



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94893** (13) **C2**  
(51) **МПК** (2011.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A01H 5/00**  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) **ТРАНСГЕННА РОСЛИНА КУКУРУДЗИ MIR604**

1

(21) a200611007  
(22) 16.02.2005  
(24) 25.06.2011  
(86) PCT/US2005/004790, 16.02.2005  
(31) 60/556,260  
(32) 25.03.2004  
(33) US  
(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.  
(72) ШТЕЙНЕР ГЕНРІ-ЙОРК, US/US, ЧЕН ЕРІК, TW/US, МЕГХІДЖІ МЬОЗ, US/US  
(73) СІНГЕНТА ПАРТІСІПЕЙШНС АГ, СН  
(56) US A 2003120054, 26.06.2003  
(57) 1. Виділена молекула нуклеїнової кислоти, що містить SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4 або комплементи SEQ ID NO: 1-4.  
2. Амплікон, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.  
3. Рослина кукурудзи, яка містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 1.  
4. Рослина кукурудзи за п. 3, у якій після розщеплення геномної ДНК рослини рестриктазою KpnI при гібридизації в строгих умовах з використанням специфічного для cгу3A055 зонда утворюється одна відповідна cгу3A055 смуга гібридизації.  
5. Рослина кукурудзи за п. 3, у якій після розщеплення геномної ДНК рослини рестриктазою KpnI при гібридизації в строгих умовах з використанням специфічного для рті зонда утворюється одна відповідна рті смуга гібридизації.  
6. Пара полінуклеотидних праймерів, яка включає перший полінуклеотидний праймер і другий полінуклеотидний праймер, які функціонують разом у присутності в зразку ДНК-матриці з варіанта кукурудзи MIR604, з утворенням амплікону, який є діагностичним для варіанта кукурудзи MIR604, де перша праймерна послідовність являє собою або є комплементарною до геномної послідовності рослини кукурудзи, які фланкують інсерційний сайт гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудована в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604, а друга полінуклеотидна праймерна послідовність являє собою або є комплементарною до гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудова-

2

на в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604.

7. Спосіб виявлення присутності в біологічному зразку ДНК варіанта кукурудзи MIR604, який полягає в тому, що:

(а) приводять у контакт зразок з першим полінуклеотидним праймером і другим полінуклеотидним праймером, які функціонують разом у реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти в присутності ДНК-матриці з варіанта кукурудзи MIR604 з утворенням амплікону, який є діагностичним для варіанта кукурудзи MIR604;

(б) здійснюють реакцію ампліфікації нуклеїнової кислоти, одержуючи тим самим амплікон; і

(в) виявляють амплікон.

8. Спосіб виявлення в біологічному зразку ДНК варіанта кукурудзи MIR604, який полягає в тому, що:

(а) приводять у контакт зразок, який містить ДНК, із полінуклеотидним зондом, який гібридується в строгих умовах гібридизації й відмивання із ДНК MIR604 і не гібридується в строгих умовах гібридизації й відмивання із ДНК рослини кукурудзи, відмінної від варіанта MIR604;

(б) піддають зразок і зонд гібридизації й відмивання в строгих умовах; і

(в) виявляють гібридизацію зонда із ДНК варіанта MIR604.

9. Спосіб виявлення білка варіанта кукурудзи MIR604 у біологічному зразку, який полягає в тому, що: (а) екстрагують білок зі зразка тканини кукурудзи варіанта MIR604; (б) аналізують екстрагований білок за допомогою імунологічного методу з використанням антитіла, специфічного для інсектицидного білка або білка селектованого маркера, який продукується варіантом MIR604; і (в) виявляють зв'язування антитіла з інсектицидним білком або білком селектованого маркера.

10. Біологічний зразок, отриманий з рослини, тканини або насіння варіанта кукурудзи MIR604, де зразок містить молекулу нуклеїнової кислоти відповідно до пункту 1, і де молекулу нуклеїнової кислоти можна виявляти в зразку за допомогою ме-

(19) **UA** (11) **94893** (13) **C2**

тоту ампліфікації нуклеїнової кислоти або гібридизації нуклеїнової кислоти.

11. Біологічний зразок за п. 10, який вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяне борошно великого помелу, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

12. Екстракт, отриманий з рослини, тканини або насіння варіанта кукурудзи MIR604, що містить молекулу нуклеїнової кислоти відповідно до пункту 1 або її комплемент, де молекулу нуклеїнової кислоти можна виявляти в екстракті за допомогою методу ампліфікації нуклеїнової кислоти або гібридизації нуклеїнової кислоти.

13. Екстракт за п. 12, де зразок вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяне борошно великого помелу, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

14. Спосіб одержання рослини кукурудзи, стійкої принаймні до кукурудзяного жука, який полягає в тому, що:

(а) здійснюють опилання вручну першої батьківської рослини кукурудзи другою батьківською рослиною кукурудзи, де перша або друга батьківська рослина кукурудзи містить ДНК варіанта MIR604,

одержуючи тим самим множину рослин покоління першої генерації;

(б) відбирають рослину покоління першої генерації, за наявності ДНК варіанта MIR604 способом за п. 7;

(в) здійснюють самоопилення вручну рослини покоління першої генерації зі стадії (б), одержуючи тим самим множину рослин покоління другої генерації, та культивують насіння;

(г) відбирають із рослин покоління другої генерації рослину, за наявності ДНК варіанта MIR604 способом за п. 7;

де рослина покоління другої генерації зі стадії (г) містить молекулу нуклеїнової кислоти відповідно до пункту 1.

15. Спосіб за п. 14, який додатково включає стадію зворотного схрещування рослини покоління другої генерації, що містить ДНК варіанта кукурудзи MIR604, із батьківською рослиною, у якій відсутня ДНК варіанта кукурудзи MIR604, з отриманням в результаті зворотного схрещування покоління рослини, яка має стійкість до зараження принаймні кукурудзяним жуком.

16. Набір для виявлення присутності в біологічному зразку нуклеїнових кислот MIR604, який містить принаймні одну молекулу нуклеїнової кислоти, яка являє собою або є комплементарною до молекули нуклеїнової кислоти за п. 1, що функціонує як ДНК-праймер або зонд, специфічний для варіанта кукурудзи MIR604.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід загалом стосується галузі молекулярної біології рослин, трансформації рослин і селекції рослин. Більш конкретно винахід стосується стійких до комах трансгенних рослин кукурудзи, які містять новий трансгенний генотип, і способів виявлення присутності ДНК рослини кукурудзи в зразку й у композиціях.

Передумови створення винаходу

Шкідники рослин є основним чинником, який викликає втрати врожаю важливих сільськогосподарських культур в усьому світі. Щорічний збиток, заподіяний зараженням шкідниками крім ссавців, включаючи комах, становить у США приблизно 8 мільярдів доларів. Різні види кукурудзяного жука (CRW) вважаються шкідниками, які завдають найбільшої шкоди посівам кукурудзи. Важливими видами кукурудзяних жуків є західний кукурудзяний жук *Diabrotica virgifera virgifera*, північний кукурудзяний жук *D. longicornis barberi*, південний західний кукурудзяний жук *D. undecimpunctata howardi* і мексиканський кукурудзяний жук *D. virgifera zeaе*. Для боротьби із кукурудзяним жуком в основному застосовують широкомасштабне внесення хімічних пестицидів. За допомогою цього методу можна досягати ефективного зниження чисельності кукурудзяного жука, однак такі хімічні агенти іноді також шкідливо впливають на корисні організми. Іншою проблемою, яка виникає при широкому застосуванні хімічних пестицидів, є розвиток стій-

кості в деяких ліній комах. Цю проблему можна частково вирішувати за допомогою різних використовуваних у сільськогосподарській практиці методів контролю чисельності шкідників, однак потреба в розробці альтернативних шляхів для боротьби зі шкідниками все зростає. Одним з таких альтернативних підходів є експресія чужорідних генів, які кодують інсектицидні білки в трансгенних рослинах. Цей підхід забезпечує ефективний захист від комах-шкідників, і трансгенні рослини, які експресують інсектицидні токсини, надходять у продаж, що дозволяє фермерам знижувати кількість застосовуваних хімічних інсектицидів.

На експресію чужорідних генів у рослинах може впливати їх положення на хромосомі, що, імовірно, залежить від структури хроматину або близького розташування елементів регуляції транскрипції до сайту інтеграції (див., наприклад Weising і ін., «Foreign Genes in Plants», Ann. Rev. Genet. 22, 1988, стор. 421-477). Таким чином, загальноприйнятою практикою є одержання сотень різних варіантів і скринінг цих варіантів для виявлення одного варіанта, який має необхідні рівні й схеми експресії трансгену, придатні для комерційних цілей. Варіант, який має необхідні рівні й схеми експресії трансгену, можна застосовувати для інтрогресії трансгену в інші генетичні середовища за допомогою статевого ауткросингу за допомогою загальноприйнятих методів селекції. Потомство, отримане в результаті такого схрещування, збері-

гає характеристики експресії вихідного трансформанту. Цю стратегію застосовують для гарантії надійної генної експресії у великій кількості сортів, які добре адаптовані до місцевих умов вирощування.

