійснення винаходу перша рослина WOSR містить подію MS-BN1, друга рослина WOSR містить подію RF-BN1, а одержане з них гібридне насіння містить як MS-BN1, так і RF-BN1 або тільки RF-BN1.

Даний винахід стосується трансгенного насіння WOSR або рослини, яка може бути вирощеною з такого насіння, геномна ДНК якого характеризується однією або обома такими рисами:

а) вищезазначена геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще більш кращому варіанті принаймні чотири і у найкращому - принаймні п'ять груп фрагментів рестрикції, вибраних серед:

i) однієї групи із двох фрагментів EcoRI, серед яких один має довжину від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2266 bp, і один має довжину більше 14 kbp;

ii) однієї групи із двох фрагментів EcoRV, серед яких один має довжину в межах від 1159 до 1700 bp, у кращому варіанті приблизно 1,4 kbp, і один має довжину більше 14 kbp;

iii) однієї групи із двох фрагментів HpaI, один з яких має довжину в межах від 1986 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1990 bp, і один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2229 bp;

iv) однієї групи із трьох фрагментів AflIII, один з яких має довжину в межах від 514 до 805 bp, у кращому варіанті приблизно 522 bp, один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2250 bp, і один має довжину від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2477 bp;

v) однієї групи із двох фрагментів NdeI, обидва завдовжки в межах від 5077 до 14057 bp, а у кращому варіанті один завдовжки приблизно 6500 bp, а один завдовжки приблизно 10kbp; причому кожний із фрагментів рестрикції є здатним гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 3942 bp, що містить послідовність РТА29-барнази, одержувану шляхом перетравлення фрагментом HindIII описаної тут плазміди рTHW107, і/або

b) зазначена геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще кращому - чотири групи фрагментів рестрикції, вибрані серед:

i) однієї групи з чотирьох фрагментів BamHI, серед яких один має довжину в межах від 805 до 1099 bp, у кращому варіанті приблизно 814 bp, один має довжину в межах від 1700 до 1986 bp, у кращому варіанті приблизно 1849 bp, один має довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2607 bp, і один має довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті приблизно 6500 bp;

ii) однієї групи з чотирьох фрагментів EcoRI, один з яких має довжину в межах від 805 до 1159 bp, у кращому варіанті приблизно 1094 bp, один має довжину в межах від 1986 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2149 bp, і два мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 7000 bp, і один має довжину приблизно 10 kbp;

iii) однієї групи з двох фрагментів EcoRV, серед яких обидва фрагменти мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 5,4 kbp, і один має довжину приблизно 8 kbp;

iv) однієї групи з трьох фрагментів HindIII, серед яких один має довжину в межах від 1700 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1969 bp, і два мають довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 2565 bp і один має довжину приблизно 2635 bp;

де кожний з цих фрагментів рестрикції здатний гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 2182 bp, що містить послідовність РТА29-барстар, одержувану шляхом перетравлювання фрагментом HpaI описаної тут плазміди рTHW118.

Даний винахід стосується насіння рослини WOSR або рослини, що може бути вирощена з такого насіння, а також стосується її клітин чи тканин, геномна ДНК яких має одну чи обидві такі риси:

а) ця геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, наприклад, принаймні чотири, у ще кращому варіанті - п'ять груп фрагментів рестрикції, вибраних із переліку, зазначеного вище в п. а), куди входять групи фрагментів рестрикції, описані вище в пп. а) i), ii), iii), iv) і v), і, таким чином, вибір може включати будь-яку комбінацію із i), ii), iii), iv) і v), наведених вище в п. а); і/або

b) геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще кращому варіанті принаймні чотири групи фрагментів рестрикції, вибраних із наведеного вище переліку в п. b), в який входять групи фрагментів рестрикції, описані вище в п. b) i), ii), iii) і iv), внаслідок чого вибір може включати будь-яку комбінацію серед пп. i), ii), iii) і iv), описаних вище в п. b).

Винахід стосується також насіння WOSR або рослин, вирощених з такого насіння, геномна ДНК яких характеризується однією або обома такими рисами:

с) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 260 до 300 bp, у кращому варіанті приблизно 280 bp, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 12 і SEQ ID No. 19 відповідно, і/або

d) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 195 до 235 bp, у кращому варіанті приблизно 215 bp, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з двома праймерами, які мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 23 і SEQ ID No. 41 відповідно.

Винахід стосується також насіння WOSR або рослин, вирощених з такого насіння, геномна ДНК яких характеризується однією з рис, описаних вище в пунктах а) і с), і/або рис, описаних вище в пунктах b) і d).

Винахід стосується насіння рослини WOSR або рослини, яка може бути вирощена з такого насіння, геномна ДНК яких характеризується однією або обома такими рисами:

а) геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у більш кращому варіанті принаймні чотири, і в найкращому варіанті п'ять груп фрагментів рестрикції, вибраних серед:

i) однієї групи із двох фрагментів EcoRI, серед яких один має довжину від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2266 bp, і один має довжину більше 14 kbp;

ii) однієї групи із двох фрагментів EcoRV, серед яких один має довжину в межах від 1159 до 1700 bp, у кращому варіанті приблизно 1,4 kbp, і один має довжину більше 14 kbp;

iii) однієї групи із двох фрагментів HpaI, один з яких має довжину в межах від 1986 до 2140 bp, у кращому

варіанті приблизно 1990 bp, і один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2229 bp;

iv) однієї групи із трьох фрагментів AflIII, один з яких має довжину в межах від 514 до 805 bp, у кращому варіанті приблизно 522 bp, один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2250 bp, і один має довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2477 bp;

v) однієї групи із двох фрагментів NdeI, обидва завдовжки в межах від 5077 до 14057 bp, а у кращому варіанті один завдовжки приблизно 6500 bp, і один завдовжки приблизно 10kbp;

де кожний із цих фрагментів рестрикції здатний гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 3942 bp, що містить послідовність PTA29-барнази, отримувану шляхом перетравлювання фрагментом HindIII описаної тут плазмиди pTHW107, і/або

c) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 260 до 300 bp, у кращому варіанті приблизно 280 bp, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 12 і SEQ ID No. 19 відповідно.

Даний винахід стосується насіння рослини WOSR, переважно рослини з чоловічою стерильністю або рослини, яка може вирощуватися із такого насіння, а також стосується їхніх клітин чи тканин, геномна ДНК яких характеризується тим, що вона є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще кращому варіанті - п'ять груп фрагментів рестрикції, вибраних серед вищеописаних груп, які включають у себе групи фрагментів рестрикції, описаних вище в пп. i), ii), iii), iv) і v), внаслідок чого вибір може включати у себе будь-яку комбінацію із наведених вище пп. i), ii), iii), iv) і v).

Даний винахід стосується також насіння рослини WOSR, або рослини, вирощеної з такого насіння, геномна ДНК яких характеризується однією або обома такими рисами:

b) геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще кращому варіанті чотири фрагменти рестрикції або групи фрагментів рестрикції, вибрані серед:

i) однієї групи з чотирьох фрагментів BamHI, де один фрагмент має довжину в межах від 805 до 1099 bp, у кращому варіанті приблизно 814 bp, один має довжину в межах від 1700 до 1986 bp, у кращому варіанті приблизно 1849 bp, один має довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2607 bp, і один має довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті приблизно 6500 bp;

ii) однієї групи з чотирьох фрагментів EcoRI, один з яких має довжину в межах від 805 до 1159 bp, у кращому варіанті приблизно 1094 bp, один має довжину в межах від 1986 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2149 bp, і два мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 7000 bp, і один має довжину приблизно 10 kbp;

iii) однієї групи з двох фрагментів EcoRV, серед яких обидва фрагменти мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 5,4 kbp, і один має довжину приблизно 8 kbp;

iv) однієї групи з трьох фрагментів HindIII, серед яких один має довжину в межах від 1700 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1969 bp, і два мають довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 2565 bp і один має довжину приблизно 2635 bp;

де кожний з цих фрагментів рестрикції здатний гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 2182 bp, що містить послідовність PTA29-барстар, одержувану шляхом перетравлювання фрагментом HpaI описаної тут плазмиди pTHW118; і/або

d) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 195 до 235 bp, у кращому варіанті приблизно 215 bp, за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції з двома праймерами, які мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 23 і SEQ ID No. 41 відповідно.

Даний винахід стосується насіння рослини WOSR, переважно рослини відновлення фертильності або рослини, яка може бути вирощеною з такого насіння, а також стосується їхніх клітин чи тканин, геномна ДНК яких є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три і в найкращому - чотири групи фрагментів рестрикції, вибраних серед описаних вище груп, що включають у себе групи фрагментів рестрикції згідно з переліченими вище пп. b) i), ii), iii) і iv), внаслідок чого вибір може включати будь-яку комбінацію серед цих пп. i), ii), iii) і iv).

Даний винахід стосується трансгенних рослин WOSR, клітин, тканин або насіння, які у кращому варіанті характеризуються обома рисами, описаними вище в пп. b) i/або d) відповідно.

Даний винахід також стосується трансгенних, переважно гібридних рослин WOSR з відновленою фертильністю, їхніх клітин, тканин або насіння, одержуваних шляхом схрещування рослини чоловічої стерильності з рослиною відновлення фертильності за даним винаходом, що характеризується відповідними рисами, описаними вище, внаслідок чого рослини з відновленою фертильністю, їхні клітини, тканини або насіння характеризуються як молекулярними особливостями рослини WOSR чоловічої стерильності, так і особливостями зазначеної вище рослини WOSR відновлення фертильності. Винахід стосується також трансгенних, переважно, гібридних рослин WOSR, їхніх клітин, тканин чи насіння, одержуваних шляхом схрещування рослини чоловічої стерильності з рослиною відновлення фертильності за даним винаходом, що характеризується молекулярними особливостями, згаданими вище, внаслідок чого гібридні рослини, їхні клітини, тканини або насіння характеризуються молекулярними особливостями вищезазначеної рослини WOSR відновлення фертильності.

Даний винахід стосується також насіння, депонованого в ATCC (Американській колекції типових культур) під номером доступу PTA-730, рослини, що вирощується із цього насіння, а також клітин або тканин рослини, вирощеної з цього насіння. Винахід стосується також рослин, що можуть отримуватися шляхом розмноження рослини WOSR, і/або схрещування з рослиною WOSR, вирощеною з насіння, депонованого в ATCC під номером доступу PTA-730.

Даний винахід стосується також способу одержання гібридного насіння WOSR, який включає у себе схрещування рослини WOSR чоловічої стерильності за даним винаходом з рослиною WOSR, що є відновлювачем фертильності, за даним винаходом.

Даний винахід стосується також рослини WOSR, її клітини, тканини або насіння, які містять рекомбінантну

ДНК, що включає у себе принаймні один трансген, інтегрований в частину хромосомної ДНК, котра характеризується послідовністю SEQ ID No.22, і/або рекомбінантну ДНК, що включає у себе принаймні один трансген, інтегрований в частину хромосомної ДНК, котра характеризується послідовністю SEQ ID No. 34.

Винаходом також пропонується спосіб одержання трансгенної клітини рослини WOSR або одержаної із неї рослини, який включає у себе інсерцію молекули рекомбінантної ДНК в частину хромосомної ДНК клітини WOSR, що характеризується послідовністю SEQ ID No. 22 і, в разі потреби, регенерування рослини WOSR із трансформованої клітини WOSR.

Винаходом пропонується також спосіб одержання трансгенної клітини рослини WOSR або рослини, одержаної з неї, який включає в себе інсерцію молекули рекомбінантної ДНК у частину хромосомної ДНК клітини WOSR, що характеризується послідовністю SEQ ID No. 34, і, в разі потреби, регенерування рослини WOSR із трансформованої клітини WOSR.

Даний винахід стосується також способу ідентифікації трансгенної рослини або її клітин чи тканин, що містять елітну подію MS-BN1 за даним винаходом, який (спосіб) включає в себе встановлення однієї чи обох таких характеристик геномної ДНК трансгенної рослини або її клітин чи тканин:

а) геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у більш кращому варіанті принаймні чотири, і в найкращому варіанті п'ять груп фрагментів рестрикції, вибраних серед:

i) однієї групи із двох фрагментів EcoRI, серед яких один має довжину від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2266 bp, і один має довжину більше 14 kbp;

ii) однієї групи із двох фрагментів EcoRV, серед яких один має довжину в межах від 1159 до 1700 bp, у кращому варіанті приблизно 1,4 kbp, і один має довжину більше 14 kbp;

iii) однієї групи із двох фрагментів HpaI, один з яких має довжину в межах від 1986 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1990 bp, і один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2229 bp;

iv) однієї групи із трьох фрагментів AflIII, один з яких має довжину в межах від 514 до 805 bp, у кращому варіанті приблизно 522 bp, один має довжину в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2250 bp, і один має довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2477 bp;

v) однієї групи із двох фрагментів NdeI, обидва завдовжки в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один завдовжки приблизно 6500 bp, і один завдовжки приблизно 10kbp;

де кожний із цих фрагментів рестрикції здатний гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 3942 bp, що містить послідовність РТА29-барнази, отримувану шляхом перетравлювання фрагментом HindIII описаної тут плазмиди рTHW107, і/або

с) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 260 до 300 bp, у кращому варіанті приблизно 280 bp, згідно з описаним тут протоколом PCR-ідентифікації двома праймерами, що ідентифікують вищезазначену елітну подію і мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 12 і SEQ ID No. 19 відповідно.

Даний винахід стосується також способу ідентифікації трансгенної рослини або її клітин чи тканин, що містять елітну подію RF-BN1 за даним винаходом, який (спосіб) включає в себе встановлення однієї чи обох таких характеристик геномної ДНК трансгенної рослини або її клітин чи тканин:

b) зазначена геномна ДНК є здатною давати принаймні дві, у кращому варіанті принаймні три, у ще кращому - чотири групи фрагментів рестрикції, вибрані серед:

i) однієї групи з чотирьох фрагментів BamHI, серед яких один має довжину в межах від 805 до 1099 bp, у кращому варіанті приблизно 814 bp, один має довжину в межах від 1700 до 1986 bp, у кращому варіанті приблизно 1849 bp, один має довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2607 bp, і один має довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті приблизно 6500 bp;

ii) однієї групи з чотирьох фрагментів EcoRI, один з яких має довжину в межах від 805 до 1159 bp, у кращому варіанті приблизно 1094 bp, один має довжину в межах від 1986 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2149 bp, і два мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 7000 bp, і один має довжину приблизно 10 kbp;

iii) однієї групи з двох фрагментів EcoRV, серед яких обидва фрагменти мають довжину в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 5,4 kbp, і один має довжину приблизно 8 kbp;

iv) однієї групи з трьох фрагментів HindIII, серед яких один має довжину в межах від 1700 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1969 bp, і два мають довжину в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті один має довжину приблизно 2565 bp і один має довжину приблизно 2635 bp;

де кожний з цих фрагментів рестрикції здатний гібридизуватися в стандартних умовах жорсткості з фрагментом 2182 bp, що містить послідовність РТА29-барстар, одержувану шляхом перетравлювання фрагментом HpaI описаної тут плазмиди рTHW118; і/або

d) геномна ДНК може використовуватися для підсилення фрагмента ДНК завдовжки від 195 до 235 bp, у кращому варіанті приблизно 215 bp, за описаним тут протоколом PCR-ідентифікації з двома праймерами, які ідентифікують вищезазначену елітну подію і мають нуклеотидні послідовності SEQ ID No. 23 і SEQ ID No. 41 відповідно.

Винахід також стосується комплекту для ідентифікації рослин, що містять елітну подію MS-BN1 за даним винаходом, який містить два PCR-зонди з нуклеотидними послідовностями SEQ ID No. 12 і SEQ ID No. 19.

Винахід також стосується комплекту для ідентифікації рослин, що містять елітну подію RF-BN1 за даним винаходом, який містить два PCR-зонди з нуклеотидними послідовностями SEQ ID No. 23 і SEQ ID No. 41.

Винахід також стосується комплекту для ідентифікації елітної події MS-BN1 і/або RF-BN1 у біологічних зразках, який містить принаймні один специфічний праймер або зонд, що має послідовність, яка відповідає (або є комплементарною) послідовності, котра має 80-100% ідентичність зі специфічною ділянкою MS-BN1, і/або принаймні один специфічний праймер або зонд, що має послідовність, яка відповідає (або є

комплементарною) послідовності, котра має 80-100% ідентичність зі специфічною ділянкою RF-BN1. У кращому варіанті здійснення послідовності зонда відповідає специфічній ділянці, яка містить частину 5'- або 3'-фланкувальної ділянки події MS-BN1 і/або RF-BN1. У найкращому варіанті специфічний зонд має (або є комплементарним) послідовності, що має 80-100% ідентичність з послідовністю ДНК рослини в межах SEQ ID No. 36 або SEQ ID No. 38 для MS-BN1 або з послідовністю ДНК рослини в межах SEQ ID No. 39 або SEQ ID No. 40 для RF-BN1.

У кращому варіанті здійснення комплект за даним винаходом у додаток до праймера, що специфічно розпізнає 5'- або 3'-фланкувальну ділянку подій MS-BN1 і/або RF-BN1, містить другий праймер, що специфічно розпізнає послідовність у сторонній ДНК подій MS-BN1 і/або RF-BN1, для застосування в протоколі PCR-ідентифікації. Комплект за даним винаходом у кращому варіанті містить два (або більше) специфічних праймери, один із яких розпізнає послідовність на 3'-фланкувальній ділянці подій MS-BN1 і/або RF-BN1, а в найкращому варіанті - послідовність на ділянці SEQ ID No. 36 або SEQ ID No. 38 ДНК рослини для події MS-BN1 або послідовності SEQ ID No. 39 чи SEQ ID No. 40 ДНК рослини для події RF-BN1, а інший розпізнає послідовність у сторонній ДНК події MS-BN1 і/або RF-BN1 відповідно. В особливо кращому варіанті здійснення винаходу праймер, що розпізнає послідовність ДНК рослини на 5'-фланкувальній ділянці MS-BN1, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 19. Зокрема, праймер, що розпізнає послідовність ДНК рослини на 5'-фланкувальній ділянці події MS-BN1, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 19, а праймер, що розпізнає сторонню ДНК події MS-BN1, містить описану тут нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 12. В особливо кращому варіанті здійснення винаходу праймер, що розпізнає послідовність ДНК рослини на 5'-фланкувальній ділянці події RF-BN1, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 41. Зокрема, праймер, що розпізнає послідовність ДНК рослини на 5'-фланкувальній ділянці події MS-BN1, містить нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 41, а праймер, що розпізнає сторонню ДНК події RF-BN1, містить описану тут нуклеотидну послідовність SEQ ID No. 23.