Важливо вміти виявляти присутність конкретного варіанта для того, щоб визначати чи містить потомство, отримане в результаті статевого схрещування, трансген, який представляє інтерес. Крім того, метод виявлення конкретного варіанта може бути корисний для виконання вимог регулювальних органів на стадії до надходження на ринок, необхідних, наприклад, для одержання дозволу на продаж і для мічення харчових продуктів, отриманих з рекомбінантних культурних рослин. Присутність трансгену можна виявляти за допомогою добре відомого методу виявлення нуклеїнових кислот, включаючи (але, не обмежуючись ними) термічну ампліфікацію (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)) з використанням полінуклеотидних праймерів або ДНК-гібридизацію з використанням нуклеїнових кислот-зондів. Як правило, для простоти й однаковості реагентів і методологій, застосовуваних для виявлення конкретної конструкції ДНК, яку використовували для трансформації різних сортів рослин, ці методи виявлення, як правило, сфокусовані на часто застосовуваних генетичних елементах, наприклад промоторах, термінаторах і маркерних генах, оскільки в багатьох конструкціях ДНК кодувальна ділянка послідовності може нести внутрішні заміни. У результаті такі методи не можна застосовувати для виявлення відмінностей між конструкціями, які можуть відрізнятися тільки кодувальною послідовністю. Крім того, такі методи можуть виявитися неефективними при виявленні відмінностей між різними варіантами, насамперед, отриманими за допомогою однієї й тієї ж конструкції ДНК, якщо послідовність хромосомної ДНК, яка прилягає до вбудованої гетерологічної ДНК («фланкуюча ДНК»), не є відомою.

Даний винахід стосується стійкого до комах трансгенного варіанта кукурудзи, у геном якого включений ген *Cry3A055*, описаний у публікації міжнародної заявки WO 03/018810 від 6 березня 2003 р., яка включена в даний опис як посилання, який кодує інсектицидний токсин *Cry3A055*, який можна застосовувати для боротьби з комахами-шкідниками *Diabrotica* spp. У геном трансгенного варіанта кукурудзи включений також теярті, який кодує фермент фосфоманозізомеразу (PMI), який описаний в US 5767378, включеному в даний опис як посилання, який можна застосовувати як селективний маркер, цей ген дозволяє рослині утилізувати манозу як джерело вуглецю. Даний винахід стосується також нових виділених нуклеотидних послідовностей, унікальних для трансгенного варіанта кукурудзи, які застосовують для ідентифікації трансгенного варіанта кукурудзи й для виявлення нуклеїнових кислот трансгенного варіанта кукурудзи в біологічному зразку, а також набору, який містить реагенти, необхідні для виявлення вказаних нуклеїнових кислот у біологічному зразку.

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід стосується трансгенного варіанта кукурудзи, позначеного MIR604, який несе новий трансгенний генотип, який містить ген *Cry3A055* і ген *pti*, які надають стійкість до комах і здатність утилізувати манозу як джерело вуглеводу відповідно, варіанта MIR604 кукурудзи і його потомства. Винахід стосується також трансгенних рослин кукурудзи, які несуть генотип, запропонований у винаході, насінного матеріалу трансгенних рослин кукурудзи, які несуть генотип, запропонований у винаході, і способів одержання трансгенної рослини кукурудзи, яка несе генотип, запропонований у винаході, шляхом схрещування інбредної рослини кукурудзи, яка несе генотип, запропонований у винаході, із цією ж або іншою лінією кукурудзи іншого генотипу. Трансгенні рослини кукурудзи, запропоновані у винаході, можуть мати практично всі морфологічні й фізіологічні характеристики відповідної ізогенної нетрансгенної рослини кукурудзи крім тих, які надають рослині кукурудзи новий генотип, запропонований у винаході. Даний винахід стосується також композицій і способів виявлення присутності нуклеїнових кислот варіанта MIR604 на основі послідовності ДНК рекомбінантних касет експресії, вбудованих у геном кукурудзи, які обумовлюють одержання варіанта MIR604, і геномних послідовностей, які фланкують інсерційний сайт. Варіант MTR604 можна характеризувати додатково шляхом аналізу рівнів експресії білків *Cry3A055* і PMI, а також шляхом оцінки ефективності у відношенні кукурудзяного жука.

Таким чином, одним з об'єктів даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить принаймні 10 послідовно розташованих нуклеотидів гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудована в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MOR.604, і принаймні 10 послідовно розташованих нуклеотидів геномної ДНК рослини кукурудзи, які фланкують інсерційний сайт гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудована в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604. Виділена молекула нуклеїнової кислоти відповідно до цього об'єкта може містити принаймні 20 або принаймні 50 послідовно розташованих нуклеотидів гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудована в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604, і принаймні 20 або принаймні 50 послідовно розташованих нуклеотидів геномної ДНК рослини кукурудзи, які фланкують інсерційний сайт гетерологічної послідовності ДНК, яка вбудована в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604.

Наступним об'єктом даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні одну утворюючу пограничну послідовність (послідовність стику) варіанта MIR604, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2 і їх комплекми. Погранична послідовність забезпечує стик між касетами експресії, які містять гетерологічну ДНК, які вбудовані в геном кукурудзи, і ДНК геному кукурудзи, яка фланкує інсерційний сайт, і є діагностичною для варіанта MIR604.

Наступним об'єктом даного винаходу є виділена нуклеїнова кислота, яка зв'язує гетерологічну молекулу ДНК із геном рослини кукурудзи варіанта MIR604, що має послідовність, яка несе від приблизно 11 до приблизно 20 послідовно розташованих нуклеотидів, вибраних із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і їх комплемент.

Ще одним об'єктом даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 і їх комплемент.

Наступним об'єктом винаходу є амплікон, який містить молекулу нуклеїнової кислоти, запропоновану у винаході.

Ще одним об'єктом винаходу є праймери фланкуючої послідовності, призначені для виявлення варіанта MIR604. Вказані праймери фланкуючої послідовності містять виділену нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів, вибраних з нуклеотидів 1-801 SEQ ID NO: 3 (довільно позначена як 5'-фланкуюча послідовність), або їх комплемент. В одному з варіантів цього об'єкта праймери фланкуючої послідовності вибирають із групи, яка включає SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і їх комплемент.

Згідно із ще одним об'єктом винаходу праймери фланкуючої послідовності містять виділену нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів 507-1570 SEQ ID NO: 4 (довільно позначена в контексті даного опису як 3'-фланкуюча послідовність), або їх комплемент. В одному з варіантів цього об'єкта праймери фланкуючої послідовності вибирають із групи, яка включає SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 і їх комплемент.

Наступним об'єктом винаходу є пари праймерів, які можна застосовувати, наприклад, для ампліфікації нуклеїнової кислоти. Такі пари праймерів включають перший праймер, який являє собою нуклеотидну послідовність, яка складається принаймні з 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів, який являє собою або є комплементарним до однієї із вказаних вище геномних фланкуючих послідовностей (SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4), і другий праймер, який являє собою нуклеотидну послідовність, яка складається принаймні з 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів гетерологічної ДНК, вбудованої в геном варіанта MIR604. Другий праймер переважно несе нуклеотидну послідовність, яка являє собою або є комплементарною до послідовності вставки, зв'язаною з послідовністю ДНК, яка фланкує рослинний геном, яка представлена в SEQ ID NO: 3 від нуклеотиду в положенні 802 до нуклеотиду в положенні 1310 і в SEQ ID NO: 4 від нуклеотиду в положенні 1 до нуклеотиду в положенні 506.

Наступним об'єктом винаходу є способи виявлення в біологічному зразку присутності ДНК, яка відповідає варіанту MIR604. Такі способи поляга-

ють у тому, що: (а) приводять у контакт зразок, який містить ДНК, з парою праймерів, які при їх використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти в сполученні з геномною ДНК із варіанта кукурудзи MIR604, продукують амплікон, який є діагностичним для варіанта кукурудзи MIR604; (б) здійснюють реакцію ампліфікації нуклеїнової кислоти, одержуючи тим самим амплікон; і (в) виявляють амплікон. В одному з варіантів цього об'єкта амплікон містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, і SEQ ID NO: 4 і їх компоненти.

Ще одним об'єктом винаходу є способи виявлення в біологічному зразку присутності ДНК, яка відповідає варіанту MIR604. Такі способи полягають у тому, що: (а) приводять у контакт зразок, який містить ДНК, із зондом, який гібридується в строгих умовах з геномною ДНК варіанта кукурудзи MIR604 і не гібридується в строгих умовах із ДНК контрольної рослини кукурудзи; (б) піддають зразок і зонд гібридизації в строгих умовах; і (в) виявляють гібридизацію зонда із ДНК.

Наступним об'єктом винаходу є набір для виявлення нуклеїнових кислот варіанта MIR604 у біологічному зразку. У набір входить принаймні одна послідовність ДНК, яка містить полінуклеотидну послідовність достатньої довжини, яка являє собою або є комплементарною до SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4, де послідовності ДНК можна застосовувати в як праймери або зонди, які гібридизуються з виділеною ДНК варіанта MIR604, і які після ампліфікації або гібридизації з нуклеотидною послідовністю в зразку з наступним виявленням амплікону або гібридизації з послідовністю-мішенню, служать для діагностики присутності в зразку нуклеотидних послідовностей варіанта MIR604. У набір входять також інші матеріали, необхідні для здійснення методів гібридизації або ампліфікації нуклеїнових кислот.

Іншим об'єктом даного винаходу є спосіб виявлення білка варіанта кукурудзи MIR604 у біологічному зразку, який полягає в тому, що: (а) екстрагують білок зі зразка тканини кукурудзи варіанта MIR604; (б) аналізують екстрагований білок за допомогою імунологічного методу з використанням антитіла, специфічного для інсектицидного білка або білка селектованого маркера, який продукується варіантом MIR604; і (в) виявляють зв'язування антитіла з інсектицидним білком або білком селектованого маркера.

Наступним варіантом даного винаходу є біологічний зразок, отриманий з рослини, тканини або насіння кукурудзи варіанта MIR604, де зразок містить нуклеотидну послідовність, яка являє собою або є комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, і де послідовність можна виявляти в зразку за допомогою методу ампліфікації нуклеїнової кислоти або гібридизації нуклеїнової кислоти. В одному з варіантів цього об'єкта зразок вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяне борошно великого помелу, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і

зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

Наступним об'єктом даного винаходу є екстракт, отриманий з рослини, тканини або насіння кукурудзи варіанта MIR604, що містить нуклеотидну послідовність, яка являє собою або є комплементарною до нуклеотидної послідовності, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2. В одному з варіантів цього об'єкта послідовність можна виявляти в екстракті за допомогою методу ампліфікації або гібридизації нуклеїнової кислоти. В іншому варіанті цього об'єкта зразок вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяне борошно великого помелу, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

Іншим об'єктом винаходу є рослини й насіння кукурудзи, які містять молекули нуклеїнових кислот, запропоновані у винаході.

Ще одним об'єктом даного винаходу є спосіб одержання рослини кукурудзи, стійкої до зараження принаймні кукурудзяним жуком, який полягає в тому, що: (а) здійснюють статеве схрещування першої батьківської рослини кукурудзи із другою батьківською рослиною кукурудзи, де перша або друга батьківська рослина кукурудзи містить ДНК варіанта MIR604, одержуючи тим самим множину рослин покоління першої генерації; (б) відбирають рослину покоління першої генерації, яка має стійкість до зараження принаймні кукурудзяним жуком; (в) здійснюють самозапилення рослини покоління першої генерації, одержуючи тим самим множину рослин покоління другої генерації; (г) відбирають із рослин покоління другої генерації рослину, яка має стійкість до зараження принаймні кукурудзяним жуком; де рослини покоління другої генерації містять нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2.

Наступним об'єктом даного винаходу є спосіб одержання насіння кукурудзи, який полягає в тому, що схрещують першу батьківську рослину кукурудзи із другою батьківською рослиною кукурудзи й збирають утворене насіння кукурудзи першої генерації, де перша або друга батьківська рослина кукурудзи являє собою інбредну рослину кукурудзи, запропоновану у винаході.

Ще одним об'єктом даного винаходу спосіб одержання гібридного насіння кукурудзи, який полягає в тому, що: (а) саджають насіння першої інбредної лінії кукурудзи, запропонованої у винаході, і насіння другої інбредної лінії кукурудзи, яке має інший генотип; (б) культивують рослини кукурудзи із вказаної культури аж до цвітіння; (в) здійснюють емаскуляцію квіток рослин кукурудзи однієї з інбредних ліній кукурудзи; (г) дозволяють відбутися запиленню іншої інбредної лінії кукурудзи, і (д) збирають отримане в результаті гібридне насіння.

Викладені вище й інші об'єкти винаходу стануть більш зрозумілими з наведеного нижче докладного опису винаходу.

Опис послідовностей, наведених у переліку послідовностей

SEQ ID NO: 1: стик 5'-кінця геному - вставки.

SEQ ID NO: 2: стик 3'-кінця вставки - геному.

SEQ ID NO: 3: послідовність 5'-кінця геному + вставки.

SEQ ID NO: 4: послідовність 3'-кінця вставки + геному.

SEQ ID NO: 5: 5'-фланкуюча вставку послідовність геному кукурудзи.

SEQ ID NO: 6: 3'-фланкуюча вставку послідовність геному кукурудзи.

SEQ ID NO: 7-15: праймери 5'-фланкуючої послідовності, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 16-20: праймери промоторної послідовності MTL, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 21-28: праймери послідовності c/y3A055, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 29-30: праймери послідовності ZmUblnt, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 31-37: праймери послідовності рті, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 38: праймер послідовності NOS, який застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 39-46: праймери 3'-фланкуючої послідовності, які застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 47-49: праймери й зонд c/y3A055 TAQMAN.

SEQ ID NO: 50-52: праймери й зонд рті TAQMAN.

SEQ ID NO: 53-55: праймери й зонд ZmADH TAQMAN.

SEQ ID NO: 56: зонд MIR604, який застосовують згідно із даним винаходом.

SEQ ID NO: 57: послідовність правої пограничної ділянки.

SEQ ID NO: 58: послідовність промотору MTL.

SEQ ID NO: 59: послідовність гена c/yA055.

SEQ ID NO: 60: послідовність термінатора NOS.

SEQ ID NO: 61: послідовність промотора ZmUblnt.

SEQ ID NO: 62: послідовність гена рті

SEQ ID NO: 63: послідовність лівої пограничної ділянки.

Короткий опис креслень На кресленнях показано:

на фіг. 1 - ілюстрація рослинного експресійного вектора, позначеного як pZM26. На карті показаний сайт рестрикції KpnI, який застосовують для аналізу методом Саузерн-блотингу;

на фіг. 2 - графічна карта, що ілюструє організацію елементів, які являють собою гетерологічні нуклеотидні послідовності, вбудовані в геном варіанта кукурудзи MIR604, і позначені відносні положення, у яких вбудовані нуклеотидні послідовності зв'язані з геномними послідовностями ДНК кукурудзи, які фланкують кінці вбудованих гетерологічних послідовностей ДНК. 1: 5'-фланкуюча послідовність геному рослини (SEQ ID NO: 5); 2: права

погранична ділянка (SEQ ID NO: 57); 3: промотор MTL (SEQ ID NO: 58); 4: ген cry3A055 (SEQ ID NO: 59); 5: термінатор NOS (SEQ ID NO: 60); 6: промотор ZmUbiNT (SEQ ID NO: 61); 7: ген рm1 (SEQ ID NO: 62); 8: термінатор NOS (SEQ ID NO: 60); 9: ліва погранична ділянка (SEQ ID NO: 63); і 10: 3'-фланкуюча послідовність геному рослини (SEQ ID NO: 6).

#### Визначення

Наведені нижче поняття й опис методів подані для кращого розуміння даного винаходу і як посібник для звичайних фахівців у даній галузі при втіленні на практиці даного винаходу. Якщо не вказане інше, то застосовувані в описі поняття слід розглядати відповідно до їх загальноприйнятого значення, відомого звичайному фахівцеві у відповідній галузі. Визначення звичайних понять в галузі молекулярної біології можна знайти також в Rieger і ін., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5-е вид., вид-во Springer-Verlag: New York, 1994.

У контексті даного опису поняття «ампліфікований» стосується створення множини копій молекули нуклеїнової кислоти або множини копій послідовності, комплементарній до молекули нуклеїнової кислоти, з використанням принаймні однієї з молекул нуклеїнової кислоти як матриці. Системи ампліфікації включають систему на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), систему на основі лігазної ланцюгової реакції (ЛЦР), ампліфікацію на основі нуклеотидної послідовності (NASBA, фірма Cange, Micar, провінція Онтаріо), системи на основі Q-бета реплікази, систему ампліфікації на основі транскрипції (TAS) і ампліфікацію на основі заміщення ланцюга (SDA) (див., наприклад, Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, під ред.

D. H. Persing і ін., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Продукт ампліфікації називають амплікон.

«Кодувальна послідовність» означає нуклеотидну послідовність, яка транскрибується з утворенням РНК, такої як мРНК, рРНК, тРНК, snРНК (М.я.РНК), смислова РНК або антисмислова РНК. Переважно потім РНК транслюється в організмі з утворенням білка.

«Набір для виявлення» у контексті даного опису стосується набору, який застосовують для виявлення присутності або відсутності ДНК рослин варіанта MIR604 в образі, який містить нуклеотидні зонди й праймери, запропоновані в даному винаході, які специфічно гібридизуються в строгих умовах з послідовністю ДНК-мішенню, і інші матеріали, необхідні для здійснення методів гібридизації й ампліфікації нуклеїнових кислот.

У контексті даного опису поняття трансгенний «варіант» стосується рекомбінантної рослини, отриманої шляхом трансформації за допомогою гетерологічної ДНК, наприклад, за допомогою касети експресії, яка містить ген, що представляє інтерес, і регенерації рослин з однієї рослинної клітини. Поняття «варіант» стосується вихідного трансформанту й/або потомству трансформанту, яке несе гетерологічну ДНК. Поняття «варіант» стосується також потомства, отриманого шляхом

статевого ауткросингу трансформанту й іншої лінії кукурудзи. Навіть після повторного зворотного схрещування з рекурентним батьком (батьківська форма, з якою гібрид схрещується знову) вбудована ДНК і фланкуюча ДНК із трансформованого батька присутні в отриманому в результаті схрещування потомстві в тій же локалізації на хромосомі. Як правило, у результаті трансформації рослинної тканини одержують множину варіантів, кожний з яких несе вбудовану конструкцію ДНК у різних положеннях у геномі рослинної клітини. Конкретний варіант відбирають на основі експресії трансгену або інших необхідних ознак. Таким чином, «варіант MIR604», «MIR604» або «MIR604-Variant» у контексті даного опису позначає вихідний трансформант MIR604 і/або потомство трансформанту MIR604.