Способи і комплекти, що охоплюються даним винаходом, можуть використовуватися для різноманітних цілей і, зокрема, але не обмежуючись лише ними, для ідентифікації подій MS-BN1 і/або RF-BN1 у рослинах, рослинному матеріалі або в продуктах, таких як, але не

обмежуючись лише ними, харчові продукти для людей і корм для худоби (свіжих або оброблених), що містять матеріал рослини або походять з нього. Способи і комплекти за даним винаходом додатково або як альтернатива можуть використовуватися для ідентифікації матеріалу трансгенної рослини з метою розрізнення між трансгенним і нетрансгенним матеріалом. Додатково або як альтернатива способи і комплекти за даним винаходом можуть використовуватися для визначення якості (тобто відсотка чистого матеріалу) матеріалу рослини, що містить подію MS-BN1 і/або RF-BN1.

Конкретні варіанти здійснення даного винаходу викладені в залежних пунктах поданої тут Формули винаходу.

Скорочений опис креслень

Докладний опис винаходу, який подано тут лише як приклад, що не несе з собою жодних обмежень даного винаходу, може бути зрозумілий разом з доданими кресленнями, де

Фіг. 1. Плазмідна карта pVE113.

Фіг. 2. Рестрикційна карта, отримана після перетравлення геномної ДНК події MS-BN1.

Порядок завантажування гелю, що піддавався аналізу за методом Саузерн-блотінгу: доріжка 1 - ДНК події MS-BN1, перетравлена фрагментом EcoRI; доріжка 2 - ДНК події MS-BN1, перетравлена фрагментом EcoRV; доріжка 3 - ДНК події MS-BN1, перетравлена фрагментом HpaI; доріжка 4 - ДНК події MS-BN1, перетравлена фрагментом AflIII; доріжка 5 - ДНК події MS-BN1, перетравлена фрагментом NdeI; доріжка 6 - ДНК нетрансгенної WOSR, перетравлена фрагментом BamHI; доріжка 7 - нетрансгенна WOSR, перетравлена фрагментом BamHI + контрольна плазмідна pTHW107 ДНК, перетравлена фрагментом BamHI.

Фіг. 3. Рестрикційна карта, отримана після перетравлення геномної ДНК події RF-BN1.

Порядок завантажування гелю, що піддавався аналізу за методом Саузерн-блотінгу: доріжка 1 - ДНК події RF-BN1, перетравлена фрагментом BamHI; доріжка 2 - ДНК події RF-BN1, перетравлена фрагментом EcoRI; доріжка 3 - ДНК події RF-BN1, перетравлена фрагментом EcoRV; доріжка 4 - ДНК події RF-BN1, перетравлена фрагментом HindIII; доріжка 5 - ДНК нетрансгенної WOSR, перетравлена фрагментом BamHI; доріжка 6 - нетрансгенна WOSR, перетравлена фрагментом BamHI + контрольна плазмідна pTHW118 ДНК, перетравлена фрагментом BamHI.

Фіг. 4. PCR-аналіз різноманітних ліній за протоколом PCR-ідентифікації події MS-BN1.

Порядок завантажування гелю: доріжка 1 - зразок ДНК із рослини OSR, що містить трансгенну подію MS-BN1; доріжка 2 - зразок ДНК із рослини OSR, що містить іншу трансгенну подію; доріжка 3 - ДНК із OSR дикого типу; доріжка 4 - негативний контрольний зразок (вода); доріжка 5 - молекулярно-масовий маркер (зі сполученою циклічною структурою завдовжки 100 бр).

Фіг. 5. PCR-аналіз різноманітних ліній за протоколом PCR-ідентифікації події RF-BN1,

Порядок завантажування гелю: доріжка 1 - зразок ДНК із рослини OSR, що містить трансгенну подію MS-BN1; доріжка 2 - зразок ДНК із рослини OSR, що містить іншу трансгенну подію; доріжка 3 - ДНК із OSR дикого типу; доріжка 4 - негативний контрольний зразок (вода); доріжка 5 - молекулярно-масовий маркер (зі сполученою циклічною структурою завдовжки 100 бр).

Докладний опис винаходу

Використовуваний тут термін «ген» стосується будь-якої послідовності ДНК, що містить декілька функціонально зв'язаних фрагментів ДНК, таких як промотор і нетрансльовану 5'-ділянку (5'- UTR: untranslated region), які разом утворюють промоторну ділянку; кодувальну ділянку (яка може кодувати або не кодувати на білок); і нетрансльовану 3'-ділянку (3'- UTR), що містить сайт поліаденілювання. Зазвичай в клітинах рослин ділянка 5'- UTR, кодувальна ділянка і ділянка 3'- UTR транскрибуються в РНК, яка у випадку гена, що кодує білок, трансльовується в цей білок. Ген може включати у себе додаткові фрагменти ДНК, наприклад, інтрони. У даному описі під терміном «генетичний локус» мається на увазі місце знаходження гена в геномі рослини.

Термін «химерний» по відношенню до гена або послідовності ДНК використовується для зазначення того, що даний ген або послідовність ДНК містить принаймні два функціонально релевантних фрагменти ДНК (такі як, промотор, ділянка 5'- UTR, кодувальна ділянка, ділянка 3'- UTR, інтрон), які звичайно не зв'язуються один з одним і походять, наприклад, із різних джерел. Термін «сторонній» при визначенні гена або послідовності ДНК по відношенню до того чи іншого виду рослин використовується для зазначення того, що даний ген або дана послідовність ДНК звичайно у даному виді рослин є відсутніми або за природних умов їх немає у даному генетичному локусі даного виду рослин. Термін «стороння ДНК» використовується тут для визначення послідовності ДНК, вбудованої в геном рослини в результаті трансформації. Термін «трансформувальна ДНК» стосується молекули рекомбінантної ДНК, застосовуваної для трансформування. Трансформувальна ДНК зазвичай містить один «ген, на який звернена увага» або «важливий ген» (наприклад, химерний ген), здатний наділяти специфічною характеристикою або специфічними характеристиками трансформовану рослину. Термін «молекула рекомбінантної ДНК» застосовується для демонстрування того факту, наприклад, що ізольована молекула нуклеїнової кислоти може бути ДНК і може одержуватися у рекомбінантний чи інший спосіб.

Використовуваний тут термін «трансген» стосується важливого гена, вбудованого в геном рослини. Терміном «трансгенна рослина» визначається рослина, яка містить принаймні один трансген у геномі всіх її клітин.

Стороння ДНК, присутня в рослинах за даним винаходом, у кращому варіанті містить два важливих гени, конкретніше - або ген чоловічої стерильності і ген гербіцидостійкості, або ген відновлення фертильності і ген гербіцидостійкості.

Термін «ген чоловічої стерильності» використовується тут для визначення гена, який при експресії в рослині надає цій рослині властивості бути неспроможною продукувати схоже, життєздатне насіння. Як приклад гена чоловічої стерильності можна назвати ген, що містить послідовність ДНК, котра кодує барназу під керуванням промотору, що спрямовує експресію в клітинах тапетуму. Зокрема, згідно з даним винаходом, геном чоловічої стерильності є описана тут «TA29-барназа».

Термін «ген відновлення фертильності» застосовується тут для визначення гена, який при експресії в рослині, що містить ген чоловічої стерильності, здатний запобігати фенотипічній експресії гена чоловічої стерильності і, таким чином, відновлювати плодоносність даної рослини. Зокрема, ген відновлення фертильності містить ДНК, що кодує білок або поліпептид, здатний запобігати фенотипічній експресії гена чоловічої стерильності під керуванням промотору, що спрямовує експресію принаймні в тих клітинах, в яких експресується ДНК чоловічої стерильності. Наприклад, згідно з даним винаходом геном відновлення фертильності є описаний тут «TA29-барстар».

Убудовування молекули рекомбінантної ДНК у геном рослини зазвичай є результатом трансформування клітини або тканини (або результатом іншої генетичної маніпуляції). Конкретний сайт убудовування є або випадковим, або він є у заданому місці (у разі застосування способу цільової інтеграції).

Стороння ДНК може характеризуватися місцем її розташування і конфігурацією в сайті убудовування молекули рекомбінантної ДНК у геномі рослини. Сайт в геномі рослини, де була вставлена рекомбінантна ДНК, звється також «інсерційним сайтом» або «цільовим сайтом». Інсерція трансгена в геном рослини може бути пов'язана з делецією ДНК рослини, що звється «делецією цільового сайта». Термін «фланкувальна ділянка» або «фланкувальна послідовність» застосовується тут для визначення послідовності завдовжки принаймні 20 bp, краще принаймні 50 bp, і до 5000 bp геному рослини, розташованого або безпосередньо за сторонньою ДНК у прямому і суміжному з нею напрямках, або у зворотному і суміжному з нею напрямках. Способи трансформації, що приводять до випадкової інтеграції сторонньої ДНК, дають трансформанти з різними фланкувальними ділянками, які для кожного трансформанта є характеристичними і унікальними. Якщо трансген вводиться в рослину шляхом традиційного схрещування, то його інсерційний сайт в геномі рослини або його фланкувальні ділянки у загальному випадку не будуть змінюватися. Використовуваний тут термін «інсерційна ділянка» стосується ділянки, що відповідає ділянці завдовжки принаймні 40 bp, краще принаймні 100 bp, і до більше, ніж 10000 bp, охоплюваної фланкувальними ділянками трансгена в прямому і зворотному напрямках у «нетрансформованому» геномі рослини, і є такою, що включає у себе інсерційний сайт (а можливо і делецію цільового сайта). Беручи до уваги малі розбіжності, зумовлені мутацією у межах виду, інсерційна ділянка за своєю послідовністю є принаймні на 85%, у кращому варіанті на 90%, у ще кращому - на 95% і в найкращому на 100% ідентичною послідовності, що містить фланкувальні ділянки у прямому і зворотному напрямках сторонньої ДНК у даній рослині цього виду.

Поняттям експресії важливого гена визначається той факт, що даний ген наділяє рослину однією і більше фенотипічними рисами (наприклад, толерантністю до гербіцидів), якими і потрібно було її наділити шляхом включення молекули рекомбінантної ДНК-трансформувальної ДНК, використаної під час трансформації (на основі структури і функції частини або всього важливого гена чи генів).

Терміном «подія» тут визначається (штучний) генетичний локус, який у результаті генетичної маніпуляції несе сторонню ДНК, що містить принаймні одну копію важливого гена (чи генів). Типовими алейними станами події є наявність чи відсутність сторонньої ДНК. Застосовувані тут визначення подія «MS» і подія «RF» визначають події, які несуть трансгени відповідно «TA29-барнази» і «TA29-барстар». З боку фенотипії подія характеризується експресією одного і більше трансгенів. На генетичному рівні подія є частиною генетичної організації рослини. На молекулярному рівні подія характеризується картою рестрикції (наприклад, визначеною Саузерн-блотінгом) і/або верхньою і/або нижньою фланкувальними послідовностями трансгена, і/або молекулярною конфігурацією трансгена. Зазвичай, трансформація рослини трансформувальною ДНК, що містить принаймні один важливий ген, приводить до множини подій, кожна з яких є унікальною.

Застосовуваний тут термін «елітна подія» означає подію, вибрану із групи подій, одержуваних трансформацією тією ж самою трансформувальною ДНК або зворотним схрещуванням з рослинами, отриманими такою трансформацією, на основі експресії і стабільності даного трансгена і його сумісності з оптимальними агрономічними характеристиками рослини, що його містить. Таким чином, вибір елітної події

визначається одним, двома і більше, а ще краще, якщо всіма такими критеріями:

а) наявність трансгена не повинна компроментувати інші бажані характеристики рослини, наприклад, такі, що стосуються агрономічної потужності або комерційної цінності;

б) дана подія повинна характеризуватися добре визначеною молекулярною конфігурацією, яка стабільно успадковується і для якої можуть бути розроблені відповідні діагностичні інструменти для контролю ідентичності;

с) важливий ген (або гени) у даному трансгені повинний (повинні) демонструвати правильну, відповідну і стабільну просторову і часову фенотипічну експресію, як за

гетерозиготних (або гемізиготних), так і за гомозиготних умов події, на комерційно прийнятному рівні в діапазоні навколишніх умов, у котрих рослини, що несуть цю подію, з очевидністю, будуть знаходитися під дією звичайних агрономічних умов.

Бажано, щоб стороння ДНК була зв'язана з положенням геному рослини, яке б дозволяло інтрагресуватися у бажане генетико-комерційне підґрунтя.

Елітний статус події підтверджується інтрагресією цієї елітної події в різноманітні підходящі генетичні підґрунтя і спостереженнями задоволення одному, двом або всім критеріям, наприклад, а), т>) і с), наведеним вище.

Крім того, для трансгенів, що кодують описану тут чоловічу стерильність і відновлення фертильності, вибір елітних подій буде також визначатися сумісністю між цими подіями, а конкретніше тим, що потомство від схрещування між рослиною, що несе подію чоловічої стерильності, і рослиною, що несе подію відновлення фертильності, в котрих наявними є обидві ці події, має такі характеристики:

а) адекватну фенотипічну експресію фенотипу з відновленою фертильністю, тобто чоловічою фертильністю; і

б) фенотипічною експресією на комерційно прийнятному рівні в діапазоні навколишніх умов, у котрих рослини, що несуть ці дві події, з певною імовірністю будуть використовуватися за звичайних агрономічних умов.

Таким чином, термін «елітна подія» стосується генетичного локусу, що містить трансген, котрий відповідає вищепереліченим критеріям. Рослина, рослинний матеріал або потомство, таке як насіння, можуть містити у своєму геномі одну чи більше елітних подій.

«Діагностичний інструмент», розроблений для ідентифікації елітної події або рослини чи рослинного матеріалу, що містить елітну подію, базується на специфічних геномних характеристиках даної елітної події і, зокрема, на специфічній рестрикційній карті геномної ділянки, що містить сторонню ДНК і/або послідовність фланкувальної ділянки (чи ділянок) трансгена. Використовуваний тут термін «рестрикційна карта» стосується набору рисунків Саузерн-блоту, отриманих після розщеплення геномної ДНК рослини особливим ферментом рестрикції або групою ферментів рестрикції і після гібридизації із зондом, що є подібним за послідовністю з трансгеном у стандартних умовах жорсткості. Термін «стандартні умови жорсткості» стосується умов описаної тут гібридизації або умов звичайної гібридизації, описаних в [Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY], котрі можуть включати у себе, наприклад, такі стадії: 1) імобілізацію фрагментів геномної ДНК рослини на фільтрі; 2) гібридизацію фільтра протягом 1-2 годин при 42°C у 50% формаміді, 5 x SSPE, 2 x реагент Денгардта (Denhardt) і 0,1% SDS (додецилсульфат натрію), або протягом 1-2 годин при 68°C в 6 x SSC, 2 x реагент Денгардта і 0,1% SDS; 3) додавання міченого зонда гібридизації; 4) інкубування протягом 16-24 годин; 5) промивання фільтра протягом 20 хвилин при кімнатній температурі в 1 x SSC, 0,1% SDS; 6) трикратне промивання фільтра по 20 хвилин при 68°C в 0,2 SSC, 0,1 % SDS; і 7) експозиція фільтра протягом 24-48 годин на рентгенівську плівку при -70°C з підсилювальним екраном.

Завдяки сайтам ендегенної рестрикції, наявним в геномі рослини перед убудовуванням сторонньої ДНК, інсерція сторонньої ДНК буде змінювати специфічну карту рестрикції цього геному. Таким чином, конкретний трансформант або виведене з нього потомство можуть бути ідентифіковані по одному або більше специфічним рисункам рестрикції. Умови визначення карти рестрикції тої чи іншої події виведені в «протоколі ідентифікації карт рестрикції». Як альтернатива, якщо була секвенована одна чи обидві фланкувальні ділянки трансгена, то можуть бути розроблені PCR-зонди, що специфічно розпізнають усю (або усі) послідовність (послідовності) у протоколі PCR-ідентифікації. Рослини або рослинний матеріал, що містять елітну подію, можуть бути ідентифіковані шляхом тестування за протоколом PCR-ідентифікації, використовуючи ці специфічні праймери.

Термін «біологічний зразок» стосується зразка рослини, рослинного матеріалу або продуктів, що містять рослинний матеріал. Терміном «рослина» охоплюються рослинні тканини WOSR (*Brassica napus*) на всіх стадіях зрілості/ а також всі клітини, тканини або органи, взяті або виведені із такої рослини, включаючи, без обмеження, її насіння, листя, стеблини, квіти, коріння, поодинокі клітини, гамети, клітинні культури, культури тканин або протопласти. Використовуваний тут термін «рослинний матеріал» стосується матеріалу, одержаного або виведеного із рослини. Продуктами, що містять рослинний матеріал, можуть бути харчові продукти, корм для худоби або інші продукти, що виробляються із застосуванням рослинного матеріалу або можуть містити рослинний матеріал. Зрозуміло, що в контексті даного винаходу такі біологічні зразки переважно тестуються на наявність у них нуклеїнових кислот, специфічних для подій MS-BN1 і/або RF-BN1, що є свідченням наявності нуклеїнових кислот у зразках. Отже перелічені тут способи ідентифікації елітної події MS-BN1 і/або RF-BN1 у біологічних зразках, передусім стосуються ідентифікації в біологічних зразках нуклеїнових кислот, що містять елітну подію.

Використовуваний тут термін «комплект» означає групу реагентів, призначених для здійснення способу за даним винаходом і, зокрема, для ідентифікації елітної події MS-BN1 і/або RF-BN1 у біологічних зразках. Більш конкретно, у кращому варіанті в комплект за даним винаходом входять принаймні один або два специфічних праймери, описані вище. Додатково комплект може також містити будь-який інший реагент, зазначений тут у протоколі PCR-ідентифікації. В іншому варіанті здійснення даного винаходу в такий комплект може входити

специфічний зонд, описаний вище, який специфічним чином гібридується з нуклеїновою кислотою біологічних зразків для ідентифікації наявності в них подій MS-BN1 і/або RF-BN1. Додатково комплект може також містити будь-який інший реагент (такі як, але без

обмеження, буфер для гібридизації, мітку) для ідентифікації подій MS-BN1 і/або RF-BN1 у біологічних зразках за допомогою специфічного зонду.