«Касета експресії» у контексті даного опису означає молекулу нуклеїнової кислоти, яка здатна забезпечувати експресію певної нуклеотидної послідовності у відповідній клітині-хазяїні, і вона містить промотор, функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, що представляє інтерес, яка функціонально зв'язана із сигналами термінації. Вона, як правило, містить послідовності, необхідні для правильної трансляції нуклеотидної послідовності. Касета експресії може містити також послідовності, які не є необхідними для забезпечення експресії нуклеотидної послідовності, що представляє інтерес, але які присутні у ній для створення придатних сайтів рестрикції для видалення касети з експресійного вектора. Касета експресії, яка містить нуклеотидну послідовність, яка представляє інтерес, може бути химерною, це означає, що принаймні один з її компонентів є гетерологічним відносно принаймні одного іншого її компонента. Касета експресії може являти собою також касету експресії, яка зустрічається в природних умовах, але яка була отримана в рекомбінантній формі, придатній для гетерологічної експресії. Однак, як правило, касета експресії є гетерологічною відносно хазяїна, тобто певна нуклеотидна послідовність касети експресії не зустрічається в природних умовах у клітині-хазяїні й повинна бути інтродукована в клітину-хазяїна або в предка клітини-хазяїна шляхом процесу трансформації, відомого в даній галузі. Експресія нуклеотидної послідовності в касеті експресії може знаходитися під контролем конститутивного промотору або індукційного промотору, який ініціює транскрипцію тільки тоді, коли клітину-хазяїн обробляють певним зовнішнім стимулом. У випадку багатоклітинного організму, такого як рослина, промотор також може бути специфічним відносно певної тканини або органа або стадії розвитку. Касету або її фрагмент, коли ними трансформують рослину, називають також «вбудована послідовність» або «послідовність-вставка».

«Ген» означає певну ділянку, яка локалізована всередині геному і яка крім вищевказаної кодувальної нуклеотидної послідовності, містить інші, насамперед регуляторні нуклеотидні послідовності, відповідальні за контроль експресії, тобто за транскрипцію й трансляцію кодувальної ділянки. Ген може включати також інші 5'- і 3'- нетрансль-

вані послідовності й термінуючі послідовності. Можуть бути присутні також інші елементи, наприклад інтрони.

Поняття «ген, який представляє інтерес», стосується будь-якого гена, який при перенесенні в рослину, надає рослині необхідні ознаки, такі як стійкість до антибіотиків, стійкість до вірусів, стійкість до комах, стійкість до хвороб або стійкість до інших шкідників, толерантність до гербіцидів, поліпшену поживну цінність, поліпшені характеристики з позицій промислової переробки або змінену репродуктивну здатність. «Ген, який представляє інтерес», може являти собою ген, який перенесений у рослину для виробництва в рослині ферментів або метаболітів, які мають комерційне значення.

«Генотип» у контексті даного опису означає генетичний матеріал, успадкований від батьківських рослин кукурудзи, який не обов'язково весь експресується в рослинах кукурудзи - нащадках. Генотип MIR604 стосується гетерологічного генетичного матеріалу, яким трансформований геном рослини, а також генетичного матеріалу, який фланкує вбудовану послідовність.

«Гетерологічна» нуклеотидна послідовність означає нуклеотидну послідовність, яка не зустрічається в природних умовах у клітині-хазяїні, у яку вона інтродукована, включаючи множинні копії, які не зустрічаються в природних умовах, нуклеотидної послідовності, яка зустрічається в природних умовах.

«Гомологічна нуклеотидна послідовність» означає нуклеотидну послідовність, яка у природних умовах асоційована із клітиною-хазяїном, у яку вона інтродукована.

«Функціонально зв'язана» стосується асоціації нуклеотидних послідовностей на одному фрагменті нуклеїнової кислоти так, що функція однієї впливає на функцію іншої. Наприклад, промотор функціонально зв'язаний з кодувальною послідовністю або функціональною РНК, коли він має здатність впливати на експресію кодувальної послідовності або функціональної РНК (тобто транскрипція кодувальної послідовності або функціональної РНК знаходиться під контролем промотору). Кодувальні послідовності у смисловій або антисмисловій орієнтації можуть бути функціонально зв'язані з регуляторними послідовностями.

«Праймери» у контексті даного опису означають виділені нуклеїнові кислоти, яких «відпаляють» до комплементарного ланцюга ДНК-мішені шляхом гібридизації нуклеїнових кислот з одержанням гібриду праймеру й ланцюга ДНК-мішені, потім продовжують ланцюг ДНК-мішені за допомогою полімерази, такої як ДНК-полімераза. Пари або набори праймерів можна використовувати для ампліфікації молекули нуклеїнової кислоти, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або інших загальноприйнятих методів ампліфікації нуклеїнової кислоти.

«Зонд» означає виділену нуклеїнову кислоту, з якою зв'язана придатна мітка, яку виявляють, або репортерна молекула, така як радіоактивний ізотоп, ліганд, хемілюмінесцентний агент або фермент. У контексті опису даного винаходу такий

зонд є комплементарним до ланцюга нуклеїнової кислоти-мішені, ланцюга геномної ДНК варіанта кукурудзи MR604. Геномну ДНК MIR604 можна одержувати з рослини кукурудзи або зі зразка, який включає ДНК із вказаного варіанта. Згідно із даним винаходом зонди включають не лише дезоксирибонуклеїнові або рибонуклеїнові кислоти, але також поліаміди або інші матеріали зонда, які специфічно зв'язуються з послідовністю ДНК-мішені і які можна застосовувати для виявлення присутності послідовності ДНК-мішені.

Праймери й зонди, як правило, складаються з 10 -15 або більшої кількості нуклеотидів. Праймери й зонди можуть складатися принаймні з 20 або більшої кількості нуклеотидів або принаймні з 25 або більшої кількості нуклеотидів або принаймні з 30 або більшої кількості нуклеотидів. Такі праймери й зонди специфічно гібридизуються з послідовністю-мішенню в строгих умовах гібридизації. Праймери й зонди, запропоновані в даному винаході, можуть мати послідовність, повністю комплементарну до послідовності-мішені, хоча за допомогою загальноприйнятих методів можна створювати зонди, які відрізняються від послідовності-мішені, але які зберігають здатність гібридизуватися з послідовностями-мішенями.

Поняття «строгі умови» або «строгі умови гібридизації» стосуються умов, при яких зонд повинен гібридизуватися з послідовністю-мішенню в помітно більш високому ступені, ніж з іншими послідовностями. Строгі умови залежать від послідовності-мішені й повинні відрізнятися залежно від структури полінуклеотиду. Контролюючи строгість умов гібридизації й/або відмивання, можна ідентифікувати послідовності-мішені, які на 100% комплементарні до зонду (гомологічне зондування). В іншому варіанті строгість умов можна регулювати, забезпечуючи введення деяких помилкових спарювань у послідовності так, щоб виявляти більш низький рівень подібності (гетерологічне зондування). Більш довгі послідовності гібридизуються специфічно при більш високих температурах. Докладний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведений в Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, частина I, розділ 2 «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays», Elsevier: New York; і в *Current Protocols in Molecular Biology*, розділ 2, під ред. Ausubel і ін., вид-во Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1995), а також в Sambrook і ін. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (5-е вид., вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Специфічність, як правило, визначається умовами відмивання після гібридизації, факторами, які мають вирішальне значення, є йонна сила й температура кінцевого розчину для відмивання. Як правило, вибирають дуже строгі умови гібридизації й відмивання, при яких температура приблизно на 5°C нижче, ніж кінцева температура плавлення ( $T_m$ ) для конкретної послідовності при певній йонній силі й значенні pH.  $T_m$  означає температуру (при певній йонній силі й значенні pH), при якій 50% послідовностей-мішеней гібридизується з точно піді-

браним зондом. Як правило, у строгих умовах зонд повинен гібридизуватися з підпоследовністю-мішенню, але не гібридизуватися з іншими послідовностями.

Прикладом строгих умов гібридизації на фільтрі методом Саузерн- або Нозерн-блотингу, для гібридизації комплементарних нуклеїнових кислот, які мають більше 100 комплементарних залишків, є застосування 50%-ного формаміду з 1 мг гепарину при 42°C, при здійсненні гібридизації протягом ночі. Прикладом дуже строгих умов відмивання є застосування 0,5M NaCl при 72°C протягом приблизно 15 хв. Прикладом строгих умов відмивання є відмивання 0,2×SSC (0,2-кратного SSC) при 65°C протягом 15 хв. (опис SSC-буфера див. в Sambrook, нижче).

Прикладом умов гібридизації, запропонованих у даному винаході, є гібридизації в 7% ДСН, 0,25M NaPO<sub>4</sub>, рН 7,2 при 67°C протягом ночі з наступними двома відмиваннями в 5% ДСН, 0,20M NaPO<sub>4</sub>, рН 7,2 при 65°C протягом 30 хвилин кожне відмивання й двома відмиваннями в 1% ДСН, 0,20 M NaPO<sub>4</sub>, рН 7,2 при 65°C протягом 30 хв кожне відмивання. Прикладом відмивання в умовах середньої жорсткості для дуплексів, які складаються, наприклад, більш ніж з 100 нуклеотидів, є застосування 1×SSC при 45°C протягом 15 хв. Прикладом розслаблених умов відмивання для дуплексів, які складаються, наприклад, більш ніж з 100 нуклеотидів, є застосування 4- 6×SSC при 40°C протягом 15 хв.