Комплект за даним винаходом може використовуватися, а його компоненти можуть бути відрегульовані відповідно до конкретних ситуацій для здійснення контролю якості (наприклад, чистоти партій насіння), виявлення елітної події в матеріалі рослини або матеріалі, що містить матеріал рослини або походить із нього, такого як, але без обмеження, продукту харчування або корму для худоби.

Даний винахід стосується розробки групи елітних подій (MS-BN1 і RF-BN1) у WOSR, а також рослин, що містять ці події, потомства, отриманого внаслідок схрещування цих рослин, і клітин рослин або рослинного матеріалу, виведених із цих подій. Рослини, що містять елітну подію MS-BN1, були одержані шляхом трансформації за допомогою рTHW107, як описано в Прикладі 1. Рослини, що містять елітну подію RF-BN1, були одержані шляхом трансформації за допомогою рTHW118, також описаної в Прикладі 1.

Молекула рекомбінантної ДНК, використовувана для створення елітної події MS-BN1, містить послідовність ДНК, що кодує молекулу барнази під керуванням промотору, який селективно спрямовує експресію в клітині тапетуму (під назвою «ТА29-барнази»). Промотор ТА29 має конфігурацію «тапетум-селективної експресії в OSR [De Block and Debrouwer, *Planta* 189:218-225, 1993]. Експресія гена ТА29-барнази в рослинах WOSR приводить до деструкції тапетуму, внаслідок чого рослини набувають чоловічої стерильності [Mariani et al, 1990, див. вище]. Молекула рекомбінантної ДНК, використовувана для створення події RF-BN1, має послідовність ДНК, що кодує молекулу барстару під керуванням тапетум-специфічного промотору (що зветься «РТА29-барстар»). Експресія гена РТА29-барстар у рослинах WOSR буде при наявності гена «ТА29-барнази» в рослині запобігати дії барнази в клітинах тапетуму рослини, відвертаючи деструкцію тапетуму і, таким чином, відновлюючи фертильність цих рослин [Mariani et al, 1992, див. вище].

Обидві рекомбінантні ДНК, що використовуються для створення елітних подій MS-BN1 і RF-BN1, містять також послідовність ДНК, що кодує фермент фосфотрицинацетилтрансферази і промотор 35S вірусу Cauliflower Mosaic Virus, де послідовність, що кодує фосфотрицинацетилтрансферазу, знаходиться під керуванням промотору 35S (що зветься «35S-бар»). Промотор 35S має конфігурацію «конститутивної» експресії в OSR, що означає, що він значно експресується у більшості типів клітин протягом більшої частини життєвого циклу рослини. Експресія гена 35S-бар в рослинах OSR підтверджує стійкість до гербіцидних сполук фосфінтрицину, біалафосу, глюфосинату, чи більш узагальнено, інгібіторів глютамінсинтетики або їхніх солей та оптичних ізомерів.

Рослини або рослинний матеріал WOSR, що містить подію MS-BN1, може ідентифікуватися згідно з протоколом ідентифікації карт рестрикції, описаним для MS-BN1 у Прикладі 5. Стисло кажучи, геномна ДНК WOSR перетравлюється групою (у кращому варіанті від 2 до 5) таких ферментів рестрикції: EcoRI, EcoRV, NdeI, HpaI, AflIII. Після цього вона передається на нейлонову мембрану і гібридується з фрагментом HindIII завдовжки 3942 bp плазмиди рTHW107 (або Т-ДНК, що в ній міститься). Далі для кожного використовуваного ферменту рестрикції визначається, чи можуть бути ідентифіковані такі фрагменти:

- EcoRI - один фрагмент завдовжки в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2266 bp, і один фрагмент більше 14 kbp;
- EcoRV - один фрагмент завдовжки в межах від 1159 до 1700 bp, у кращому варіанті приблизно 1,4 kbp, і один фрагмент більше 14 kbp;
- HpaI - один фрагмент завдовжки в межах від 1986 до 2140 bp, у кращому варіанті приблизно 1990 bp, і один фрагмент завдовжки в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2229 bp;
- AflIII - один фрагмент завдовжки в межах від 514 до 805 bp, у кращому варіанті приблизно 522 bp, і один фрагмент завдовжки в межах від 2140 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2250 bp і один фрагмент завдовжки в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2477 bp;
- NdeI - два фрагменти завдовжки в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один приблизно 6500 bp і один приблизно 10 kbp.

Довжина фрагментів ДНК визначається шляхом порівняння з групою фрагментів ДНК відомої довжини і, зокрема, фрагментів PstI лямбда-ДНК фага. Фрагмент завдовжки більше 14 kbp оцінюється як такий, що має довжину в межах від 14 kbp до 40 kbp, коли екстракція ДНК відбувається згідно з методом Деллапорта [Dellaporta et al., 1983, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, vol.3, p.19-21].

Якщо матеріал рослини після перетравлення принаймні двома, в кращому варіанті принаймні трьома, в ще кращому варіанті принаймні чотирма, і в особливо кращому варіанті всіма цими ферментами рестрикції дає ферменти ДНК такої самої довжини, що описані вище, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію MS-BN1.

Рослини або рослинний матеріал, які містять MS-BN1, можна ідентифікувати також згідно з протоколом PCR-ідентифікації, описаним для випадку MS-BN1 у Прикладі 5. Методика цієї ідентифікації полягає в тому, що геномна ДНК рослини WOSR ампліфікується полімеразно-ланцюговою реакцією за допомогою праймера, який специфічно розпізнає фланкувальну послідовність події MS-BN1, у кращому варіанті розпізнаючи 5' або 3' фланкувальну послідовність описаної тут події MS-BN1 і, зокрема, за допомогою праймера з послідовністю SEQ ID No 19, і праймера, який розпізнає послідовність у трансгені і, зокрема, праймера з послідовністю SEQ ID No 12. Як контрольні використовуються ендегенні праймери WOSR. Якщо рослинний матеріал дає фрагмент завдовжки від 260 до 300 bp, краще, якщо приблизно 280 bp, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію MS-BN1.

Фенотип рослин, що містять MS-BN1, характеризується тим фактом, що у відсутність в їхньому геномі гена-відновлювача вони мають чоловічу стерильність. Рослина з чоловічою стерильністю визначається як така, що не є спроможною продукувати схоже, життєздатне насіння.

Рослини, що містять MS-BN1, можна отримувати, наприклад, із насіння, що містить MS-BN1, депонованого

в ATCC під номером доступу PTA-730. Такі рослини можна далі розмножувати для введення елітної події за даним винаходом в інші культури того ж виду.

Рослини або рослинний матеріал WOSR, що містять RF-BN1, можуть бути ідентифіковані згідно з протоколом ідентифікації карт рестрикції, описаним у Прикладі 5 для RF-BN1. Коротко ця методика полягає в тому, що геномну ДНК WOSR перетравлюють з вибором (у кращому варіанті від 2 до 4) таких ферментів рестрикції: BamHI, EcoRI, EcoRV, and HindIII, потім переносять на нейлонові мембрани і гібридизують з фрагментом HpaI завдовжки 2182 bp плазмиди pTHW118 (або Т-ДНК, що в ній міститься). Далі для кожного використовуваного ферменту рестрикції визначають, чи можуть бути ідентифіковані такі фрагменти:

- BamHI - один фрагмент завдовжки в межах від 805 до 1099 bp, у кращому варіанті приблизно 814 bp, один фрагмент завдовжки в межах від 1700 до 1986 bp, у кращому варіанті приблизно 1849 bp, один фрагмент завдовжки в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті приблизно 2607 bp, і один фрагмент в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті приблизно 6500 bp;

- EcoRI - один фрагмент завдовжки в межах від 805 до 1159 bp, у кращому варіанті приблизно 1094 bp, один фрагмент завдовжки в межах від 1986 до 2450 bp, у кращому варіанті приблизно 2149 bp, і два фрагменти в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один завдовжки приблизно 7000 bp і один - приблизно 10 kbp;

- EcoRV - два фрагменти в межах від 5077 до 14057 bp, у кращому варіанті один завдовжки приблизно 5,4 kbp і один - приблизно 8 kbp;

- HindIII - один фрагмент завдовжки в межах від 1700 до 1986 bp, у кращому варіанті приблизно 1969 bp, і два фрагменти в межах від 2450 до 2838 bp, у кращому варіанті один завдовжки приблизно 2565 bp і один - приблизно 2635 bp.

Довжина фрагментів ДНК визначається шляхом порівняння з ножиною фрагментів ДНК відомої довжини і, зокрема, фрагментів PstI лямбда-ДНК фага.

Якщо матеріал рослини після перетравлення принаймні двома, в кращому варіанті принаймні трьома, а в найкращому варіанті всіма цими ферментами рестрикції дає ферменти ДНК такої самої довжини, що описані вище, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію RF-BN1.

Рослини або рослинний матеріал, які містять RF-BN1, можна ідентифікувати також згідно з протоколом PCR-ідентифікації, описаним для випадку RF-BN1 у Прикладі 5. Коротко методика цієї ідентифікації полягає в тому, що геномну ДНК рослини WOSR ампліфікують полімеразно-ланцюговою реакцією за допомогою праймера, який специфічно розпізнає фланкувальну послідовність події RF-BN1, у кращому варіанті 5' або 3' фланкувальну послідовність описуваної тут події RF-BN1 і, зокрема, за допомогою праймера з послідовністю SEQ ID No 41, і праймера, який розпізнає послідовність у трансгені, зокрема, праймера з послідовністю SEQ ID No 23. Як контрольні використовуються ендogenous праймери WOSR. Якщо рослинний матеріал дає фрагмент завдовжки від 195 до 235 bp, краще, якщо приблизно 215 bp, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію RF-BN1.

Рослини, які містять подію RF-BN1, характеризуються тим, що барстар експресується в клітинах тапетуму. Продуктування барстару в клітинах тапетуму такої рослини, як було показано в [Magiari et al. 1992, див. вище], ні сприяє, ні завдає шкоди продукуванню насіння. Отже, за відсутності гена чоловічої стерильності в геномі такої рослини ген TA29-барстар не надає фенотипу помітності. За наявності гена чоловічої стерильності в геномі рослини ген TA29-барстар приводить до відновлення фертильності, тобто робить фенотип фертильним. Рослина з фенотипом відновленої фертильності визначається як така, що, незважаючи на наявність в її геномі гена чоловічої стерильності, є спроможною продукувати схоже, життєздатне насіння.

Рослини, що містять RF-BN1, можуть бути одержані, наприклад, із насіння, депонованого в ATCC під номером доступу PTA-730. Такі рослини можуть бути також розмножені і/або використовуватися за звичайною схемою розмноження для введення елітної події за даним винаходом в інші культивари тих самих рослинних видів.

Рослини, що містять події MS-BN1 і/або RF-BN1, характеризуються також толерантністю до глюфосинату, яка в контексті даного винаходу включає толерантність до гербіциду Liberty™. Критерієм толерантності рослин до гербіциду Liberty™ є те, що обприскування їх на проміжку від третьої до четвертої листяних стадій (від 3V до 4V) гербіцидом з активним інгредієнтом у кількості принаймні 200 г на гектар (г.а.і./га), у кращому варіанті 400 г.а.і./га і, можливо, до 1600 г.а.і./га, рослину не вбиває. Рослини, що містять MS-BN1 і/або RF-BN1, можуть також характеризуватися наявністю в їхніх клітинах фосфінотрицинацетилтрансферази, що визначається шляхом ПАТ-аналізу [De Block et al, 1987, див. вище].

Культивування рослин WOSR за даним винаходом може здійснюватися звичайним шляхом. Наявність гена 35S-бар є гарантією того, що ці рослини будуть толерантними до глюфосинату. Таким чином, боротьба з бур'яном у полях, де вирощуються такі рослини WOSR, може здійснюватися із застосуванням гербіцидів, котрі як активний інгредієнт (наприклад, Liberty™) містять глюфосинат.

Рослини, що містять події MS-BN1 і/або RF-BN1, характеризуються також агрономічними властивостями, порівняними з комерційно цінними різновидами WOSR у США.

Агрономічними властивостями, що мають відношення до даного питання, є: висота рослин, міцність і жорсткість соломи, схильність до вилягання, зимостійкість, стійкість до затемнення, посухостійкість, хворобостійкість (чорна ніжка, світлоплямистість листя, склеротинія), виробництво насіння і корисний вихід.

Спостерігалось, що наявність сторонньої ДНК на ділянках інсерції описуваного тут геному рослини WOSR Brassica napus, а точніше в цих інсерційних сайтах в геномі рослини WOSR Brassica napus, підтверджує наявність особливо цікавих фенотипічних і молекулярних характеристик у рослин, що містять ці події. Більш конкретно, наявність сторонньої ДНК на цих особливих ділянках у геномі цих рослин дає стабільну фенотипічну експресію трансгенів без суттєвого погіршення будь-якого аспекту бажаних агрономічних властивостей рослин, роблячи їх особливо підходящими для продукування гібридних WOSR. Таким чином, ділянки інсерції, що відповідають послідовностям SEQ ID No 22 і SEQ ID No 34, а точніше сайти інсерції MS-BN1 і RF-BN1 на них вказують себе як особливо підходящі для введення важливого гена (чи генів). Зокрема, ділянки інсерції MS-BN1 (SEQ ID No 22) і RF-BN1 (SEQ ID No 34) або сайти інсерції відповідно MS-BN1 і RF-

BN1 на них є особливо підходящими для введення плазмід, що містять ген чоловічої стерильності і ген відновлення фертильності, забезпечуючи оптимальну експресію кожного з цих генів або обох генів у рослині, не завдаючи шкоди її агрономічним властивостям.

Молекула рекомбінантної ДНК може бути специфічним чином вставлена у специфічну ділянку способом цільової інсерції. Такі способи добре відомі фахівцям у даній галузі і включають, наприклад, гомологічну рекомбінацію за допомогою рекомбінази, такої як, але без обмеження, FLP-рекомбіназа із *Saccharomyces cerevisiae* [Патент США № 5,527,695], CRE-рекомбіназа із фага P1 *Escherichia coli* [Опублікована заявка PCT № WO 9109957], рекомбіназа із pSRI виду *Saccharomyces goiixii* [Araki et al. 1985, J Mol Biol 182:191-203] або така, як описано в Патенті США № 4,673,640, рекомбінаційна система лямбда-фага.

Використовуваний тут термін «ідентичність за послідовністю» по відношенню до нуклеотидних послідовностей (ДНК або РНК) стосується ідентичності, що визначається як кількість положень з ідентичними нуклеотидами, поділена на кількість нуклеотидів у коротшій з двох послідовностей, що розглядаються. Порівнювальний аналіз двох нуклеотидних послідовностей виконується за алгоритмом Вільбура-Ліпмана [Wilbur and Lipmann, 1983] з розміром вікна 20 нуклеотидів, довжиною слова 4 нуклеотиди і штрафом за пропуск 4. Аналіз і інтерпретація даних послідовностей за допомогою комп'ютера, включаючи порівнювальний аналіз послідовностей, як зазначалося вище, можна виконувати, наприклад, за програмами Intelligenetics™ Suite (фірма Intelligenetics Inc., CA). Послідовності вважаються «практично подібними», якщо така послідовність має ідентичність за послідовністю, що складає принаймні приблизно 75%, у кращому варіанті приблизно 80%, у ще кращому варіанті принаймні 85%, в особливо кращому варіанті принаймні 90%, у надзвичайно кращому варіанті

22

приблизно 95% і в найкращому варіанті приблизно 100%. Зрозуміло, що коли послідовності РНК визнаються практично подібними одна одній або мають певний ступінь ідентичності за послідовністю з послідовностями ДНК, тимін (Т) у послідовності ДНК вважається таким, що дорівнює урацилу (У) у послідовності РНК.

Використовуваний тут термін «містить» («включає», «має») означає наявність в об'єкті, що розглядається, зазначених властивостей, цілих чисел, стадій або компонентів, але не виключає наявності чи добавлення одного (однієї) чи більше властивостей, цілих чисел, стадій або компонентів, чи груп з них. Таким чином, наприклад, нуклеїнова кислота або білок, що містить послідовність із нуклеотидів або амінокислот, може містити більше нуклеотидів або амінокислот, ніж фактично зазначені, тобто бути вбудованою (чи вбудованим) у більшу нуклеїнову кислоту або білок. Химерний ген, що містить ту чи іншу послідовність ДНК з визначеною функціональністю чи структурою, може містити додаткові послідовності ДНК та ін.

У наведених нижче Прикладах описані процес розвитку і характеристики рослин WOSR, що містять елітні події MS-BN1 і RF-BN1.

Якщо не зазначено іншого, то всі процедури рекомбінантних ДНК проводяться за стандартними протоколами, описаними в [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY and in Volumes 1 and 2 of Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA]. Стандартні матеріали і способи молекулярних досліджень рослин описані в [Plant Molecular Biology Labfax (1993) by R.D.D. Cray published by BIOS Scientific Publications Ltd (UK) and Blackwell Scientific Publications, UK].

У даному описі і Прикладах зроблені посилання на такі послідовності: SEQ ID No 1: плазміда pTHW107

SEQ ID No 2: плазміда pTHW118

SEQ ID No 3: праймер 248

SEQ ID No 4: праймер 249

SEQ ID No 5: праймер 247

SEQ ID No 6: праймер 250

SEQ ID No 7: праймер 251

SEQ ID No 8: праймер 254

SEQ ID No 9 праймер 258

SEQ ID No 10: праймер SP6

SEQ ID No 11: праймер T7

SEQ ID No 12: праймер 201 (BNA01)

SEQ ID No 13: послідовність, що містить 5'-фланкувальну ділянку події MS-BN1

SEQ ID No 14: праймер 611

SEQ ID No 15: праймер 259

Плазміда pTHW107 (SEQ ID No. 1) була виведена із проміжного вектора pGSVI Вектор pGSVI сам був виведений із pGSC1700 [Cornelissen and Vandewielle, 1989], але містив штучну Т-ділянку, що складалася із лівограничної і правограничної послідовностей TL-ДНК із pTiB6S3 і клонувальних сайтів мультилінкера, що дозволяли інсерцію химерних генів між граничними повторами Т-ДНК. Вектор pGSVI був забезпечений геном барстату на основній плазмідній рамці з регуляторними сигналами для експресії в *E. coli*.

Повний опис ДНК, замкненої між граничними повторами плазміди pTHW107, поданий в Табл. 1.

Таблиця 1. Т-ДНК плазміди pTHW107

nt положення	Орієнтація	Опис і посилання
1-25		Правограничний повтор із ТЛ-ДНК із pTiB6S3 [Gielen et al (1984) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-8461.
26-97		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
309-98	За годинниковою стрілкою	3'-нетрансльований кінець із гена TL-ДНК 7 (3'g7) pTiB6S3 [Velten and Schell. (1985) <i>Nucleic Acids Research</i> 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) <i>The EMBO Journal</i> 3: 835-8461.

310-330		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
882-331	За годинниковою стрілкою	Кодувальна послідовність бар-гена <i>Streptomyces hygrosopicus</i> [Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523]. Два N-кінцеві кодони бар-кодуючої ділянки дикого типу були заміщені на кодони ATG і GAC відповідно.
2608-883	За годинниковою стрілкою	Промотор із малого субодичного гена atS1A рибозо-1,5-біфосфаткарбоксілази із <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) TKrebbbers et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-7591.
2609-2658		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
2919-2659	За годинниковою стрілкою	Фрагмент TaqI завдовжки 260 бп із 3'-нетрансльованого кінця гена нопалінсинтази (3'nos) із Т-ДНК рTiT37 з сигналами поліаденілювання рослини [Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-5731.
2920-3031		3'-нетрансльована ділянка прямого напрямку із кодуючої послідовності барнази <i>B. amyloliquefaciens</i>
3367-3032	За годинниковою стрілкою	Кодувальна ділянка гена барнази із <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> [Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202:913-9151.
4877-3368	За годинниковою стрілкою	Промоторна ділянка пилляк-специфічного гена TA29 із <i>Nicotiana tabacum</i> . Цей промотор містив 1,5 kb зворотної послідовності із кодона ATG ініціації [Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 34031.
4878-4921		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
4922-4946		Лівограничний повтор із ТЛ-ДНК із рTiB6S3 [Gielen et al (1984) The EMBO Journal 3: 835-8461.

b) Конструювання химерної ДНК, що містить ген барстару під керуванням конститутивного промотора (рTHW118).

Плазмід рTHW118 (SEQ ID No. 2) також була виведена із проміжного вектора рGSV1 (зазначеного вище). Повний опис ДНК, замкненої між граничними повторами плазмід рTHW118, поданий у Табл. 2.

Таблицю 12. Т-ДНК плазмід рTHW118

nt положення	Орієнтація	Опис і посилання
1-25		Правограничний повтор із ТЛ-ДНК із рTiB6S3 [Gielen et al 1984) The EMBO Journal 3: 835-8461.
26-53		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
54-90		Залишкова послідовність із ТЛ-ДНК на правограничному повторі.
91-97		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
309-98	За годинниковою стрілкою	3'-нетрансльований кінець із гена 7 ТЛ-ДНК (3'g7) рTiB6S3 [Velten and Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese et al. (1983) The EMBO Journal 3: 835-846].
310-330		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
883-331	За годинниковою стрілкою	Кодувальна послідовність гена стійкості до біофосфу (бар) <i>Streptomyces hygrosopicus</i> [Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523]. Два N-кінцеві кодони бар-кодуючої ділянки дикого типу були заміщені на кодони ATG і GAC відповідно.
2608-883	За годинниковою стрілкою	Промотор із малого субодичного гена atS1A рибозо-1,5-біфосфаткарбоксілази із <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) fKrebbbers et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-7591.
2609-2658		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
2919-2659	За годинниковою стрілкою	Фрагмент TaqI завдовжки 260 бп із 3'-нетрансльованого кінця гена нопалінсинтази (3'nos) із Т-ДНК рTiT37, що містив сигнали поліаденілювання рослини [Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-5731.
2920-2940		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
2941-2980		3'-нетрансльована ділянка прямого напрямку із барстар-кодуючої послідовності із <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
3253-2981	За годинниковою стрілкою	Кодувальна ділянка барстар-гена із <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> [Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202:913-915].
4762-3254	За годинниковою стрілкою	Промоторна ділянка пилляк-специфічного гена TA29 із <i>Nicotiana tabacum</i> . Цей промотор містив 1,5 kb зворотної послідовності із кодона ATG ініціації [Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403].
4763-4807		Послідовності, виведені із синтетичним полілінкером
4808-4832		Лівограничний повтор із ТЛ-ДНК із рTiB6S3 [Gielen et al/(1984) The EMBO Journal 3: 835-8461.

c) Трансформація рослини *Brassica napus*

Для трансформування *Brassica napus* використовувалася векторна система, описана в [Deblaere et al. (1985, 1987)]. Ця векторна система складається із штаму *Agrobacterium* і двох плазмідних компонентів: 1) неонкогенної Ті-плазмід (pGV4000) і 2) проміжного клонуального вектора на основі плазмід рGSV1. Неонкогенна Ті-плазмід, із якої була делетована Т-ділянка, несе віг-гени, що потребуються для передачі штучної Т-ДНК, клонованої на другій плазміді у геном рослини. Для трансформування рослини можуть

використовуватися штами *Agrobacterium*, одержувані шляхом трибатьківського схрещування цих компонентів.

На всіх стадіях, за винятком стадії регенерації молоді рослини, яка проводилася за відсутності фосфінотрицину (PPT) для прискорення росту, селекція проводилася на PPT. В результаті отримували групу первинних трансформантів (рослини покоління To).

Приклад 2. Виведення подій

2.1. Характеризація трансгенних подій

2.1.1. Аналіз подій MS за методом Саузерн-блотінгу

Наявність трансгена і кількість генних вставок перевірялися за допомогою стандартного аналізу за методом Саузерн-блотінгу. Всю геномну ДНК виділяли із 1 г кореневої тканини, як описано в [Dellaporta (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol.3, p.19-21 or Doyle et al. 1987, Phytochem. Bull. 19:11)], і перетравлювали ферментом рестрикції *SacI*. Фермент *SacI* має унікальний сайт рестрикції у фрагменті Т-ДНК, розміщеному між конструкціями барнази і бару (*bar*). Саузерн-блот-аналіз виконували з двома такими зондами: "барназа" зондом: 478 bp фрагмент *PstI*-*EcoRI* плазмиди pVE113 "бар" зондом: 546 bp фрагмент *NcoI*-*BglII* плазмиди pDE110

Плазмиди pVE113 і pDE110 описані на Фіг. 1 і в заявці WO 92/09696, відповідно.

Гібридизація подій MS барназа зондом дає смугу завдовжки 12 kb, у той час як гібридизація бар зондом дає фрагмент завдовжки 14 kb.

Відносна інтенсивність смуги забезпечувала індикацію того, чи були рослини для трансгенного локусу гомозиготними чи гемізіготними. Було виявлено, що дві події мали прості вставки. Це підтверджувалося тим фактом, що рисунок сегрегації трансгена можна було пояснити спадковістю Менделіана (Mendelian) простого локусу.

2.1.2. Аналіз подій RF за методом Саузерн-блотінгу

Наявність трансгена і кількість генних вставок перевірялися за допомогою стандартного аналізу за методом Саузерн-блотінгу. Всю геномну ДНК виділяли із 1 г кореневої тканини, як описано в [Doyle et al. 1987, Phytochem. Bull. 19:11)], і перетравлювали ферментом рестрикції *SacI*. Фермент *SacI* має унікальний сайт рестрикції у фрагменті Т-ДНК, розміщеному між конструкціями барнази і бару (*bar*). Саузерн-блот-аналіз виконували з двома такими зондами:

"барстар" зондом: 436 bp фрагмент *HindIII*-*PstI* плазмиди pVE113 "бар" зондом: 546 bp фрагмент *NcoI*-*BglII* плазмиди pDE110

Гібридизація подій RF барстар зондом дає смугу завдовжки 3 kb, у той час як гібридизація бар зондом дає фрагмент завдовжки 14 kb.

Відносна інтенсивність смуги забезпечувала індикацію того, чи були рослини для трансгенного локусу гомозиготними чи гемізіготними. Було виявлено, що кілька подій мали прості вставки. Це підтверджувалося тим фактом, що рисунок сегрегації трансгена можна було пояснити спадковістю Менделіана простого локусу.

2.1.3. Загальний фенотип і агрономічні властивості рослин

Рослини Ti обох подій, MS і RF, були оцінені щодо кількості фенотипічних рис, включаючи висоту рослин, міцність і жорсткість соломи, схильність до вилягання, стійкість до затемнення, посухостійкість, хворобостійкість (чорна ніжка, світлоплямистість листя, склеротинія) і продукування насіння та корисний вихід.

Оцінка показала, що лінії були подібними (або поліпшеними) за вищепереліченими агрономічними властивостями порівняно з нетрансформованими різновидами, а також з численними олієнасінневими рапсовими культиварами. У деяких випадках рослини виділялися для соматональної варіації за однією або більше з вищеперелічених рис. Якщо це не давало нових цікавих з комерційної точки зору фенотипічних рис, то такі рослини викидалися.

2.2. Виведення ліній з MS або RF рисами

Молоді гемізіготні рослини з різними To («Ms/-» або «Rf/-») були перенесені із тканинної культури в ґрунт теплиці. Наявність трансгена і кількість копій перевіряли за допомогою аналізу за методом Саузерн-блотінгу (описаного вище). Під час цвітіння рослин їхні квіти перевірялися на стерильність і фертильність. Рослини To були схрещені з рослинами дикого типу (-/-) для продукування насіння Ti (MsT1 і RfT1). Насіння Ti було посаджене і вирощене в теплиці. У рослин була оцінена їхня толерантність до амонійглюфосинату. Рослини Ms-T1 оцінювалися на сегрегацію стерильності/фертильності (у необприсканих рослин), у той час як рослини Rf-T1 були перевірені на наявність у них плодоносних квітів.

Рослини Ms-T1, що містили трансген, для продукування насіння MsRf-F1 були схрещені з випробуваною рослиною, гомозиготною за геном відновлення фертильності (Rf/Rf). Це насіння (Ms/-, Rf/- і -/-, Rf/-) було посаджене в теплиці і обприскане гербіцидом Liberty™. Решта потомства F1 була оцінена на сегрегацію стерильності/фертильності для перевірки того, чи зможе чоловіча стерильність адекватно відновитися у *Bnassica napus* (фертильність близько 100%).

Кращі події були відібрані для подальших випробувань. Рослини Ms-T1 були схрещені з гомозиготним відновлювачем фертильності, і насіння було посаджене в поле. Рослини були оцінені на толерантність до гербіциду Liberty™ (при дозі 800 г активного інгредієнту на гектар (г.а.і./га), у той час як доза, що пропонується для фермерів, складає 400 г.а.і./га), на сегрегацію фертильності/стерильності і загальні фенотипічні характеристики. При цьому відбиралися лінії, в котрих фертильність була відновлена на 100% і в котрих не спостерігалось негативних оцінок щодо фенотипічних або агрономічних властивостей (докладно див. у п. d) порівняно з ізогенним контрольним зразком дикого типу.

Рослини Rf-T1, що містили трансген, були схрещені з випробуваною рослиною (Ms/-), що містила ген чоловічої стерильності, для продукування насіння F1. Це насіння було висаджене в теплицю, обприскане гербіцидом Liberty™ і оцінене на відновлення фертильності (близько 100%).

Тимчасом рослини Rf-T1 росли до одержання насіння S1. Рослини S1 вирощувалися в теплиці, обприскувалися гербіцидом Liberty™ і знов продукували насіння S2. Із насіння S2 відбиралися гомозиготні зразки.

2.3. Комбінування подій MS і RF

Відібрані рослини Ms-T1 були схрещені з відібраними подіями Rf-S2 в теплиці для випробувань на відновлення фертильності. Насіння було пересаджене в теплицю, рослини були обприскані гербіцидом Liberty™, і була перевірена плодоносність їхніх квітів.

2.4. Випробування подій MS і RF на різному генетичному підґрунті і в різних місцях Відібрані події були введені у два протилежних одне одному генетичних підґрунтя з метою довести, що події MS і RF добре функціонують і не дають негативних наслідків на корисний вихід і якість продукції у будь-якому випробуваному підґрунті.

Поряд з цим відібрані події MS і RF випробувалися в чотирьох-п'яти різних навколишніх умовах з метою переконатися у відсутності негативної взаємодії між ними і навколишнім середовищем.

На наступній стадії були проведені більш поширені польові випробування продукування гібридного насіння при використанні відібраних подій MS і RF. Відібрана подія MS в її оригінальному підґрунті і в двох різних, протилежних одне одному підґрунтях схрещувалася з відбіраною подією RF в оригінальному підґрунті останньої і в двох різних, протилежних одне одному підґрунтях. Гібрид F1 оцінювали на його стійкість до гербіциду Liberty™, на плодоносність, а також на загальні агрономічні властивості (корисний вихід і якість).

2.5. Селекція елітних подій

Описана вище процедура відбору в процесі виведення трансгенних ліній MS дала в результаті декілька елітних подій, які продемонстрували оптимальну експресію трансгена, тобто стійкість до амонійглюфосинату, фенотип чоловічої стерильності і сприйнятливості до повного відновлення фертильності гомозиготною лінією-відновлювачем і, зокрема, відбіраною елітною подією RF.

Описана вище процедура відбору в процесі виведення трансгенних ліній RF дала в результаті декілька елітних подій, які продемонстрували оптимальну експресію трансгена, тобто стійкість до амонійглюфосинату і здатність до відновлення фертильності F1 при схрещуванні з рослиною, що несе ген чоловічої стерильності і, зокрема, з відбіраною елітною подією MS.

Приклад 3. Уведення елітних подій-кандидатів до відбору в WOSR

Декілька елітних подій MS і RF, виведених в B. Napus, як описано вище, були введені шляхом повторюваного зворотного схрещування рослин виду Drakkar у культивар WOSR. Були проведені дослідження цих рослин, які показали, що:

а) наявність сторонньої ДНК не погіршує інших бажаних характеристик рослини, що стосуються агрономічних властивостей або комерційної цінності;

б) досліджувана подія характеризувалася добре визначеною молекулярною конфігурацією, яка стабільно успадковувалася;

с) важливий ген (гени) в сторонній ДНК вказували- правильну, відповідну і стабільну в просторі і часі фенотипічну експресію як в гетерозиготних (або гемізиготних), так і в гомозиготних умовах події на комерційно прийнятному рівні в діапазоні навколишніх умов, у яких рослини, що несуть дану подію, з очевидністю, будуть піддаватися звичайній агрономічній експлуатації.

Крім того, у досліджуваних рослин оцінювалися агрономічні характеристики і властивості у порівнянні з видами WOSR дикого типу.

Широкі випробування в полі показали, що певні елітні події-кандидати весняного олієнасіньового рапсу, коли вони були введені у WOSR, давали рослини, котрі демонстрували адекватну експресію важливих генів у сторонній ДНК у сполученні з оптимальними агрономічними властивостями. Ці події відбиралися як елітні MS і RF у WOSR і одержали найменування MS-BN1 і RF-BN1 відповідно.

Приклад 4. Визначення характеристик елітних подій MS-BN1 і RF-BN1 Після того, як події MS-BN1 і RF-BN1 були ідентифіковані як елітні, в котрих експресія відповідних трансгенів, а також загальні агрономічні властивості були оптимальними, проводився детальний аналіз місця знаходження трансгенів на молекулярному рівні. Ці дослідження включали у себе детальний аналіз за методом Саузерн-блотінгу (при використанні численних ферментів рестрикції) і секвенування фланкувальних ділянок трансгена.

4.1. Аналіз за методом Саузерн-блотінгу при використанні численних ферментів рестрикції

У трансгенних і контрольних рослин була зібрана листяна тканина. Із листяної тканини відповідно до [Dellaporta et al. (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol.3, p.19-21)] була виділена повна геномна ДНК. Концентрація ДНК кожного препарату визначалася шляхом вимірювання оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм.

Геномна ДНК у кількості 10 мкг була перетравлена ферментом рестрикції у кінцевому реакційному об'ємі 40 мкл в умовах, зазначених виробником. Тривалість перетравлювання і/або кількість ферменту рестрикції встановлювали такими, щоб забезпечити повне перетравлення зразків геномною ДНК без неспецифічної деградації. Після перетравлення до перетравлених зразків ДНК добавили 4 мкл завантажувального барвника, і все це помістили в 1 % агарозний гель.

У гель були поміщені також такі контрольні ДНК:

- негативний контрольний зразок з геномною ДНК, приготованою із нетрансгенної рослини Brassica; цей зразок використовувався для підтвердження відсутності фонові гібридизації;

- позитивний контрольний зразок ДНК. При інтеграції гетерозиготної унікальної копії трансгена в геном Brassica napus 10 мкг геномною ДНК мали таку саму кількість еквівалентів молекули, що й ± 19 пкг 1501 bp фрагмента PvuI-HindIII ДНК pTHW118 (розмір диплоїдного геному Brassica napus: $0,8 \times 10^9$ bp). Кількість цього контрольного зразка, яка відповідає копії однієї плазмиди на геном, додавали до 1 мкг перетравленої нетрансгенної ДНК Brassica napus. Одержаний в результаті реконституційний зразок використовували для демонстрації того, що гібридизація проводилася в умовах, які дозволяли здійснювати гібридизацію зонда з цільовими послідовностями. Як розмірний стандарт у зразок була включена лямбда-ДНК фага (штам Clind 1 ts 857 Sam 7, Life Technologies), перетравлена фрагментом PstI.

Після електрофорезу зразки ДНК (перетравленої геномною ДНК Brassica, контрольні зразки і розмірний стандарт ДНК) були перенесені на нейлонну мембрану шляхом капілярного блотінгу протягом 12-16 годин.

Темплати ДНК, що використовувалися у приготуванні зонда для подій MS-BN1, були приготовані шляхом

рестрикційного перетравлювання РТW107 фрагментом HindIII. У результаті цього звільнювався 3942 bp фрагмент ДНК, який охоплював потрібну частину трансформувальної ДНК (частина PSSUARA, 3'pos, барназа, РТА29).