Для зондів, які складаються приблизно з 10 - 50 нуклеотидів, строгі умови, як правило, включають концентрації солей, які відповідають менше ніж 1,0M концентрації іонів Na, як правило, приблизно від 0,01 до 1,0M концентрації іонів Na (або інших солей) при рН від 7,0 до 8,3, при цьому температура, як правило, становить принаймні приблизно 30°C. Строгі умови також можуть бути отримані при додаванні дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Як правило, величина відношення сигналу до шуму, дорівнює 2 (або вище) у порівнянні з виявленою при застосуванні неспорідненого зонда в конкретному досліді з гібридизації, свідчить про наявність специфічної гібридизації. Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються одна з одною у строгих умовах, ще є практично ідентичними, якщо білки, які вони кодують, є практично ідентичними. Це має місце, наприклад, у випадку, коли копію нуклеїнової кислоти створюють із використанням максимальної виродженості кодонів, що допускається генетичним кодом.

Нижче наведені приклади наборів умов гібридизації/відмивання, які можуть застосовуватися для гібридизації нуклеотидних послідовностей, які практично ідентичні до нуклеотидних послідовностей, запропонованих у даному винаході, з якими проводиться порівняння: нуклеотидна послідовність, з якою проводиться порівняння, переважно гібридизується з нуклеотидною послідовністю, з якою проводиться порівняння, в 7%-ному додецилсульфаті натрію (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЕДТК при 50°C із відмиванням 2×SSC, 0,1% ДСН при 50°C, переважно в 7%-ному додецилсульфаті натрію (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЕДТК при 50°C із

відмиванням 1×SSC, 0,1% ДСН при 50°C, більш переважно в 7%-ному додецилсульфаті натрію (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЕДТК при 50°C із відмиванням 0,5×SSC, 0,1% ДСН при 50°C, ще більш переважно в 7%-ному додецилсульфаті натрію (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЕДТК при 50°C із відмиванням 0,1×SSC, 0,1% ДСН при 50°C, і ще більш переважно в 7%-ному додецилсульфаті натрію (ДСН), 0,5M NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЕДТК при 50°C із відмиванням 0,1×SSC, 0,1% ДСН при 65°C. Послідовності, запропоновані в даному винаході, можна виявляти з використанням вказаних вище умов. Для цілей, вказаних у винаході, застосовують строгі умови гібридизації.

Поняття «трансформація» означає процес інтродукції гетерологічної нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїн або організм. Зокрема, «трансформація» означає стабільну інтеграцію молекули ДНК у геном організму, що представляє інтерес.

Поняття «трансформований»/«трансформований»/«трансгенний»/«рекомбінантний» стосуються організму-хазяїна, такого як бактерія або рослина, у який інтродукована гетерологічна молекула нуклеїнової кислоти. Молекула нуклеїнової кислоти може бути стабільно інтегрована в геном хазяїна або молекула нуклеїнової кислоти може бути присутня також у вигляді позахромосомної молекули. Така позахромосомна молекула може мати здатність до самореплікації. Слід розуміти, що трансформовані клітини, тканини або рослини включають не лише кінцевий продукт процесу трансформації, але також і його трансгенне потомство. Поняття «нетрансформований», «нетрансгенний» або «нерекомбінантний» хазяїн стосуються організму дикого типу, наприклад, бактерії або рослини, яка не містить гетерологічної молекули нуклеїнової кислоти. У контексті даного опису поняття «трансгенний» стосується рослини, рослинної клітини або множини структурованих або неструктурованих рослинних клітин, об'єднаних за допомогою добре відомих методів генетичних маніпуляцій і інсерцій генів з послідовністю нуклеїнової кислоти, що відповідає гену, який представляє інтерес, у рослинному геномі, і, як правило, знаходиться в хромосомі клітинного ядра, мітохондрії або інших органелах, які містять хромосоми, у локусі, відмінному від присутнього звичайно в нативній рослині або рослинній клітині, або має більшу кількість копій у порівнянні з нативною рослиною або рослинною клітиною. Маніпуляції або інсерції вказаних нуклеотидних послідовностей для одержання трансгенних рослин відрізняються застосуванням мутацій, які зустрічаються в природних умовах, для одержання рослини, яка не зустрічається в природних умовах, або рослини з генотипом, який не зустрічається в природних умовах. Методи трансформації рослин і рослинних клітин добре відомі в даній галузі і являють собою, наприклад, електропорацію, мікроін'єкцію, опосередковану *Agrobacterium* трансформацію й балістичну трансформацію.

Застосовувана в даному описі номенклатура основ ДНК і амінокислот наведена в 37 C.F.R. § 1.822.



#### Докладний опис винаходу

Даний винахід стосується генетично поліпшеної лінії кукурудзи, яка продукує інсектицидний білок Cry3A055 і фермент фосфоманоізомеразу (PMI), що дозволяє рослинам утилізувати манозу як джерело вуглецю. Винахід стосується насамперед трансгенного варіанта кукурудзи, позначеного MIR604, який несе новий генотип, а також композицій і способів виявлення нуклеїнових кислот цього варіанта в біологічному зразку. Винахід стосується також рослин кукурудзи, які несуть генотип MIR604, трансгенного насіння, отриманих рослин кукурудзи, і способів одержання рослини кукурудзи, яка несе геном MIR604, шляхом схрещування інбредної лінії кукурудзи, яка несе генотип MIR604, із цією ж або іншою лінією кукурудзи. Рослини кукурудзи, які несуть генотип MIR604, запропоновані у винаході, можна застосовувати для боротьби з комахами-шкідниками із ряду твердокрилих, включаючи західного кукурудзяного жука *Diabrotica virgifera virgifera*, мексиканського кукурудзяного жука *D. virgifera zeaе* і північного кукурудзяного жука *D. longicornis barberi*. Рослини кукурудзи, які несуть генотип MIR604, запропоновані у винаході, можуть також утилізувати манозу як джерело вуглецю.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить принаймні 10 або більше (наприклад 15, 20, 25 або 50) послідовно розташованих нуклеотидів гетерологічної послідовності ДНК, вбудованої в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604, і принаймні 10 або більше (наприклад, 15, 20, 25 або 50) послідовно розташованих нуклеотидів геномної ДНК рослини кукурудзи, яка фланкує інсерційний сайт гетерологічної послідовності ДНК, вбудованої в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604. Винахід стосується також нуклеотидних послідовностей, які містять 10 або більшу кількість послідовно розташованих нуклеотидів послідовності-вставки з варіанта MIR604 і принаймні один нуклеотид фланкуючої ДНК із варіанта MIR604, який прилягає до послідовності-вставки. Такі нуклеотидні послідовності можна застосовувати для діагностики для варіанта MIR604. Ампліфікація нуклеїнової кислоти з геномної ДНК варіанта MIR604 приводить до одержання амплікону, який містить такі діагностичні послідовності.

Іншим варіантом здійснення винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні одну пограничну послідовність варіанта MIR604, що вибирають із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2 і їх комплементів, де погранична послідовність забезпечує стик між гетерологічною касетою експресії, вбудованою в геном кукурудзи, і ДНК геному кукурудзи, яка фланкує інсерційний сайт, і яка є діагностичною для варіанта MTR604.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є виділена нуклеїнова кислота, яка зв'язує гетерологічну молекулу ДНК із геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604, яка має послідовність, яка несе від приблизно 11 до приблизно 20 послідовно розташованих нуклеотидів, вибраних із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і їх комплементів.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 і їх комплементів.

Наступним варіантом здійснення винаходу є амплікон, який містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 і їх комплементів.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є праймери фланкуючої послідовності, призначені для виявлення варіанта MIR604. Вказані праймери фланкуючої послідовності містять виділену нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів, вибраних з нуклеотидів 1-801 в SEQ ID NO: 3 (довільно позначена як 5'-фланкуюча послідовність) або їх комплементів. В одному з аспектів цього варіанта здійснення винаходу праймери фланкуючої послідовності вибирають із групи, яка включає SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і їх комплементів.

Ще одним варіантом здійснення винаходу є праймери фланкуючої послідовності, які містять виділену нуклеотидну послідовність, яка несе принаймні 10-15 послідовно розташованих нуклеотидів з нуклеотидів 507-1570 SEQ ID NO: 4 (довільно позначена в контексті даного опису як 3'-фланкуюча послідовність) або їх комплементів. В одному з аспектів цього варіанта здійснення винаходу праймери фланкуючої послідовності вибирають із групи, яка включає SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 і їх комплементів.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є пара полінуклеотидних праймерів, яка складається з першого полінуклеотидного праймеру й другого полінуклеотидного праймеру, які функціонують разом у присутності в зразку ДНК-матриці з варіанта кукурудзи MIR604 з утворенням амплікону, діагностичного для варіанта кукурудзи MIR604, де перша праймерна послідовність являє собою або є комплементарною до послідовності з геному рослини кукурудзи, яка фланкує інсерційний сайт гетерологічної послідовності ДНК, вбудованої в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604, а друга полінуклеотидна праймерна послідовність являє собою або є комплементарною до гетерологічної послідовності ДНК, вбудованої в геном рослини кукурудзи варіанта кукурудзи MIR604.

Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер містить принаймні 10 послідовно розташованих нуклеотидів від положення 1 до положення 801 SEQ ID NO: 3 або їх комплементів. Згідно із ще одним аспектом цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і їх комплементів.

Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 і їх комплементів.

NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, або їх комплементарна. Згідно із ще одним аспектом цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер містить принаймні 10 послідовно розташованих нуклеотидів від положення 507 до положення 1570 SEQ ID NO: 4 або їх комплементарна. Відповідно до наступного аспекту цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, або їх комплементарна. Згідно із ще одним аспектом цього варіанта здійснення винаходу другий полінуклеотидний праймер містить принаймні 10 послідовно розташованих нуклеотидів SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, або їх комплементарна. Відповідно до наступного аспекту цього варіанта здійснення винаходу другий полінуклеотидний праймер містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 38, або їх комплементарна.

Згідно із ще одним аспектом цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер, який представлений в SEQ ID NO: 15, і другий полінуклеотидний праймер, який представлений в SEQ ID NO: 28, функціонують разом у присутності в зразку ДНК-матриці з варіанта кукурудзи MIR604 з утворенням амплікону, діагностичного для варіанта кукурудзи MIR604, як описано в прикладі 4. Відповідно до наступного аспекту цього варіанта здійснення винаходу перший полінуклеотидний праймер, який представлений в SEQ ID NO: 45, і другий полінуклеотидний праймер, який представлений в SEQ ID NO: 27, функціонують разом у присутності в зразку ДНК-матриці з варіанта кукурудзи MIR604 з утворенням амплікону, діагностичного для варіанта кукурудзи MIR604, як описано в прикладі 4.

Природно, як добре відомо в даній галузі, можна одержати додаткову послідовність також знаходиться в геномній послідовності крім послідовності, яка фланкує будь-який кінець вбудованих гетерологічних послідовностей ДНК, для застосування як праймерної послідовності, яку можна використовувати в такій парі праймерів для ампліфікації послідовностей, які є діагностичними для варіанта MIR604. У даному описі фраза «додаткова послідовність, яка також знаходиться в геномній послідовності, крім послідовності, яка фланкує будь-який кінець вбудованих гетерологічних послідовностей ДНК» стосується насамперед послідовного зміщення від кінців вбудованих гетерологічних послідовностей ДНК, точок, у яких вбудовані послідовності ДНК, прилягають до нативної геномної послідовності ДНК, і всередину геномної ДНК конкретної хромосоми, у яку вбудовані гетерологічні послідовності ДНК. Переважно праймерна послідовність, яка відповідає частині вбудованої послідовності або комплементарна до неї, повинна забезпечувати транскрипційне подовження утвореного ланцюга ДНК або РНК у напрямку до найближчого стику фланкуючої послідовності. От-

же, праймерна послідовність, яка відповідає частині геномної фланкуючої послідовності або комплементарна до неї, повинна забезпечувати транскрипційне подовження утвореного ланцюга ДНК або РНК у напрямку до найближчого стику фланкуючої послідовності. Праймерна послідовність може являти собою або може бути комплементарна до гетерологічної послідовності ДНК, вбудованої в хромосому рослини, або геномної фланкуючої послідовності. Фахівець у даній галузі може легко зрозуміти важливість того, чи повинна праймерна послідовність являти собою або бути комплементарною до вказаної вище послідовності у вбудованій гетерологічній послідовності ДНК або послідовності, представлений в SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4, залежно від природи продукту, який потрібно одержати, з використанням набору праймерів, призначених для ампліфікації конкретної фланкуючої послідовності, яка містить стик між геномною послідовністю ДНК і вбудованою гетерологічною послідовністю ДНК.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб виявлення в біологічному зразку присутності ДНК, яка відповідає варіанту MIR604, який полягає в тому, що (а) приводять у контакт зразок, який містить ДНК, із зондом, який гібридується в строгих умовах з геномною ДНК варіанта кукурудзи MIR604 і не гібридується в строгих умовах із ДНК контрольної рослини кукурудзи; (б) піддають зразок і зонд гібридизації в строгих умовах; і (в) виявляють гібридизацію зонда із ДНК. Відповідно до одного з об'єктів цього варіанта здійснення винаходу амплікон містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 і їх комплементарна.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб виявлення присутності в біологічному зразку ДНК, яка відповідає варіанту MIR604, який полягає в тому, що (а) приводять у контакт зразок, який містить ДНК, із зондом, який гібридується в строгих умовах з геномною ДНК варіанта кукурудзи MIR604 і не гібридується в строгих умовах із ДНК контрольної рослини кукурудзи; (б) піддають зразок і зонд гібридизації в строгих умовах; і (в) виявляють гібридизацію зонда із ДНК. Виявлення можна здійснювати будь-якими методами, добре відомими в даній галузі, які включають (але, не обмежуючись ними) флуоресцентний, хемілюмінісцентний, радіологічний, імунологічний або інший методи. У випадку, коли потрібно застосовувати гібридизацію як засіб ампліфікації конкретної послідовності з одержанням амплікону, який є діагностичним для варіанта кукурудзи MIR604, то мається на увазі, що одержання й виявлення амплікону можна здійснювати будь-якими добре відомими методами, які дозволяють виявляти необхідну гібридизацію з послідовністю-мішенню, коли використовують один зонд або праймер, або з послідовностями, коли використовують два або більшу кількість зондів або праймерів. Мається на увазі, що поняття «біологічний зразок» стосується зразка, який містить або може містити нуклеїнову кислоту, яка складається з 5-10 нуклеотидів, які знаходяться на будь-якій стороні

від сайту, у якому один або два кінці вбудованої гетерологічної послідовності ДНК контактують із геномною послідовністю ДНК всередині хромосоми, у яку вбудована гетерологічна послідовність ДНК, які позначені також як пограничні послідовності. Крім того, пограничні послідовності містять як мінімум два нуклеотиди: з них перший нуклеотид розташований всередині фланкуючої геномної ДНК, і він прилягає й ковалентно зв'язаний з першим нуклеотидом у вбудованій гетерологічній послідовності ДНК.

І ще одним варіантом здійснення даного винаходу є набір для виявлення нуклеїнових кислот варіанта MIR604 у біологічному зразку, причому, у набір входить принаймні одна молекула нуклеїнової кислоти достатньої довжини, яка складається з послідовно розташованих нуклеотидів, гомологічна або комплементарна до нуклеотидної послідовності, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, і SEQ ID NO: 4, яка функціонує як ДНК-праймер або зонд, специфічний для варіанта MIR604, і інші матеріали, необхідні для здійснення методів гібридизації або ампліфікації нуклеїнових кислот. Можна застосовувати різні методи виявлення, включаючи TAQMAN (фірма Perkin Elmer), термічну ампліфікацію, лігасну ланцюгову реакцію, Саузерн-гібридизацію, методи на основі ELISA і колориметричні й флуоресцентні методи виявлення. Зокрема, даний винахід стосується наборів для виявлення присутності послідовності-мішені, тобто принаймні одного зі стиків вбудованої ДНК із геномної ДНК рослини кукурудзи варіанта MIR604, у зразку, який містить геномну нуклеїнову кислоту з MIR604. У набір входить принаймні один полінуклеотид, який має здатність зв'язуватися із сайтом-мішенню, або практично прилягає до сайту-мішені, і принаймні один із засобів для виявлення зв'язування полінуклеотиду із сайтом-мішенню. Засоби для виявлення можуть бути флуоресцентними, хемілюмінісцентними, колориметричними або ізотопними й для виявлення зв'язування їх можна застосовуватися в сполученні принаймні з імунологічними методами. Мається на увазі також, що за допомогою набору можна виявляти присутність у зразку сайту-мішені, тобто принаймні одного зі стиків вбудованої ДНК із геномної ДНК рослини кукурудзи у варіанті MIR604, використовуючи переважно дві або більше кількості полінуклеотидних послідовностей, які разом мають здатність зв'язуватися з нуклеотидними послідовностями, які прилягають або розташовані всередині фрагмента довжиною приблизно 100 пар основ або всередині фрагмента довжиною приблизно 200 пар основ або всередині фрагмента довжиною приблизно 500 пар основ або всередині фрагмента довжиною приблизно 1000 пар основ послідовності-мішені, і які можна подовжувати в напрямку один до одного з одержанням амплікону, який містить принаймні один сайт-мішень.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб виявлення білка варіанта MIR604 у біологічному зразку, який полягає в тому, що: (а) екстрагують білок зі зразка тканини кукурудзи варіанта MIR604; (б) аналізують екстрагований білок

за допомогою імунологічного методу з використанням антитіла, специфічного для інсектицидного білка або білка селектованого маркера, який продукується варіантом MIR604; і (в) виявляють зв'язування антитіла з інсектицидним білком або білком селектованого маркера.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є рослина кукурудзи або її частини, які несуть генотип трансгенного варіанта MIR604, де генотип містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, або їх комплемент. В одному з аспектів цього варіанта здійснення винаходу рослина кукурудзи одержують із інбредних ліній кукурудзи CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716, NP904, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, H8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT і 2070BT. Однак фахівцям в даній галузі повинно бути очевидно, що генотип MIR604 можна вбудовувати в рослину будь-якого іншого сорту, яку можна запліднювати рослиною кукурудзи, включаючи види дикого маїсу, і таким чином, винахід не обмежений кращими інбредними лініями.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є рослина кукурудзи, яка містить принаймні першу й другу послідовності ДНК, зв'язані одна з одною з утворенням безперервної нуклеотидної послідовності, де перша послідовність ДНК знаходиться в пограничній послідовності й містить принаймні 11 послідовно розташованих нуклеотидів, вибраних із групи, яка включає нуклеотиди 792-811 SEQ ID NO: 3; нуклеотиди 497-516 SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; і їх комплементи, де друга послідовність ДНК знаходиться в гетерологічній послідовності ДНК-вставки, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 і їх комплементи; і де першу й другу послідовності можна застосовувати як нуклеотидні праймери або зонди для виявлення присутності в біологічному зразку нуклеотидних послідовностей варіанта кукурудзи MIR604. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу нуклеотидні праймери застосовують у методі ампліфікації ДНК для ампліфікації послідовності ДНК-мішені з використанням як матриці ДНК, яку екстрагують із рослини кукурудзи, а рослину кукурудзи можна відрізнити від інших рослин кукурудзи, одержуючи амплікон, який відповідає послідовності ДНК, що містить SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2.