Темплати ДНК, що використовувалися у приготуванні зонда для подій RF-BN1, були приготовані шляхом рестрикційного перетравлювання РТW118 фрагментом HpaI. У результаті цього звільнювався 2182 bp фрагмент ДНК, який охоплював потрібну частину трансформувальної ДНК (частина PSSUARA, 3'pos, барстар, РТА29).

Після очищення фрагменти ДНК були помічені у стандартні способи і використовувалися для гібридизації на мембрану.

Гібридизацію проводили у стандартних умовах жорсткості: мічений зонд був денатурований нагрівом протягом 5-10 хвилин у водяній бані при температурі 95-100°C і охолодженням на льоду протягом 5-10 хвилин з наступним вливанням до гібридизаційного розчину (6 x SSC (20 x SSC є 3,0 M NaCl, 0,3 M цитрату натрію, pH 7,0), 5 x розчин Денгардта (100 x розчин Денгардта = 2% фіколю (синтетичного середовища для фракціонування клітин), 2% полівінілпіролідону, 2% альбуміну бичачої сироватки), 0,5% додецилсульфату натрію (SDS) і 20 мкг/мл денатурованого ДНК-носія (одноланцюгова ДНК риб'ячої сперми з середньою довжиною 120-300 нуклеотидів). Гібридизацію проводили протягом ночі при 65°C. Блоти тричі промивали протягом 30-40 хвилин при 65°C мильним розчином (2 x SSC, 0,1% SDS). Авторадіографічні знімки піддавали електронному скануванню.

4.1.1. MS-BIN1

Рестрикційні карти, одержані після перетравлення геномної ДНК MS-BN1 різними ферментами рестрикції, подані на Фіг. 2 і підсумовані в Табл. 3.

Таблиця 3. Рестрикційна карта події MS-BN1.

Номер доріжки	Завантажена ДНК	Міграція фрагментів гібридизувальної ДНК між смугами розмірного маркера		Оцінювана довжина фрагментів гібридизаційної ДНК
		Більше, ніж	Менше, ніж	
1	MS-BN1 - EcoRI	2140 14057	2450	2266 bp (*) >14 kbp
2	MS-BN1 - EcoRV	1159 14057	1700	1.4kbpO >14 kbp
4	MS-BN1- HpaI	1986 2140	2140 2450	1990 bp 2229 bp
5	MS-BN1 - AfHIF	2450 2140 514	2838 2450 805	2477 bp (*) 2250 bp 552 bp (*)
6	MS-BN1 - NdeI	5077 5077	14057 14057	10 kbp 6510 bp
7	Нетрансгенна WOSR	-	-	-
8	Контрольна плазмідна ДНК -BamHI	1700 2450	1986 2838	1966 bpO 2607 bp O

(*) Довжина цих фрагментів прогнозувалася на основі рестрикційної карти плазміди рТНW107.

4.1.2. RF-BN1

Рестрикційні карти, одержані після перетравлення геномної ДНК RF-BN1 різними ферментами рестрикції, подані на Фіг. 3 і підсумовані в Табл. 4.

Таблиця 4. Рестрикційна карта події RF-BN1.

Номер доріжки	Завантажена ДНК	Міграція фрагментів гібридизувальної ДНК між смугами розмірного маркера		Оцінювана довжина фрагментів гібридизаційної ДНК
		Більше, ніж	Менше, ніж	
1	MS-BN1 - BamHI	805 1700 2450 5077	1099 1986 2838 14057	814 bp 1849 bp (*) 2607 bp O 6580 bp
2	MS-BN1 - EcoRI	805 1986 5077 5077	1159 2450 14057 14057	1094 bp 2149 bp 7000 bp 10kbp
3	MS-BN1 - EcoRV	5077 5077	14057 14057	5.4 kbp 8kbp
4	MS-BN1 - HindIII	1700 2450 2450	2140 2838 2838	1969 bp 2565 bp 2635 bp
6	Нетрансгенна WOSR	-	-	-
5	Контрольна плазмідна ДНК -BamHI	1700 2450 5077	1986 2838 14057	1849 bp (*) 2607 bp O 8100 bp

(*) Довжина цих фрагментів прогнозувалася на основі рестрикційної

4.2. Ідентифікація фланкувальних ділянок

Фланкувальні ділянки елітних подій MS-BN1 і RF-BN1 спочатку ідентифікувалися на весінніх OSR, в яких виводилися ці події, а після цього перевірялися на WOSR.

4.2.1. Ідентифікація фланкувальних ділянок події MS-BN1

4.2.1.1. Права (5') фланкувальна ділянка

Послідовність правограничної фланкувальної ділянки події MS-BN1 визначали за допомогою опосередкованої лігування полімеразно-ланцюгової реакції [Mueller et al. 1989, Science 780-786; Maxine et al., 1994, PCR Methods and Applications, 71-75] із захопленням подовжувального сегмента [Tormanen et al., 1993, NAR 20:5487-5488].

Для приготування лінкера використовувалися такі олігонуклеотиди:

MDB248:	(SEQ	ID	No.	3)
5'CAT.CCC.CTC.ACC.CAO.CCT.M6.TAT.TTT.MC.TTT.AAC.CAC.TTT.6CT.CCO.ACA.CTC.CCA.TTC				
MDB249:	(SEQ	ID	No.	4)
S'CAA.TGG.GAC.TGT.CGG.AGG.ACT.GAG.GGC.CAA.AGC.TTG.GCT.CTT.AGC.CTG.GGT.CAG.GGC.				

ATG

Після приготування лінкера здійснювали синтез першого ланцюга із перетравленої

NcoI геномної ДНК події MS-BN1, використовуючи біотинільований ген-специфічний праймер:

	Послідовність (5' -> 3')	Положення в DTHW107
Біотинільований праймер MDB247	CCG.TCA.CCG.AGA.TCT.GAT.CTC.ACG.CG (SEQ ID No. 5)	322 <- 347

Далі лінкер лігували з першоланцюговою ДНК, котру потім зв'язували з магнітними кульками, з яких вимивали небіотинільований ланцюг. Цю ДНК використовували у збільшеній PCR-ампліфікації при використанні таких праймерів:

	Послідовність (5' -> 3')	Положення в PTHW107
Лінкерний праймер MDB250	GCACTGAGGGCCAAAGCTTGGCTC (SEQ ID No. 6)
Т-ДНК праймер MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.AGC.TAG.C (SEQ ID No. 7)	293 <- 317

Полімеразно-ланцюгова реакція дала фрагмент завдовжки приблизно 1150 бп. Цей правограничний фрагмент був елюйований із агарозного гелю, і була проведена гніздова полімеразно-ланцюгова реакція при 100-кратному розрідженні цієї ДНК і використанні таких праймерів:

	Положення (5' -> 3')	Положення в PTHW107
Гніздовий лінкерний праймер MDB254	CTTAGCCTGGGTCAGGGCATG (SEQ ID No. 8)	
Т-ДНК праймер MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.TG (SEQ ID No. 9)	224 <- 243

У результаті був одержаний фрагмент завдовжки приблизно 1000 бп, який елюювали з агарозного гелю, очистили і лігували з вектором pGem®-T. Реконбінантну плазмідну ДНК відбирали за допомогою стандартної PCR-реакції з такими праймерами:

	Послідовність (5' -> 3')	Положення в PTHW107
SP6 праймер	TAA.TAC.GAC.TCA.CTA.TAG.GGC.GA (SEQ ID No. 10)	(SP6 промотор у векторі pGem®-T)
T7 primer	TTT.AGG.TGA.CAC.TAT.AGA.ATA.C (SEQ ID No. 11)	(T7 промотор у векторі pGem®-T)
Т-ДНК праймер MDB201	gCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GAC rSEQ ID No. 12)	143 <- 163

У результаті були отримані такі фрагменти: SP6-T7: 1224 бп

SP6-MDB201: 1068 бп T7-MDB201: 1044 бп

Правограничний фрагмент очистили і піддали секвенуванню (SEQ ID No. 13), отримавши в результаті 963 бп, із яких основні пари 1-867 відповідали ДНК рослини, а основні пари від 868 до 953 відповідали Т-ДНК плазмиди рTW107.

4.2.1.2. Ліва (5') фланкувальна ділянка події MS-BN1

Послідовність лівограничної фланкувальної ділянки вставленого трансгена в події MS-BN1 визначали за допомогою способу термальної асиметричної переплетеної PCR-реакції (TAIL-PCR), описаного в [Liu et al. (1995, The Plant Journal 8(3): 457-463]. У цьому способі використовуються три гніздових специфічних праймери у послідовних реакціях разом з коротшим, довільно виродженим (AD: arbitrary degenerate) праймером таким чином, що забезпечується можливість теплового контролю відносних ефективностей ампліфікації специфічних і неспецифічних продуктів. Специфічні праймери відбирали для відпалювання до границі

трансгена і базувалися на їхніх умовах відпалювання. Невелика кількість (5 мкл неочищених вторинного і третинного продуктів PCR-реакції аналізували в 1% агарозному гелі. Третинний продукт PCR-реакції використовували для препаративної ампліфікації, очищували і секвенували на автоматичному секвенаторі з використанням циклічного комплексу DyeDeoxy Terminator.

Використовувалися такі праймери:

	Послідовність (5' -> 3')	Положення в PTHW107
Вироджений праймер MDB611	NgT.CgA.SWg.TNT.WCA.A (SEQ ID No. 14)	-----
Первинний TAIL MDB259	дТд.Сад.ддА.АдС.ддТ.ТАА.СТд.д fSEQIDNo. 15)	7164->4186
Вторинний TAIL MDB260	ССТ.ТТд.дАд.ТАА.АТд.дТд.ТТд.д (SEQ ID No. 16)	4346->4366
Третинний TAIL HCA24	gCg.AAT.gTA.TAT.TAT.Atg.CA (SEQ ID No. 17)	4738->4757
де: N=A,C,T або д;	S=C або g; W=A або T	

Ампліфікований за допомогою HCA24-MDB611 фрагмент мав довжину приблизно 540 бр, із яких 537 бр були секвеновані (3'-кінець: SEQ ID No 18). Послідовність між парами 1 і 180 містила ДНК плазміді рTHW107, у той час як послідовність між парами 181 і 537 відповідала ДНК рослини.

4.2.1.3. Ідентифікація делеції цільового сайту

За допомогою праймерів, що відповідали послідовностям на фланкувальних ділянках трансгена при використанні як темплату різновиду Drakkar Brassica napus дикого типу, був ідентифікований інсерційний сайт трансгена.

Для цього використовувалися такі праймери:

Положення на Положення на

Послідовність (5' -> 3') 5'-кінці 3'-кінці

(SEQ ID No 13) (SEQ ID No 18)

VDS51 TgA.CAC.TTT.gAg.CCA.CTC.g 733-► 751

(SEQ ID No. 19)

HCA48 GgA.ggg.TgT.TTT.Tgg.TTA.TC 189 «-208

(SEQ ID No. 20)

У результаті був одержаний 178 бр фрагмент (SEQ ID No 21), в якому ділянка від 132 до 150 бр відповідала делеції цільового сайту.

4.2.1.4. Ідентифікація інсерційної ділянки події MS-BN1

На основі ідентифікації фланкувальних ділянок і делеції цільового сайту можна було визначити інсерційну ділянку події MS-BN1 (SEQ ID No 22): 1- 822: б'-фланкувальна ділянка бр 46-867 SEQ ID No 13

823-841 делеція цільового сайту бр 132-150 SEQ ID No 21

842-1198: 3'-фланкувальна ділянка бр 181 до 537 SEQ ID No 18

4.2.2. Ідентифікація фланкувальних ділянок події RF-BN1

Граничні фланкувальні ділянки події RF-BN1 визначалися за методом маловекторної полімеразно-ланцюгової реакції [Use of Vectors and Subvectors PCR to isolate transgene flanking DNA (Застосування маловекторної і субмаловекторної PCR для виділення фланкувальної ДНК трансгена), Maxine J. Allen, Andrew Collide, and Alec J. Jeffreys PCR Methods and Applications -1994 (4) pages 71 - 75] з геномного ДНК події RF-BN1 як темплатом, перетравленим фрагментом HindIII. Маловекторний лінкер був одержаний за допомогою праймерів MDB248 (SEQ ID No. 3) і MDB249 (SEQ ID No. 4), описаних вище.

4.2.2.1. Права (5') фланкувальна ділянка події RF-BN1 Використовувалися такі праймери:

	Послідовність (5' -> 3')	Положення в PTHW118
Маловекторний праймер MDB250	GCA.CTG.AGG.GCC.AAA.GCT.TGG.CTC (SEQ ID No. 6)	
Маловекторний праймер MDB254	CTT.AGC.CTG.GGT.CAG.GGC.ATG (SEQ ID No. 8)
Т-ДНК праймер MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.AGC.TAG.C (SEQ ID No. 7)	293 <- 317
Т-ДНК праймер MDB193	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC (SEQ ID No. 23)	226 <- 243
Т-ДНК праймер MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.TG (SEQ ID No. 9)	224 <- 243
Т-ДНК праймер MDB201	GCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GAC (SEQ ID No. 12)	143 <- 163

Був одержаний 1077 бр фрагмент (SEQ ID No. 24), в якому ділянка 1-881 бр відповідала ДНК рослини, а ділянка 882-1077 бр відповідала Т-ДНК плазміді рTW118.

4.2.2.2. Ліва (3') фланкувальна ділянка події RF-BN1

Для ідентифікації фланкувальної ділянки (3') елітної події RF-BN1 була проведена TAIL PCR-реакція, описана вище, із застосуванням довільно виродженого праймера і праймерів, розташованих у Т-ДНК поблизу лівої границі.

Використовувалися такі праймери:

- довільно вироджений праймер

iV,DB286 NTg.CgA.SWg.ANA.WgA.A

(SEQ ID No. 25)

де: N=A,C,T або g; S=C або д; W=A або T

- Т-ДНК-праймери

MDB314 gTA.ggA.ggT.Tgg.gAA.gACC

(SEQ ID No. 26)

MDB315 ggg.CTT.TCT.ACT.AgA.AAg.CTC.TCg.g

(SEQ ID No. 27)

MDB316 CCg.ATA.ggg.AAg.TgA.TgT.Agg.Agg

(SEQ ID No. 28)

Був одержаний фрагмент завдовжки приблизно 2000 бр. Цей фрагмент був клонований у векторі pGem®-T і використовувався як темплат для PCR-реакції при застосуванні таких праймерів:

-праймер t	ЦНК рослини		
MDB288	ATg.CAg.CAA.gAA.gCT.Tgg.Agg	(SEQ ID	No. 29)
	-Т-ДНК праймер		
MDB314	gTA.ggA.ggT.Tgg.gAA.gAC.C	(SEQ ID	No. 26)

У результаті був одержаний фрагмент завдовжки приблизно 1500 bp (SEQ ID No. 30), в якому ділянка 1-166 bp відповідала Т-ДНК із плазміди рTW118, а ділянка 167-1441 bp відповідала ДНК рослини.

4.2.2.3. Молекулярний аналіз делеції цільового сайту

Делеція цільового сайту була клонована за методом TAIL-PCR-реакції (описаним зище) при використанні специфічних праймерів геномної ДНК дикого типу і ДНК рослини у зворотному напрямку від вставки Т-ДНК, спрямованих у напрямку вставки:

-	вироджений праймер:		
довільно			
MDB286	NTg.CgA.SWg.ANA.WgA.A	(SEQ ID No.	25)

де: N=A ,C,T або g; S=C або д; W=A або T

-	1 ДНК рослини:		
праймери*			
MDB269	ддТТТТСддАддТССдАдАСд	(SEQ ID No.	31)
MDB283	СТТддАССССТАддТААТдС	(SEQ ID No.	32)
MDB284	дТАСАААСТТддАССССТАдд	(SEQ ID No.	33)

Був одержаний фрагмент завдовжки 1068 bp (SEQ ID No. 34), в якому: 53-83: 5'-фланкувальна ділянка 84-133: делеція цільового сайту

134-1055: 3'-фланкувальна ділянка

Після вставлення Т-ДНК був делетований цільовий сайт завдовжки 51 бр. Порівняння послідовності локусу дикого типу з локусом Rf3 виявило наявність ДНК-філера на правому граничному з'єднанні. Послідовність-філер ТСТСГ на правій границі закінчується триплетом ТСА на 5'-кінці і триплетом СГА на 3'-кінці. Ці триплети виявляються також у точці розриву делеції цільового сайту і Т-ДНК відповідно. Пошук у більш віддалених послідовностях рослин виявив можливе джерело походження цієї ДНК-філера. Послідовність ТСА.ТСТСГ.СГА також розташована в ДНК рослини на 3'-кінці делеції цільового сайту. Це є серцевинна послідовність двох 13 бр ідентичних повторів, розміщених на 209 бр у прямому напрямку від точки розриву делеції цільового сайту.

Інсерційна ділянка для RF-BN1 може бути визначена як така, що містить ліву фланкувальну ділянку, делецію цільового сайту і праву фланкувальну ділянку таким чином:

1-881:	5'-фланкувальна ділянка	(bp 1-881 SEQ ID No	24)
882-932:	делеція цільового сайту	(bp 84-133 SEQ ID No	.34)
933-2207	3'-фланкувальна ділянка	(bp 167-1441 SEQ ID	No. 30)

4.3. Генетичний аналіз локусу

Генетична стабільність вставок для двох подій перевірялася шляхом молекулярного і фенотипічного аналізу в рослинах потомства кількох поколінь. Результати Саузерн-блот-аналізу рослин поколінь T₀, T₁ і T₂ порівнювалися для обох подій - MS-BN1 і RF-BN1. Отримані картини виявилися ідентичними для кожної з цих подій у різних поколіннях. Це свідчить про те, що молекулярна конфігурація трансгенів як в рослинах з подією MS-BN1, так і в рослинах з подією RF-BN1 була стабільною.

Події MS-BN1 і RF-BN1 вказували наявність у них сегрегації Менделіана для їхніх відповідних трансгенів як унікальні генетичні локуси принаймні в трьох послідовних поколіннях, засвідчуючи те, що вставки були стабільними.

На основі вищерозглянутих результатів події MS-BN1 і RF-BN1 були ідентифіковані як елітні.

4.4. Ідентифікація фланкувальних послідовностей подій MS-BN1 і RF-BN1 у WOSR

Фланкувальні послідовності елітних подій MS-BN1 і RF-BN1 у WOSR визначали за допомогою праймерів, виведених на основі фланкувальних послідовностей цих подій у весняному олієнасінневому рапсі.

Права (5') фланкувальна послідовність події MS-BN1 рослин WOSR була визначена за допомогою Т-ДНК-праймера (SEQ ID No. 12) і праймера, розташованого у правограничній ДНК рослини події MS-BN1:

VDS57:	5'-gCA	TgA	TCT.	gCT.	Cgg.	gAT.ggC-3'	(SEQ ID No.	35)
--------	--------	-----	------	------	------	------------	-------------	-----

В результаті був одержаний фрагмент завдовжки 909 bp (SEQ ID No. 36) з послідовністю, практично подібною послідовності SEQ ID No. 13 (починаючи від нуклеотиду 98).

Ліва (3') фланкувальна послідовність події MS-BN1 рослин WOSR була визначена за допомогою Т-ДНК-праймера (SEQ ID No. 17) і праймера, розташованого у лівограничній ДНК рослини події MS-BN1: HCA68; 5'-CCA.TAT.Acg.CCA.gAg.Agg.AC-3' (SEQ ID No. 37)

В результаті був одержаний фрагмент завдовжки 522 bp (SEQ ID No. 38) з послідовністю, практично подібною послідовності SEQ ID No. 18.

Права (5') фланкувальна послідовність події RF-BN1 рослин WOSR була визначена за допомогою Т-ДНК-праймера (SEQ ID No. 12) і праймера, розташованого у правограничній ДНК рослини події RF-BN1 (SEQ ID No. 31). В результаті був одержаний фрагмент завдовжки 694 bp (SEQ ID No. 39) з послідовністю, практично

подібною послідовності SEQ ID No. 24 (від нуклеотиду 293 до 980).

Лівогранична послідовність події RF-BN1 рослин WOSR була визначена за допомогою Т-ДНК-праймера (SEQ ID No. 26) і праймера, розташованого у лівограничній ДНК рослини події RF-BN1 (SEQ ID No. 29). В результаті був одержаний фрагмент завдовжки 1450 bp, серед яких 1279 bp були секвеновані (SEQ ID No. 40). Ця послідовність вказувала практичну подібність послідовності SEQ ID No. 30 (від нуклеотиду 141 до 1421).

Таким чином, лівограничні і правограничні послідовності елітних подій MS-BN1 і RF-BN1 підтвердили свою практичну подібність у рослин SOSR і WOSR.

Приклад 5. Розробка діагностичних інструментів для контролю ідентичності

Були розроблені такі протоколи для ідентифікації будь-якого рослинного матеріалу WOSR, що містить елітну подію MS-BN1.

5.1. Протокол ідентифікації карт рестрикції елітних подій MS-BN1 і RF-BN1 Рослини WOSR з елітною подією MS-BN1, можна ідентифікувати за допомогою аналізу за методом Саузерн-блотінгу, використовуючи практично ту саму процедуру, що описана у Прикладі 4.1. Отже, геномну ДНК WOSR 1) перетравлюють принаймні двома, а краще принаймні, ще краще принаймні чотирма і найкраще - всіма такими ферментами рестрикції: EcoRI, EcoRV, NdeI, HpaI, AflIII, 2) переносять на нейлонові мембрани і 3) гібридизують з 3942 bp фрагментом HindIII плазмиди pTHW107. Якщо стосовно принаймні двох використовуваних ферментів рестрикції фрагменти ДНК ідентифікуються як такі, що мають однакову довжину з

фрагментами, переліченими в Табл. 3 Прикладу 4.1.1, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію MS-BN1.

Рослини WOSR з елітною подією RF-BN1, можна ідентифікувати за допомогою аналізу за методом Саузерн-блотінгу, використовуючи практично ту саму процедуру, що описана у Прикладі 4.1. Отже, геномну ДНК WOSR 1) перетравлюють принаймні двома, краще принаймні трьома і найкраще - всіма такими ферментами рестрикції: BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, 2) переносять на нейлонові мембрани і 3) гібридизують з 2182 bp фрагментом HpaI плазмиди pTHW118. Якщо стосовно принаймні двох використовуваних ферментів рестрикції фрагменти ДНК ідентифікуються як такі, що мають однакову довжину з фрагментами, переліченими в Табл. 4 Прикладу 4.1.2, то рослина WOSR визначається як така, що містить елітну подію RF-BN1.

5.2. Протокол ідентифікації за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції елітних подій MS-BN1 і RF-BN1

Перед тим, як відбирати невідомий матеріал, слід провести тестування з усіма відповідними контрольними зразками. Поданий тут протокол може потребувати оптимізації по компонентах, які можуть змінюватися від лабораторії до лабораторії (приготування матричної ДНК, Taq ДНК полімераза, якість праймерів, dNTP, реакторний термоблок, тощо).

Ключову роль у протоколі відіграє ампліфікація ендегенної послідовності. Потрібно встановлювати такі умови полімеразно-ланцюгової реакції і термоциклування, щоб забезпечити ампліфікацію еквімолярних кількостей як ендегенної, так і трансгенної послідовності у відомому трансгенному геномному ДНК-темплаті. В усіх випадках, коли цільовий ендегенний фрагмент не ампліфікується, або коли цільові послідовності яє ампліфікуються з однаковими інтенсивностями етидид-бромідного забарвлення, як на це вказує електрофорез в агарозному гелі, може потребуватися оптимізація умов полімеразно-ланцюгової реакції.

5.2.1. Матрична ДНК

Матричну ДНК приготувляють із листяного пуншу або з однієї насінини за методикою Едвардса [Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991)]. У разі використання ДНК, приготованої за іншими методами, випробування потрібно проводити при інших кількостях темплату. Звичайно найкращі результати дають 50 нг геномної матричної ДНК.

5.2.2. Призначений позитивний і негативний контроль

У процес полімеразно-ланцюгової реакції повинні бути включені позитивний і негативний контроль.

- Master Mix контроль (ДНК негативний контроль). Це є полімеразно-ланцюгова реакція, в яку не додається ДНК. Якщо в цьому випадку одержується очікуваний результат - відсутні продукти PCR-реакції, то це означає, що PCR-суміш не була забруднена цільовою ДНК.

- ДНК позитивний контроль (відомий зразок геномної ДНК, що містить трансгенні послідовності). Успішна ампліфікація цього позитивного контролю свідчить про те, що PCR-реакція проводилася в умовах, що дозволяють ампліфікацію цільових послідовностей.

- Контроль з ДНК дикого типу. Це є полімеразно-ланцюгова реакція, в котрій використовується матрична ДНК являє собою геномну ДНК, приготовану із нетрансгенної рослини. Якщо в цьому випадку одержується очікуваний результат - відсутня ампліфікація трансгенного PCR-продукту, але наявна ампліфікація ендегенного PCR-продукту, - то це означає, що в зразку геномної ДНК відсутня достатня для виявлення фоновна ампліфікація трансгена.

5.2.3. Праймери

Використовувалися такі праймери, що специфічно розпізнають трансген і фланкувальну послідовність події MS-BN1:

BNA01: 6'-дСТ.Тдд.АСТ.АТА.АТА.ССТ.дАС-3' (SEQ ID 12)
(MDB201) (ціль: трансген)

BNA02: 6'-ТдА.САС.ТТТ.дАд.ССА.СТС.д-3'¹ (SEQ ID 19)

(VDS51) (ціль: ДНК рослини)

Для ідентифікації рослинного матеріалу, що містить подію RF-BN1, використовувалися нижчеперелічені праймери, які специфічно розпізнають трансген і фланкувальну послідовність події RF-BN1.

BNA03: 5'-ТСА.ТСТ.АСg.гСА.АТg.ТАС.САg-3' (SEQ ID 23)

(MDB193) (ціль: трансген)

BNA04: 6'-Тдд.АСС.ССТ.Адд.ТАА.АТд.СС-3'

(SEQ ID 41)

(MDB268) (ціль: ДНК рослини)

Праймери, націлені на ендегенну послідовність, завжди включаються в живильну PCR-суміш. Ці праймери служать як засоби внутрішнього контролю у невідомих зразках і для ДНК позитивного контролю. Позитивний результат, одержуваний з ендегенною праймерною парою, свідчить про те, що в препараті геномної ДНК для одержання цільового PCR-продукту є достатньо ДНК адекватної якості.

При цьому використовуються такі ендегенні праймери:

BNA05: 5'-AAC.gAg.TgT.CAg .CTA.дAC.CAd.C-3' (SEQ ID 42)

BNA06: 5'-CдC.АдТ.ТСТ.дТд. AAC.ATC.дAC.C-3¹ (SEQ ID 43)

5.2.4. Ампліфіковані фрагменти

Очікуваними ампліфікованими фрагментами у PCR-реакції є: Для праймерної пари BNA05-BNA06: 394 ьр (ендегенний контроль) Дл« праймерної пари BNA01-BNA02: 280 ьр (елітна подія MS-BN1) Для праймерної пари BNA03-BNA04: 215 ьр (елітна подія RF-BN1)

5.2.5. Умови PCR-реакції

PCR-суміш для реакційного об'єму 50 мкл містить: 5 мкл матричної ДНК

5 мкл 10 х буфер для ампліфікації (що постачається разом з Taq полімеразою) 1 мкл IOmMдNTP

1 мкл BNA01 (MS-BN1) або BNA03 (RF-BN1)(10 пмоль/ мкл) 1 мкл BNA02 (RF-BN1) або BNA04 (RF-BN1) (10 пмоль/ мкл) 0,5 мкл BNA05 (10 пмоль/ мкл) 0,5 мкл BNA06 (10 пмоль/ мкл) 0,2 мкл Taq ДНК полімерази (5 блоків/ мкл) вода де 50 мкл

Для одержання оптимальних результатів потрібно дотримуватися такого профілю термоцикування:

4 хвилини при 95 °C

Далі: 1 хвилина при 95°C

1 хвилина при 57°C

2 хвилини при 72°C

Протягом 5 циклів

Далі: 30 секунд при 92 °C

30 секунд при 57°C

1 хвилина при 72°C

Протягом 22-25 циклів

Далі: 5 хвилин при 72 °C

5.2.6. Аналіз в агарозному гелі

У 1,5% агарозний гель (трисборатний буфер) з маркером відповідної молекулярної маси (наприклад, сходовим маркером завдовжки 10 ьр, PHARMACIA) поміщали PCR-зразки об'ємом від 10 до 20 мкл.

5.2.7. Оцінка результатів

Дані, одержані від зразків ДНК трансгенної рослини в одному PCR-експерименті з однією PCR-сумішшю, не можуть бути визнані задовільними, якщо 1) ДНК позитивний контроль показує очікувані PCR-продукти (трансгенні і ендегенні фрагменти), 2) ДНК негативний контроль дає негативний результат щодо PCR-ампліфікації (відсутність фрагментів) і 3) контроль з ДНК дикого типу показує очікуваний результат (ампліфікацію ендегенного фрагмента).

Доріжки, на яких спостерігаються помітні кількості трансгенних і ендегенних PCR-продуктів очікуваних розмірів, свідчать про те, що відповідна рослина, з якої була приготована геномна матрична ДНК, успадкувала елітні події MS-BN1 і/або RF-BN1. Доріжки, на котрих не спостерігається помітних кількостей будь-якого з трансгенних PCR-продуктів, але які показують помітні кількості ендегенного PCR-продукту, вказують на те, що відповідна рослина, із якої була приготована дана геномна матрична ДНК, не містить елітної події. Доріжки, на котрих не спостерігається помітних кількостей ендегенних і трансгенних PCR-продуктів, вказують на те, що якість і/або кількість геномної ДНК не дозволяють генерувати PCR-продукт. Ці рослини до уваги не приймаються. Процес приготування геномної ДНК при цьому повинний бути повторений, і потрібно буде провести новий PCR-експеримент з виконанням відповідного контролю.

5.2.8. Використання дискримінаційного PCR-протоколу для ідентифікації подій MS-BN1 і RF-BN1

Листяний матеріал WOSR від рослин, що містили MS-BN1, RF-BN1 або іншу трансгенну подію, піддавався випробуванням за вищеописаним протоколом. Для негативного контролю використовувалися зразки від

WOSR дикого типу.

Результати PCR-аналізу ілюстровані на Фіг. 4 і 5.

На Фіг. 4 показаний результат, одержаний згідно з протоколом PCR-ідентифікації елітних подій для MS-BN1 на двох зразках WOSR (доріжки 1 і 2). Доріжка 1 розпізнається як така, що містить елітну подію, оскільки на ній виявляється смуга 280 бп, у той час як зразок на доріжці 2 не містить події MS-BN1.

На Фіг. 5 показаний результат, одержаний згідно з протоколом PCR-ідентифікації елітних подій для RF-BN1 на двох зразках WOSR (доріжки 1 і 2). Доріжка 1 розпізнається як така, що містить елітну подію, оскільки на ній виявляється смуга 215 бп, у той час як зразок на доріжці 2 не містить події RF-BN1.

Приклад 6. Продукування гібридного насіння за допомогою подій MS-BN1 і RF-BN1 у рослин WOSR

Рослини WOSR чоловічої стерильності, що містили подію MS-BN1, схрещувалися з рослинами WOSR, гомозиготними з RF-BN1. Із MS-BN1 відбирали гібридне насіння і депонували його в ATCC під номером доступу PTA-730.

Це гібридне насіння знов висівали в поле. Рослини з нього виказували 100% фертильність і демонстрували оптимальні агрономічні властивості. Одні з цих гібридних рослин містили як MS-BN1, такі RF-BN1, а інші-лише RF-BN1.

Приклад 7. Уведення подій MS-BN1 і RF-BN1 у кращі культивари WOSR

Елітні події MS-BN1 і RF-BN1 були введені шляхом повторюваного зворотного схрещування рослин, що містили подію MS-BN1 або RF-BN1, відповідно, у численні, важливі із сільськогосподарської точки зору культивари WOSR.

Спостерігалось, що інтрагресія елітних подій у ці культивари не чинить значного впливу на будь-які бажані фенотипи або агрономічні властивості цих культиварів (відсутність зумовленого зв'язуванням гальмування), у той час як експресія трансгена, як визначається толерантністю до глюфосинату, задовольняє комерційно прийнятним рівням. Це підтверджує елітний статус подій MS-BN1 і RF-BN1.

У наведеній нижче Формулі винаходу термін «рослина», якщо не зазначено іншого, охоплює собою поняття рослинної тканини на будь-якій стадії зрілості, а також поняття насіння, тканини або органів, узятих або виведених із такої рослини, включаючи, без обмеження, будь-яке насіння, листя, стеблини, квіти, коріння, поодинокі клітини, гамети, клітинні культури, тканинні культури або протопласти.

Насіння, що містило елітну подію MS-BN1 і елітну подію RF-BN1 або тільки елітну подію RF-BN1, було депоноване в Американську колекцію тканинних культур під номером доступу PTA-730.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АВЕНТИС КРОПСАЄНС Н.В.

<120> ГІБРИДНИЙ ОЗИМИЙ ОЛІЕНАСІННЄВИЙ РАПС І СПОСОБИ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ

<130> EE-BN1

<140>

<141>

<160> 43

<170> Запатентовано у версії 2.0

<210> 1

<211> 4946

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Т-ДНК плазміди рТНВ107

<220>

<221> неоднорідна ознака

<222> (964)..(4906)

<223> фрагмент Hind III

<400> 1

```

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgctcg actcggccgt cgagtacatg 60
gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa 120
atattttattg ataaaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaattttatt 180
gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
gggcggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccggtg 420
cttgaagccg gccgcccgcg gcatgccgcg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg 480
cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc 540
cagggacttc agcagggtgg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg 600
ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgctgcct tccaggggcc 660
cgcgtaggcg atgccggcga cctcgcgctc cacctcggcg acgagccagg gatagcgctc 720
ccgcagacgg acgaggctcg ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt 780
gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatggtgcag accgccggca tgtccgcctc 840
ggtggcacgg cggatgtcgg cggggcgctg ttctgggtcc attgttcttc ttactcttt 900
gtgtgactga ggtttggtct agtgctttgg tcatctatat ataagataa caacaatgag 960
aacaagcttt ggagtgatcg gaggtcttag gatacatgag attcaagtgg actaggatct 1020