Рослини кукурудзи, запропоновані у винаході, додатково відрізняються тим, що розщеплення геномної ДНК рослини рестриктазою KpnI приводить до утворення однієї смуги гібридизації, що відповідає cгу3A055, при використанні специфічного для cгу3A055 зонду при гібридизації в строгих умовах. Як приклад у даному описі використовують cгу3A055-зонд, що містить нуклеотидну послі-

довність, представлену в SEQ ID NO: 56 або SEQ ID NO: 59.

Рослини кукурудзи, запропоновані у винаході, додатково відрізняються тим, що розщеплення геномної ДНК рослини рестриктазою KpnI приводить до утворення однієї смуги гібридизації, що відповідає rpi1, при використанні специфічного для rpi1 зонда при гібридизації в строгих умовах. Як приклад у даному описі використовують rpi1-зоид, який містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 62.

Одним з варіантів здійснення даного винаходу є рослина кукурудзи, якій генотип MIR604 надає стійкість до комах або здатність утилізувати манозу. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу генотип, який надає рослині кукурудзи стійкість до комах, несе ген Csu3A055. Відповідно до іншого аспекту цього варіанта здійснення винаходу генотип, який надає рослині кукурудзи здатність утилізувати манозу, несе ген rpi1.

Ще одним варіантом здійснення даного винаходу є біологічний зразок, отриманий з рослини, тканини або насіння кукурудзи варіанта MIR604, де зразок містить нуклеотидну послідовність, яка являє собою або є комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, і де послідовність можна виявляти в зразку за допомогою методу ампліфікації нуклеїнової кислоти або гібридизації нуклеїнової кислоти. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу зразок вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є екстракт, отриманий з рослини, тканини або насіння кукурудзи варіанта MIR604, який містить нуклеотидну послідовність, яка являє собою або є комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу послідовність виявляють в екстракті за допомогою методу ампліфікації нуклеїнової кислоти або гібридизації нуклеїнової кислоти. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу зразок вибирають із групи, яка включає кукурудзяне борошно, кукурудзяний сироп, кукурудзяну олію, кукурудзяний крохмаль і зернові продукти, які повністю або частково складаються з побічних продуктів, отриманих з кукурудзи.

І ще одним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб одержання рослини кукурудзи, стійкої до зараження принаймні кукурудзяним жуком, який полягає в тому, що: (а) здійснюють статеве схрещування першої батьківської рослини кукурудзи із другою батьківською рослиною кукурудзи, де перша або друга батьківська рослина кукурудзи містить ДНК варіанта MR604, одержуючи тим самим множину рослин покоління першої генерації; (б) відбирають рослину покоління першої генерації, яка має стійкість до зараження принаймні кукурудзяним жуком; (в) здійснюють самозапилення

рослини покоління першої генерації, одержуючи тим самим множину рослин покоління другої генерації; (г) відбирають із рослин покоління другої генерації рослину, яка має стійкість до зараження принаймні кукурудзяним жуком; де рослини покоління другої генерації містять нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2.

Наступним варіантом здійснення даного винаходу є спосіб одержання гібридного насіння кукурудзи, який полягає в тому, що: (а) саджають насіння першої інбредної лінії кукурудзи, яке містить нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, яка включає SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4, і насіння другої інбредної лінії кукурудзи, яке має інший генотип; (б) культивують рослини кукурудзи із вказаної культури аж до цвітіння; (в) здійснюють емаскуляцію квіток рослин кукурудзи однієї з інбредних ліній кукурудзи; (є) здійснюють статеве схрещування двох різних інбредних ліній один з одним і (д) збирають отримане в результаті гібридне насіння. Відповідно до одного з аспектів цього варіанта здійснення винаходу перша інбредна лінія являє собою материнську форму. Відповідно до іншого аспекту цього варіанта здійснення винаходу перша інбредна лінія являє собою батьківську форму. Даний винахід стосується також гібридного насіння, отриманого за допомогою вказаного способу, і гібридних рослин, вирощених із насіння.

Фахівцям в даній галузі повинно бути очевидно, що трансгенний генотип, запропонований у даному винаході, можна вбудовувати шляхом селекції в інші лінії кукурудзи, які несуть інші трансгенні генотипи. Наприклад, інбредну лінію кукурудзи, яка несе трансгенний генотип, запропонований у даному винаході, можна схрещувати з інбредною лінією кукурудзи, яка несе трансгенний генотип стійкого до лускокрилих варіанта Bt11, відомого в даній галузі, одержуючи насіння кукурудзи, яке містить як трансгенний генотип, запропонований у винаході, так і трансгенний генотип Bt11. Прикладами інших трансгенних варіантів, які можна схрещувати з інбредною лінією, запропонованою в даному винаході, є толерантні до гліфосату варіанти GA21 і NK603, толерантний до гліфосату/стійкий до комах із ряду лускокрилих варіант MON802, стійкий до лускокрилих варіант DBT418, стійкий до лускокрилих варіант DAS-06275-8, варіант MS3, який має чоловічу стерильність, толерантний до фосфінотрицину варіант B16, стійкий до комах із ряду лускокрилих варіант MON 80100, толерантні до фосфінотрицину варіанти T14 і T25, стійкий до комах із ряду лускокрилих варіант 176 і стійкий до твердокрилих варіант MON863, всі ці варіанти відомі в даній галузі. Очевидно, що можна одержувати інші комбінації з використанням трансгенного генотипу, запропонованого у винаході, і таким чином, ці приклади не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Фахівцям в даній галузі також повинно бути очевидно, що трансгенне насіння кукурудзи, яке несе трансгенний генотип, запропонований у даному винаході, можна обробляти різними призначеними для обробки насіння хімічними агентами,

такими як інсектициди для посилення або синергетичного підвищення інсектицидної активності білка Cry3A055. Наприклад, трансгенне насіння кукурудзи можна обробляти інсектицидом Cruiser®, який надходить у продаж. Таку комбінацію можна застосовувати для розширення спектру активності й підвищення ефективності експресованого білка й хімічного агента.

#### Селекція

Трансгенний генотип, запропонований у даному винаході, можна вбудовувати в інбредну або гібридну лінію кукурудзи за допомогою відомих у даній галузі методів селекції. Метою селекції рослин є об'єднання в одному сорті або гібриді різних необхідних ознак. Для польових культур ці ознаки можуть являти собою стійкість до комах і хвороб, толерантність до гербіцидів, жаро- і посухостійкість, зниження часу дозрівання культури, більш високу врожайність і поліпшену агрономічну якість. При механічному збиранні врожаю багатьох культур велике значення має однорідність характеристик рослини, таких як проростання й створення травостою, швидкість росту й висота рослини й качана.

Польові культури запліднення з використанням кращого для рослини методу запилення. Рослина є самопильною, якщо пилок однієї квітки переноситься на цю ж або іншу квітку цієї рослини. Рослина є перехреснозапильною, якщо пилок потрапляє із квітки іншої рослини.

Рослини, які пройшли самозапилення й відібрані відносно типу протягом багатьох поколінь, стають гомозиготними практично за всіма генними локусами і утворюють однорідну популяцію чистого отриманого в результаті селекції потомства. Схрещування двох різних гомозиготних ліній дозволяє одержувати однорідну популяцію гібридних рослин, які можуть бути гетерозиготними за багатьма генними локусами. Схрещування двох рослин, кожна з яких є гетерозиготною за декількома генними локусами, повинне приводити до одержання популяції гібридних рослин, які є генетично різними й не можуть бути однорідними.

Кукурудзу можна запилювати як з використанням самозапилення, так і перехресного запилення. У кукурудзи існують відмінні одна від одної чоловічі й жіночі квітки, розташовані в волоті й качані відповідно. Природне запилення в кукурудзі відбувається, коли вітер переносить пилок з волоті на сукупність тичинкових стовпчиків (шовк), які виступають над верхівкою качанів.

Надійний метод контролю чоловічої фертильності в рослини дає можливість поліпшувати селекцію рослин. Це є особливо важливим для створення гібридів кукурудзи, основою яких є певний варіант системи чоловічої стерильності. Існує декілька шляхів контролю чоловічої фертильності, які доступні селекціонерам, такі як: ручна або механічна емаскуляція (або кастрація), цитоплазматична чоловіча стерильність, генетична чоловіча стерильність, гаметоциди й т.п.