```

acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca 1080
aaggcctaag gagaggtggt gagacccta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt 1140
ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aatttgttga tgggtggagtg 1200
gtgcttgctc attttacttg cctggtggac ttggcccttt ccttatggg aatttatatt 1260
ttacttacta tagagctttc atacctttt ttaccttgg atttagttaa tatataatgg 1320
tatgattcat gaataaaaat gggaaatttt tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta 1380
ggtgaaactg tggaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgcct tttactagaa 1440
ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500
acagaactat gtttaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt 1560
tacaacaagt cataagccca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620
aatattacaa atcataagcc caacaaagt attgatcaaa aaaaaaaaac gcccaacaaa 1680
gctaaacaaa gtccaaaaaa aacttctcaa gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740
ctatacacaa aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctctacat 1800
cacttcccta tcgattgaa tgttttactt gtacctttc cgttgcaatg atattgatag 1860
tatgtttgtg aaaactaata gggtaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttggtccaa 1920
gattttccga gagctttcta gtgaaagcc catcaccaga aaatttactag taaaaataat 1980
caccaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaa 2040
gaaaacgtat gaatgttatt agtaaaggt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca 2100
gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtg ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160
atatataata tgctttacaa cacttggatt ttttttggg ggctggaatt ttaaatctac 2220
atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat 2280
atatgtgttc gtgtatatat gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340
atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400
tagtgcattt tttctaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460
taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520
attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataataca caatctcgac 2580
cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa ttctgaccgc ggtaccgga attcgagctc 2640
ggtaccggtg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc 2700
tagtttgccg gctatatatt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760
atcataaaaa cccatctcat aaataacgct atgcattaca tgttaattat tacatgctta 2820
acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880
aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga gccggaaagt 2940
gaaattgacc gatcagagtt tgaagaaaaa tttattacac actttatgta aagctgaaaa 3000
aaacggcctc cgcaggaagc cgtttttttc gttatctgat ttttgtaaag gtctgataat 3060
ggtccgttgt tttgtaaact agccagtcgc ttgagtaaag aatccggtct gaatttctga 3120
agcctgatgt atagttaata tccgcttcac gccatgttcg tccgcttttg cccgggagtt 3180
tgcttccct gtttgagaag atgtctccgc cgatgctttt ccccgagcg acgtctgcaa 3240

```

ggttcccttt tgatgccacc cagccgaggg cttgtgcttc tgattttgta atgtaattat 3300
caggtagctt atgatatgtc tgaagataat ccgcaacccc gtcaaactgt ttgataaccg 3360
gtaccatggt agctaatttc ttaagtaaa aactttgatt tgagtgatga tgttgtagtg 3420
ttacacttgc accacaaggg catatataga gcacaagaca tacacaacaa cttgcaaaac 3480
taacttttgt tggagcattt cgaggaaaat ggggagtagc aggctaactc gagggtaaca 3540
ttaaggtttc atgtattaat ttgttgcaa catggactta gtgtgaggaa aaagtaccaa 3600
aattttgtct caccctgatt tcagttatgg aaattacatt atgaagctgt gctagagaag 3660
atgtttattc tagtccagcc acccacctta tgcaagtctg cttttagctt gattcaaaaa 3720
ctgatttaat ttacattgct aaatgtgcat acttcgagcc tatgtcgctt taattcgagt 3780
aggatgtata tattagtaca taaaaaatca tgtttgaatc atctttcata aagtgacaag 3840
tcaattgtcc cttcttggtt ggcactatat tcaatctgtt aatgcaaatt atccagtta 3900
acttagctag atatccaatt ttgaataaaa atagctcttg attagtaaac cggatagtga 3960
caaagtcaca tatccatcaa acttctggtg ctctgggcta agttctgac gacatggggt 4020
taaaatttaa attgggacac ataaatagcc tatttgtgca aatctcccca tcgaaaatga 4080
cagattgtta catggaaaac aaaaagtcct ctgatagaag tcgcaaagta tcacaatttt 4140
ctatcgagag atagattgaa agaagtgcag ggaagcgggt aactggaaca taacacaatg 4200
tctaaattaa ttgcattcgc taacaaaaaa gtgtattact ctctccggtc cacaataagt 4260
tatttttttg cccttttttt atggtccaaa ataagtgagt ttttttagatt tcaaaaaatga 4320
tttaattatt tttttactac agtgcccttg gagtaaatgg tgttgaggta tgtgttagaa 4380
atgtttatgt gaagaaatag taaaggttaa tatgatcaat ttcattgcta tttaagtta 4440
aaatgtgaat ttcttaactc gtgtgaaaac aacaaaaaaa tcacttattg tggaccggag 4500
aaagtatata aatatatatt tggaagcgac taaaaataaa cttttctcat attatacgaa 4560
cctaaaaaca gcatatggta gtttctaggg aatctaaatc actaaaatta ataaaagaag 4620
caacaagtat caatacatat gatttacacc gtcaaacacg aaattcgtaa atatttaata 4680
taataaagaa ttaatccaaa tagcctccca ccctataact taaactaaaa ataaccagcg 4740
aatgtatatt atatgcataa tttatatatt aaatgtgtat aatcatgtat aatcaatgta 4800
taatctatgt atatgggttag aaaaagtaaa caattaatat agccggctat ttgtgtaaaa 4860
atccctaata taatcgcgac ggatccccgg gaattccggg gaagcttaga tccatggagc 4920
catttacaat tgaatatatc ctgccg

```

4946

<210> 2

<211> 4832

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Т-ДНК плазмиди рТНW118

<220>

<221> неоднорідна ознака

<222> (1883)..(4065)

<223> фрагмент рестрикції HpaI

<400> 2

```
aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg 60
gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattccatc ttgaaagaaa tatagttaa 120
atatttattg ataaaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaatttatt 180
gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
gggcggtacc ggcaggctga agtcaggctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccgtg 420
cttgaagccg gccgccgca gcatgccgcg gggggcatat ccgagcgctt cgtgcatgcg 480
cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc 540
cagggacttc agcagggtgg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg 600
ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgctgcctt tccaggggcc 660
cgcgtaggcg atgccggcga cctcggcgtc cacctcggcg acgagccagg gatagcgctc 720
ccgcagacgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt 780
gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatggtgcag accgccggca tgtccgcctc 840
ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgtcg ttctgggtcc attgttcttc tttactcttt 900
gtgtgactga ggtttggtct agtgctttgg tcatctatat ataagataa caacaatgag 960
aacaagcttt ggagtgatcg gagggtctag gatacatgag attcaagtgg actaggatct 1020
acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca 1080
aaggcctaag gagagggtgt gagaccctta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt 1140
ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aatttgttga tgggtggagtg 1200
gtgcttgctc atttacttgg cctggtggac ttggcccttt ccttatgggg aatttataat 1260
ttacttacta tagagcttcc ataccttttt tttaccttgg atttagttaa tatataatgg 1320
tatgattcat gaataaaaat gggaaatttt tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta 1380
ggtgaaactg tggaaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgctt tttactagaa 1440
ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500
acagaactat gtttaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcactctgt tacaatatgt 1560
tacaacaagt cataagccca acaaagttag cagctctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620
aatattacaa atcataagcc caacaaggtt attgatcaaa aaaaaaaaaa gcccaacaaa 1680
gctaaacaaa gtccaaaaaa aacttctcaa gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740
ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctcctacal 1800
cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtaccttttc cgttgcaatg atattgatag 1860
tatgtttgtg aaaactaata gggttaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttggtccaa 1920
gattttccga gagctttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat 1980
caccaattag gtttcttatt atgtgcaaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaaat 2040
gaaaacgtat gaatgttatt agtaaattgt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca 2100
```


gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtggt ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160
atatatataa tgctttacaa cacttggaatt tttttttgga ggctggaatt tttaatctac 2220
atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat 2280
atatgtgttc gtgtatatat gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340
atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400
tagtgcatatt tttctaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460
taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520
attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac 2580
cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtaccggga attcgagctc 2640
ggtaccggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc 2700
tagtttgcgc gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760
atcataaaaa cccatctcat aaataacgct atgcattaca tgtaattat tacatgctta 2820
acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880
aagaaacttt attgcaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga ccaagcttgc 2940
gggtttgtgt ttccatattg ttcactctcc attgatcgta ttaagaaagt atgatggtga 3000
tgtcgagcc ttccgctttc gcttcacgga aaacctgaag cactctctcg gcgccatttt 3060
cagtcagctg cttgctttgt tcaaactgcc tccattccaa aacgagcggg tactccacc 3120
atccggtcag acaatcccat aaagcgcca gggtttcacc gtagtattcc ggaagggcaa 3180
gctccttttt caatgtctgg tggaggtcgc tgatacttct gatttgttcc ccgttaatga 3240
ctgctttttt catcggtagc taatttcttt aagtaaaaac tttgatttga gtgatgatgt 3300
tgtactgtta cacttgacc acaaggcat atatagagca caagacatac acaacaactt 3360
gcaaaactaa cttttgttgg agcatttcga ggaaaatggg gagtagcagg ctaatctgag 3420
ggtaacatta aggtttcatg tattaatttg ttgcaaacat ggacttagtg tgaggaaaaa 3480
gtaccaaaat tttgtctcac cctgatttca gttatggaaa ttacattatg aagctgtgct 3540
agagaagatg tttattctag tccagccacc cacttatgc aagctgctt ttagcttgat 3600
tcaaaaactg atttaattta cattgctaaa tgtgcatact tcgagcctat gtcgctttaa 3660
ttcgagtagg atgtatatat tagtacataa aaaatcatgt ttgaatcatc tttcataaag 3720
tgacaagtca attgtccctt cttgtttggc actatattca atctgttaat gcaaattatc 3780
cagttatact tagctagata tccaattttg aataaaaata gctcttgatt agtaaaccgg 3840
atagtgacaa agtcacatat ccatcaaact tctggtgctc gtggctaagt tctgatcgac 3900
atggggttaa aatttaaatt gggacacata aatagcctat ttgtgcaaat ctccccatcg 3960
aaaatgacag attgttcat ggaaaacaaa agtcctctg atagaagtcg caaagtatca 4020
caattttcta tcgagagata gattgaaaga agtgcaggga agcggttaac tggaacataa 4080
cacaatgtct aaattaattg cattcgctaa ccaaaaagtg tattactctc tccgggtccac 4140
aataagttat tttttggccc tttttttatg gtccaaaata agtgagtttt ttagatttca 4200
aaaatgattt aattattttt ttactacagt gcccttgag taaatggtgt tggagtatgt 4260
gttagaaatg tttatgtgaa gaaatagtaa aggttaatat gatcaatttc attgctattt 4320

aatgttaaaa tgtgaatttc ttaatctgtg tgaaaacacc aaaaaatcac ttattgtgga 4380
ccggagaaag tatataaata tatatttgga agcgactaaa aataaacttt tctcatatta 4440
tacgaaccta aaaacagcat atggtagttt ctagggaatc taaatcacta aaattaataa 4500
aagaagcaac aagtatcaat acatatgatt tacaccgtca aacacgaaat tcgtaaatat 4560
ttaatataat aaagaattaa tccaaatagc ctcccaccct atkacttaaa ctaaaaataa 4620
ccagcgaatg tatatttatat gcataattta tatattaaat gtgtataatc atgtataatc 4680
aatgtataat ctatgtatat ggtagaaaa agtaaacaat taatatagcc ggctatttgt 4740
gtaaaaatcc ctaatataat cgcgacggat ccccggaat tccggggaag cttagatcca 4800
tgagaccatt tacaattgaa tatatcctgc cg 4832

<210> 3
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 248

<400> 3
catgccctga cccaggctaa gtattttaac tttaaccact ttgctccgac agtcccattg 60

<210> 4
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 249

<400> 4
caatgggact gtcggaggac tgagggccaa agcttggctc ttagcctggg tcagggcattg 60

<210> 5
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 247

<400> 5
ccgtcaccga gatctgatct caccgcg 26

<210> 6
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 250

 <400> 6
 gcactgaggg ccaaagcttg gctc 24

 <210> 7
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 251

 <400> 7
 ggatcccccg atgagctaag ctagc 25

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

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 254

 <400> 8
 cttagcctgg gtcagggcat g 21

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 258

 <400> 9
 ctacggcaat gtaccagctg 20

 <210> 10
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер SP6

 <400> 10
 taatacgact cactataggg cga 23

 <210> 11

<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер Т7

<400> 11
ttaggtgac actatagaat ac 22

<210> 12
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 201

<400> 12
gcttggaacta taatacctga c 21

<210> 13
<211> 953
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
5' фланкувальну ділянку події MS-BN1

<220>
<221> неоднорідна ознака
<222> (1)..(24)
<223> вектор pGEM®-T

<400> 13
ccnngccgccc atggccgcgg gattcttagc ctgggtcagg gcatgcatgg tgtgatccaa 60
agactttctc ggcccaaata ctaatcatca caagtcatgc atgatctgct cgggatggcc 120
aagaaaaatc gaaccatga caatattcac agttgtaagt tttttaccag tagacaaata 180
ccacttggtt taacatattg taaacttaat atatagaaga tggttcctatt cagaaaaataa 240
tatatgtata tatataaaat ttattggcg actcgaggat gcacagaaat ataaaatggt 300
ggtcgcttag accatctcca atgtatttct ctatttttac ctctaaaata aaggagctct 360
ataatagagg tgggttttgc tccaatgtat ttctttaaaa tagagatctc tacatataga 420
gcaaaatata gaggaatggt atttcttcct ctataaatag aggagaaaat agcaatctct 480
attttagagg caaaaataga gatbsgttgg agtgattttg cctctaaatg ctattataga 540
ggtagaaata gaggtgggtt ggagatgctc ttactatttt catagtaggt gaaaacttga 600
aactagaaag ctttgagtg tacgagtggg aaacctctct ttgtagaaac atacacatgc 660
catttagtta actagttgac atagattttt gagtcagata actttaagaa tatatatggt 720

tggatgagag ttgacactt tgagccactc gaaggacaaa ttttaaaaac ttgtgggatg 780
 ctgtggccat aaaccttgag gacvstttga tcatattcta ttaactacag tacgaatatg 840
 attcgacctt tgcaattttc tcttcaggta ctcggccgtc gaactcggcc gtcgagtaca 900
 tggtcgataa gaaaaggcaa ttgtagatg ttaattccca tcttgaaaga aat 953

<210> 14
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 611

<400> 14
 ngtcgaswgt ntwcaa 16

<210> 15
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 259

<400> 15
 gtgcagggaa gcgggttaact gg 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 260

<400> 16
 cctttggagt aaatggtggt gg 22

<210> 17
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 24

<400> 17
 gcgaatgtat attatatgca 20

<210> 18

<211> 537
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
3' фланкувальну ділянку події MS-BN1

<400> 18
gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat 60
gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttggtga 120
aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagctta gatccatgga 180
tttggtatga taacsaaaaa caccctcctt ttattataa aggtagggat agctaactctg 240
ttattcgggtt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatttt 300
tttggtcgtt ttcattacaa tccaagacaa gttagggtta ttacatttta csaaaaaaaaa 360
aggtttggtt tattgtgaac attgctcggg ttattttaa tttgattcta ttcaaagggtc 420
aatccgtatt taacaagtaa actagtcttt atataatctt aaatctaacg atctttgatt 480
tttaaattgc atttanctat gtctctctg gcgtatatgg tcctcttgaa aacactc 537

<210> 19
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 51

<400> 19
tgacactttg agccactcg 19

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

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 48

<400> 20
ggaggggtgtt ttggttatc 20

<210> 21
<211> 178
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
делецію цільового сайту події MS-BN1

<400> 21

gacactttga gccactcgaa ggacaaattt taaaaacttg tgggatgctg tggccataaa 60
ccttgaggac gctttgatca tattctatta actacagtac gaatatgatt cgacctttgc 120
aattttctct tgttttctaa ttcatatgga tttgttatga taacacaaaa caccctcc 178

<210> 22

<211> 1198

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: ділянка інсерції події MS-BN1

<400> 22

catggtgtga tccaaagact ttctcgccc aaatactaata catcacaagt catgcatgat 60
ctgctcggga tggccaagaa aaatcgaacc catgacaata ttcacagttg taagtttttt 120
accagtagac aaataccact tggtttaaca tattgtaaac ttaatatata gaagatgttc 180
ctattcagaa aataatatat gtatatatat aaaattttat tggcgactcg aggatgcaca 240
gaaatataaa atgttggtcg cttagaccat ctccaatgta tttctctatt tttacctcta 300
aaataaagga gctctataat agaggtgggt ttgctccaa tgtatttctt taaaatagag 360
atctctacat atagagcaaa atatagagga atgttatattc ttcctctata aatagaggag 420
aaaaatagcaa tctctatttt agaggcaaaa atagagatbs gttggagtga ttttgcctct 480
aaatgctatt atagaggtag aaatagaggt gggttggaga tgctcttact attttcatag 540
taggtgaaaa cttgaaacta gaaagctttg gagtgtaga gtggaaaacc tctctttgta 600
gaaacataca catgccattt agttaactag ttgacataga tttttgagtc agataacttt 660
aagaatatat atgtttggat gagagtttga cactttgagc cactcgaagg acaaatttta 720
aaaacttggt ggatgctgtg gccataaacc ttgaggacvs tttgatcata ttctattaac 780
tacagtacga atatgattcg acctttgcaa ttttctcttc aggttttcta attcatatgg 840
atttgttatg ataacaaaa acaccctcct ttttattata aaggtaggga tagctaactc 900
gttattcggg tttgattaga gatattaatc ccgttttatc aagtacagtt tgatgtattt 960
ttttgttcgt tttcattaca atccaagaca agttaggttt attacatttt accaaaaaaa 1020
aaggtttggg ttattgtgaa cattgctgcg gtttatttaa atttgattct attcaaagg 1080
caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gatctttgat 1140
ttttaaatg catttancta tgtcctctct ggcgtatatg gtctctttga aaacactc 1198

<210> 23

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: праймер 193

<400> 23

tcacatctacgg caatgtacca gc

22

<210> 24

<211> 1077

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
5' фланкувальну ділянку події RF-BN1

<220>

<221> неоднорідна ознака

<222> (1)..(45)

<223> вектор pGEM®-T

<220>

<221> неоднорідна ознака

<222> (1061)..(1077)

<223> вектор pGEM®-T

<400> 24

gagctctccc atatggtcga cctgcaggcg gccgcactag tgattcttag cctgggtcag 60
ggcatggcat gtctgatggt acatgctaaa tgctatatatt cctgtttaaa gtgttaaaat 120
cattttctga tggaactaaa tccagtttta agagtaactg acaagtacaa ttaagcacia 180
caatataata gtagtaattg gcatctttga ttgttaaata tcaaaacagt aaagttacaa 240
aaaaaaaaac caaaccaata atgaagactt ggccggagaca gtgccgtgcg aagggttttcg 300
gagggtccgag acgaggttcaa aaatacattt tacataatat atttttcata tatatatata 360
tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct tcaccaaaat 420
tttataaact aaatttttta atcatgaaca aaaagtatga atttgtaata taaatacaaa 480
gatacaaat tttgattgaa atattggtag ctgtcaaaaa agtaaactctt agaatttaaa 540
ttaactatag taaactatat attgaaaata ttataaattt ttatcaaatt ctcataaata 600
tataaaataa atctaactca tagcatataa aaagaagact aatgtggatc aaaatattta 660
cagtttttta gaagtagaat ctttatagtt ttatttaaaa tatagcaaaa atgatacaaa 720
acctagtay ttaaggagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaat ctatctaaaa 780
aaatatgtta actaccatgc aaaagtattt tttttgtaat tagaaaccct gaaatttgta 840
caaaacttgg acccctaggt aaatgccttt ttcatctcgc gataagaaaa ggcaatttgt 900
agatgttaat tcccatcttg aaagaaatat agtttaaata ttatttgata aaataacaag 960
tcaggatta tagtccaagc aaaaacataa atttattgat gcaagtttaa attcagaaat 1020
atttcaataa ctgattatat cagctggtac atcgccgtag aatcccgcg catggcg 1077

<210> 25

<211> 16

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 286

 <400> 25
 ntgcgaswga nawgaa 16

 <210> 26
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 314

 <400> 26
 gtaggaggtt gggaagacc 19

 <210> 27
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 315

 <400> 27
 gggctttcta ctagaaagct ctcgg 25

 <210> 28
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 316

 <400> 28
 ccgataggga agtgatgtag gagg 24

 <210> 29
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 288

 <400> 29

<210> 30
<211> 1501
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
3' фланкувальну ділянку події RF-BN1

<220>
<221> неоднорідна ознака
<222> (1)..(16)
<223> вектор pGEM®-T

<220>
<221> неоднорідна ознака
<222> (1458)..(1501)
<223> вектор pGEM®-T

<400> 30
ccatggccgc gggattgtag gaggttgga agacaggccc agaaagagat ttatctgact 60
cgttttgtgt atagttttca atgttcataa aggaagatgg agacttgaga agtttttttt 120
ggactttgtt tagctttgtt gggcgttttt ttttttgat caataacttt gttgggctta 180
tggtcgataa gcgtgcgcgt gtctgatggt acatgctaaa tgctatatat ctgtttaaag 240
tgttaaaatc attttctgat ggaactaaat ccagttttta gagtaactga caagtacaat 300
taagcacaaac aataaaatag tagtaattgg catctttgat tgttaaatat caaaacaata 360
aagttacaaa aaaaaatacc aaaccaataa tgaagacttg gcggagacag tgccgtgcga 420
aggttttcgg aggtccgaga cgagttcaaa aatacatttt acataatata ttttcatat 480
atatatatat atataacatt caaaagtttg aattattaca taaacgtttt cttaaattttc 540
ttcaccacaaa ttttataaac taaaattttt maatcatgaa caaaaagtat gaatttgtaa 600
tataaatacm aagatacaaa tttttgattg aaatattggt agctgtcaaa aaagtaaatac 660
ttagaattta aattaactat agtaaaactat atatggaaaa tattataaat ttttatcaaa 720
ttctcataaa tatataaaat aaatctaact catagcatat aaaaagaaga ctaatgtgga 780
tcaaratatt tacagttttt tagaagtaga atctctatag ttttatftaa aatatagcaa 840
aaatgatcac aaacctagtt actttaacca gaagtccaat tcaaaatcaa ataaaaataa 900
aaatctatct aaaaaaatat gttaactacc atgcaaaagt attttttttt gtaattagaa 960
accctgaaat ttgtacaaaa ctgggacccc taggtaaatt ccctagaaag tatcctatta 1020
gcgtcgacaa actggttgctc atatttttct ctcttactt tatatcatat actaatatan 1080
gnagatgatc taattaatta ttcattttcca tgctagctaa ttcaagaaaa agaaaaaaaa 1140
ctattatcta aacttatatt cgagcaacac ctcgagata acaggatata tgtcattaat 1200
gaatgcttga actcatctcg cgaactcatc tcgcatcgct tatagccaca aagatccaac 1260
ccctctcttc aatcatatat cagtagtaca atacaaatag atattgtgag cacatatgcc 1320

gtctagtact gatgtgtaca tgtagaggag ccgcaaatgt ttagtcactc caacaaatga 1380
gcatgaccac gcatcttctg atgatgtaca gccgtccctt ttgtctcttc aaatatactc 1440
caagcttctt gctgcataaa tcaactagtgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag 1500
с 1501

<210> 31
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 269

<400> 31
ggtttttcgga ggtccgagac g 21

<210> 32
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 283

<400> 32
cttggaacccc taggtaaatg c 21

<210> 33
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 284

<400> 33
gtacaaaaact tggaccccta gg 22

<210> 34
<211> 1068
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
делецію цільового сайту події RF-BN1

<400> 34
cgcgttggga gctctcccat atggtcgacc tgcaggcggc cgcactagtg attcttggac 60
ccctaggtaa atgccttttt caaaagcctc taagcacggt tctgggcggg gagtcagcga 120

gaaaaaaaga tatttcccta gaaagtatcc tattagcgtc gacaaactgt tgctcatatt 180
 tttctctcct tactttatat catacactaa tataaaaaga tgatctaatt aattattcat 240
 ttccatgcta gctaattcaa gaaaaagaaa aaaactatta tctaaactta tattcgagca 300
 acacctcgga gataacagga tatatgttat taatgaatgc ttgaactcat ctcggaact 360
 catctcgcat cgcttatagc cacaaagatc caaccctct cttcaatcat atatcagtag 420
 tacaatacaa atagatatgt tgagcacata tgccgtctag tactgatgtg tatatgtaga 480
 gganngcaaa tgtttagtca ctccaacaaa tgagcatgac nacgcatctt ctgatgatgt 540
 acagccgtcc cttttgctct ctcaaatatc ctccaagctt cttgctgcat ggaatcttct 600
 tcttggtgtc tttcatgata acaaaatcta acgagagaga aacccttagt caagaaaaaa 660
 caaataaaac tctaacgaga gtgtgtgaga aagtagagag tatgtgtgag tgacggagag 720
 aaagtgagac cataaagatg ttgtgcaaag agagcaagac ttaacctata tatactcaca 780
 tacacgtaca catcataccc attanagata ataaaaagga aaaaggaaca actaacaagg 840
 gaactgtatc ccatacttta tctcatcata catgatgcat aatatattct ttcgtatata 900
 aagaaaaatg agcctgatat ttttttattt cgaaactaaa agagtgtcta tttctctctc 960
 ttagagatag tgccatgtca aatttctaag aagtagcaag atttacaag gaatctaaag 1020
 caacccacg cgcattgtgt tcatttctct cgaccatccc gcggccat 1068

<210> 35
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер 57

<400> 35
 gcatgatctg ctcgggatgg c 21

<210> 36
 <211> 909
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
 5' фланкувальну ділянку події MS-BN1 у рослинах WOSR

<400> 36
 tgcatgatct gctcgggatg gccaagaaaa atcgaaccca tgacaatatt cacagttgta 60
 agttttttac sagtagacaa ataccacttg gtttaacata ttgtaaactt aatatataga 120
 agatgttctt attcagaaaa taatatatgt atatatataa aattttattg gcgactcgag 180
 gatgcacaga aatataaaat gttggtcgct tagaccatct ccaatgtatt tctctatttt 240
 tacctctaaa ataaaggaac tctataatag aggtggggtt tactccaatg tatttcttta 300
 aaatagagat ctctacatat agagcaaaat atagaggaat gttatttctt cctctataaa 360

```

tagaggagaa aatagcaatc tctatTTtag aggcaaaaat agagatgggt tggagtgatt 420
ttgcctctaa atgctattat agaggtagaa atagagggtg gttggagatg ctcttactat 480
tttcatagta ggtgaaaact tgaaactaga aagctttgga gtgtacgagt ggaaaacctc 540
tctttgtaga aacatacaca tgccatttag ttaactagtt gacatagatt tttgagtcag 600
ataactttaa gaatatatat gtttgatga gagtttgaca ctttgagcca ctccaaggac 660
aaatTTTaaa aacttggtgg atgctgtggc ccataaacct tgaggacgct ttgatcatat 720
tctattaact acagtacgaa tatgattcga ctttgcaat tttctcttca gtactcggcc 780
gtcgaactcg gccgtcaggt acatggtcga taagaaaagg caatttgtag atgttaattc 840
ccatcttgaa agaaatatag tttaaattatt tattggataa aataacaagt caggtattat 900
agtccaagc 909

```

```

<210> 37
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 68

```

```

<400> 37
ccatatacgc сагагаggac 20

```

```

<210> 38
<211> 522
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
3' фланкувальну ділянку події MS-BN1 у рослинах WOSR

```

```

<400> 38
gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat 60
gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttggtga 120
aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagctta gatccatgga 180
ttgttatga taaccaaaaa caccctcctt tttattataa aggtagggat agctaactctg 240
ttattcgggt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatttt 300
tttgttcgtt ttcattacaa tccaagacaa gttaggttta ttacatttta ccaaaaaaaaa 360
aggtttggtt tattgtgaac attgctgcgg ttttatttaa atttgattct attcaaagg 420
caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gatacttgga 480
tttttaaatt gcatttagct atgtcctctc tggcgtatat gg 522

```

```

<210> 39
<211> 694
<212> ДНК

```

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
5' фланкувальну ділянку події RF-BN1 у рослинах WOSR

<400> 39

```
ggttttcggg ggtccgagac gagttcaaaa atacatttta cataatatat ttttcatata 60
tatatatata tataacatttc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct 120
tcaccaaaat ttataaaact aaaattttta aatcatgaac aaaaagtatg aatttgtaat 180
ataaatacaa agatacaaat ttttgattga aatattggta gctgtcaaaa aagtaaactct 240
tagaatttaa attaaactata gtaaaactata tattgaaaat attataaatt tttatcaaat 300
tctcataaat atataaaata aatctaactc atagcatata aaaagaagac taatgtggat 360
caaaatattt acagttttttt agaagtagaa tctttatagt tttattttaa atatagcaaa 420
aatgatcaca aacctagtta ctttaaccag aagtccaatt caaaatcaaa taaaaataaa 480
aatctatcta aaaaaatatg ttaactacca tgcaaaagta tttttttttg taattagaaa 540
ccctgaaatt tgtacaaaac ttggaccctt aggtaatgc ctttttcatc tcgcgataag 600
aaaaggcaat ttgtagatgt taattcccat cttgaaagaa atatagttta aatatttatt 660
gataaaataa caagtcaggt attatagtcc aagc 694
```

<210> 40

<211> 1279

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: послідовність, що містить
3' фланкувальну ділянку події RF-BN1 у рослинах WOSR

<400> 40

```
ggggggtttt ttttttgatc aataactttg ttgggcttat ggtcgataag cgtgcgcatg 60
tctgatggta catgctaaat gctatatctt tgtttaaagt gttaaaatca ttttctgatg 120
gaactaaatc cagttttaag agtaactgac aagtacaatt aagcacaaca ataaaatagt 180
agtaattggc atctttgatt gttaaatatc aaacaataaa gttcaaaaaa aaataccaac 240
ccaataatga agacttggcg gagacagtgc cgtgcgaagg ttttcggagg tccgagacga 300
gttcaaaaat acattttaca taatatattt ttcatatata tatatatata taacattcaa 360
aagtttgaat tattacataa acgttttcta aattttcttc accaaaattt tataaaactaa 420
aattttttaa tcatgaacaa aaagtatgaa tttgtaatat aaatacaaag atacaaattt 480
ttgattgaaa tattggtagc tgtcaaaaaa gtaaatctta gaattttaat taactatagt 540
aaactatata ttgaaaatat tataaatttt tatcaaattc tcataaatat ataaaataaa 600
tctaactcat agcatataaa aagaagacta atgtggatca aaatatttac agtttttttag 660
aagtagaatc tttatagttt tatttaaaaa atagcaaaaa tgatcacaaa cctagttact 720
ttaaccagaa gtccaattca aatcaaata aaaaataaaa tctatctaaa aaaatatgtt 780
```

aactaccatg caaaagtatt tttttttgta attagaaacc ctgaaatttg taaaaaactt 840
ggacccctag gtaaattccc tagaaagtat cctattagcg tcgacaaact gttgctcata 900
tttttctctc cttactttat atcatacact aatataaaaa gatgatctaa ttaattattc 960
atttccatgc tagctaattc aagaaaaaga aaaaaaactt atatctaaa cttatattcg 1020
agcaacacct cggagataac aggatatatg tcattaatga atgcttgaac tcattctcgcg 1080
aactcatctc gcatcgctta tagccacaaa gatccaacc ctctcttcaa tcatatatca 1140
gtagtacaat acaaatagat attgtgagca catatgccgt ctagtactga tgtgtatatg 1200
tagaggagcc gcaaagtgtt agtcactcca acaaatgagc tatgaccacgc atcttctgat 1260
gatgtacagc cgtcccttt 1279

<210> 41
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер 268
(BNA04)

<400> 41
tggaccccta ggtaaatgcc 20

<210> 42
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

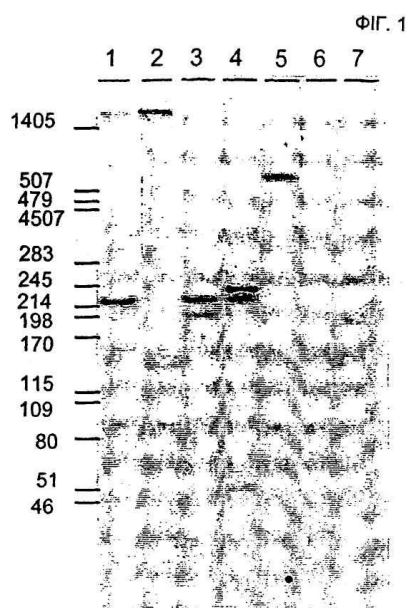
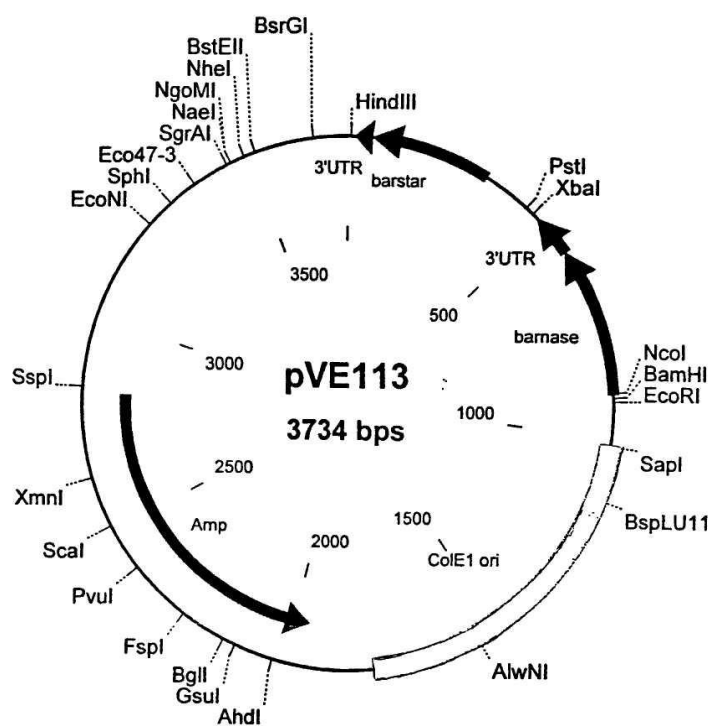
<220>
<223> опис штучної послідовності: праймер BNA05

<400> 42
aacgagtgtc agctagacca gc 22

<210> 43
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер BNA06

<400> 43
cgcagttctg tgaacatcga cc 22



Фиг. 2

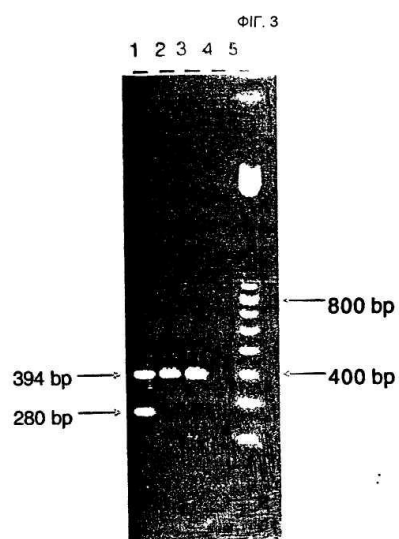
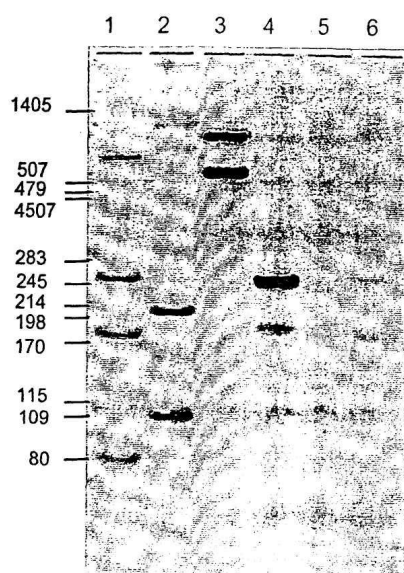
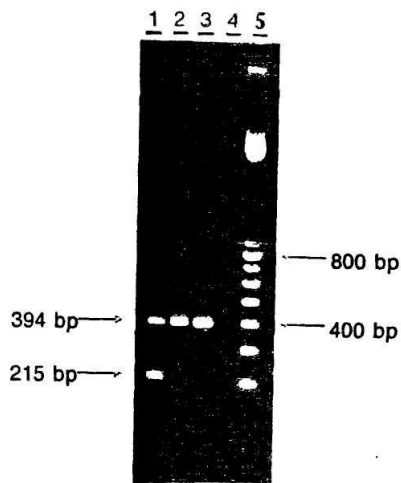


FIG. 3



ФІГ. 5

SEQ ID No 16: праймер 260

SEQ ID No 17: праймер 24

SEQ ID No 18: послідовність, що містить 3'-фланкувальну ділянку події MS-BN1

SEQ ID No 19: праймер 51 (BNA02)

SEQ ID No 20: праймер 48

SEQ ID No 21: послідовність, що містить делецію цільового сайту події MS-BN1

SEQ ID No 22: інсерційна ділянка MS-BN1

SEQ ID No 23: праймер 193 (BNA03)

SEQ ID No 24: послідовність, що містить 5'-фланкувальну ділянку події RF-BN1

SEQ ID No 25: праймер 286

SEQ ID No 26: праймер 314

SEQ ID No 27: праймер 315

SEQ ID No 28: праймер 316

SEQ ID No 29: праймер 288

SEQ ID No 30: послідовність, що містить 3'-фланкувальну ділянку події RF-BN1

SEQ ID No 31: праймер 269

SEQ ID No 32: праймер 283

SEQ ID No 33: праймер 284

SEQ ID No 34: інтеграційна ділянка RF-BN1

SEQ ID No 35: праймер 57

SEQ ID No 36: послідовність, що містить 5'-фланкувальну ділянку події MS-BN1 у WOSR

SEQ ID No 37: праймер 68

SEQ ID No 38: послідовність, що містить 3'-фланкувальну ділянку події MS-BN1 у WOSR

SEQ ID No 39: послідовність, що містить 5'-фланкувальну ділянку події RF-BN1 у WOSR

SEQ ID No 40: послідовність, що містить 3'-фланкувальну ділянку події RF-BN1 у WOSR

SEQ ID No 41: праймер 268 (BNA04)

SEQ ID No 42: праймер BNA05

SEQ ID No 43: праймер BNA06

Приклади

Приклад 1. Трансформація *Brassica napus* геном чоловічої стерильності і геном-відновлювачем

а) Конструювання химерної ДНК, що містить ген барнази, під керуванням тапетального специфічного промотора (pTHW107).