Гібридне насіння кукурудзи одержують, як правило, за допомогою системи чоловічої стерильності, що передбачає ручну або механічну кастрацію. У поле висаджують альтернативні смужки

інбредних ліній кукурудзи й у рослин однієї з інбредних ліній (материнська форма) видаляють шовк, який несе пилок. За умови достатньої ізоляції від джерел чужорідного пилку інших рослин кукурудзи качани кастрованої інбредної лінії можуть запилювати тільки іншою інбредною лінією (батьківська форма) і в результаті отримане насіння є гібридним і з нього повинні утворюватися гібридні рослини.

Трудомісткий і часто ненадійний процес кастрації можна виключити шляхом застосування різноманітних методів додання генетичної чоловічої стерильності, відомих у даній галузі, кожний з яких має свої власні переваги й недоліки. Ці методи засновані на застосуванні різних підходів, таких як вбудовування в рослину гена, який кодує цитотоксичну субстанцію, зв'язану зі специфічним для тканини чоловічої статеві системи промотором, або антисмислової системи, у якій виявлений ген, який має вирішальне значення для фертильності, і він є антисмисловим для вбудованого в рослину гена [див.: Fabinjanski і ін., EPO 89/3010153.8 публікація № 329308 і заявку РСТ РСТ/CA90/00037, опубліковану як WO 90/08828].

#### Створення інбредних ліній кукурудзи

Застосування інбредних ліній із чоловічою стерильністю є одним зі шляхів одержання гібридів кукурудзи. Методи селекції рослин, які відомі в даній галузі і які застосовують у програмі селекції рослин кукурудзи включають (але, не обмежуючись ними), рекурентну селекцію, зворотне схрещування, селекцію на базі родоходу, селекцію, посилену за допомогою поліморфізму рестрикційних фрагментів, селекцію, посилену за допомогою генетичних маркерів, і трансформацію. Для створення гібридів кукурудзи в програмі селекції рослин кукурудзи потрібно, у цілому, створення гомозиготних інбредних ліній, схрещування цих ліній і оцінка гібридів. Методи селекції на базі родоходу й рекурентної селекції використовують для створення інбредних ліній з відібраних популяцій. Програми селекції рослин кукурудзи засновані на об'єднанні генетичних зворотних схрещувань не менше двох або більшої кількості інбредних ліній або різних інших джерел зародкової плазми в призначені для селекції пули, з яких одержують нові інбредні лінії шляхом самозапилення й добору необхідних фенотипів. Нові інбредні лінії схрещують із іншими інбредними лініями й оцінюють гібриди, отримані в результаті цих схрещувань, виявляючи тих з них, які мають комерційний потенціал. Селекція рослин і створення гібридів при втіленні на практиці програми селекції рослин кукурудзи, являють собою дорогі і потребуючі більших часових витрат процеси.

Селекцію на базі родоходу починають зі схрещування двох генотипів, кожний з яких може мати одну або декілька необхідних ознак, які відсутні в іншого, або які комплементарні один до одного. Якщо дві вихідні батьківські форми зовсім не несуть необхідних ознак, то для селекції популяції можна використовувати інші джерела. У методи селекції на базі родоходу здійснюють самозапилення найбільш перспективних рослин і відбирають покоління, які несуть необхідні ознаки. У на-

ступних поколіннях гетерозиготний стан переходить у гомозиготні лінії в результаті самозапилення й відбору. Як правило, при здійсненні на практиці селекції на базі родоходу проводять самозапилення й наступний відбір 5 або більшої кількості поколінь:  $F_1 \rightarrow F_2$ ;  $F_2 \rightarrow F_3$ ;  $F_3 \rightarrow F_4$ ;  $F_4 \rightarrow F_5$ ; і т.д.

Відбір на основі рекурентної селекції, наприклад, зворотне схрещування, можна застосовувати для поліпшення інбредної лінії й гібриду, створеного з використанням цих інбредних ліній. Зворотне схрещування можна використовувати для перенесення конкретної необхідної ознаки з однієї інбредної лінії або джерела в іншу інбредну лінію, у якій ця ознака відсутня. Це можна здійснювати, наприклад, шляхом першого схрещування найбільш перспективної інбредної лінії (рекурентний батько) з донорською інбредною лінією (нерекурентний батько), яка несе відповідний(і) ген(и), що кодує(ють) ознаку, що представляє інтерес. Потім здійснюють зворотне схрещування потомства, отриманого в результаті цього схрещування, з найбільш перспективним рекурентним батьком з наступним відбором отриманого потомства відносно необхідної ознаки, яка повинна бути перенесена від нерекурентного батька. Після одержання за допомогою зворотного схрещування 5 або більшої кількості поколінь із відбором за необхідною ознакою потомство повинне бути гомозиготним за локусом, який контролює переносиму ознаку, але повинне нагадувати найбільш перспективного батька практично за всіма іншими генами. Потім здійснюють самозапилення останнього отриманого від зворотного схрещування покоління з одержанням чистого отриманого в результаті селекції потомства за геном(ами), що підлягає(ють) перенесенню, який(і) переносять. Гібрид, створений з інбредних ліній, який містять ген(и), що підлягає(ють) перенесенню, є практично таким же, що й інбредні лінії, у яких відсутній(і) ген(и), що підлягає(ють) перенесенню.

Елітні інбредні лінії, які являють собою чисті отримані в результаті селекції гомозиготні інбредні лінії, можна також застосовувати як вихідні лінії для селекції або як популяції-джерела, з яких створюють інші інбредні лінії. Такі інбредні лінії, отримані з елітних інбредних ліній, можна створювати за допомогою методів селекції на базі родоходу й рекурентної селекції, які описані вище. Наприклад, коли селекцію за допомогою зворотного схрещування використовують для створення цих виведених ліній у програмі селекції рослин кукурудзи, то елітні інбредні лінії можна застосовувати як батьківську лінію або вихідний матеріал або популяції-джерела, і вони можуть служити або батьком-донором, або рекурентною батьківською формою.

Створення гібридів кукурудзи

Один отриманий схрещуванням гібрид кукурудзи створюють шляхом схрещування двох інбредних ліній, кожна з яких має генотип, комплементарний до генотипу іншого. Гібридне покоління першої генерації позначають як  $F_1$ . При створенні комерційних гібридів у програмі селекції рослин кукурудзи розглядаються тільки гібридні рослини

$F_1$ . Переважно  $F_1$ -гібриди є більш сильними в порівнянні інбредними батьками. Гібридна сила або гетерозис може проявлятися в цілому ряді полігенних ознак, включаючи посилений вегетативний ріст і підвищену врожайність.

Створення гібриду кукурудзи в рамках програми селекції рослин кукурудзи включає три стадії: (1) відбір рослин із груп з різною зародковою плазмою для початкових схрещувань із метою селекції; (2) самозапилення відібраних рослин, отриманих у результаті схрещування з метою селекції, протягом декількох поколінь із одержанням серій інбредних ліній, які хоча й відрізняються один від одного, передають ознаку потомству й мають високу однорідність; і (3) схрещування відібраних інбредних ліній з різними інбредними лініями з одержанням гібридного потомства ( $F_1$ ). У процесі процесу інбридингу в кукурудзі зростає сила ліній. Сила зберігається, коли дві різні інбредні лінії схрещують із одержанням гібридного потомства ( $F_1$ ). Важливим наслідком гомозиготності й гомогенності інбредних ліній є те, що гібриди двох певних пар інбредних ліній завжди є однаковими. Після того, як інбредні лінії, які дають найбільш перспективний гібрид, ідентифіковані, гібридне насіння можна відтворювати необмежено протягом строку, поки підтримується гомогенність інбредних батьків. Більша частина гібридної сили, характерної для  $F_1$ -гібридів, губиться в наступному поколінні ( $F_2$ ). У результаті насіння гібридів не використовують як посадковий матеріал.

Отримання гібридного насіння потребує елімінації або інактивації пилку, який утворюється на материнській формі. Неповне видалення або інактивація пилку служить причиною можливого самозапилення. Це отримане в результаті небажаного самозапилення насіння може бути ненавмисно зібране й упаковане разом з гібридними насіннями.

Після посадки насіння можна ідентифікувати й відбирати ці отримані в результаті самозапилення рослини. Ці отримані в результаті самозапилення рослини повинні бути генетично еквівалентні до материнської інбредної лінії, яку застосовують для одержання гібриду.

Як повинно бути очевидно фахівцю в даній галузі, вище викладені лише деякі різні шляхи, за допомогою яких можна одержувати інбредну лінію, запропоновану у винаході, з тих, які можна застосовувати для інтрогресії трансгенного генотипу, запропонованого у винаході, в інші лінії кукурудзи. Наведені вище приклади подані лише як ілюстрація, можна використовувати й інші шляхи.

Приклади

Нижче винахід докладно проілюстрований на прикладах. Ці приклади наведені лише з метою ілюстрації й не обмежують обсягу винаходу, якщо не вказане інше. У них використовуються стандартні методи рекомбінантної ДНК і молекулярного клонування, описані в *Current Protocols in Molecular Biology*, під ред. Ausubel, John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook і ін., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-є вид., Cold Spring Harbor, NY: вид-во Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); і в T.J. Silhavy, M.L. Berman і L.W.

Enquist, Experiments with Gene Fusions, вид-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

Приклад 1. Трансформація й відбір варіанта MR604

Варіант MIR604 одержували за допомогою опосередкованої *Agrobacterium* трансформації інбредної лінії кукурудзи (*Zea mays*) Al 88. Ембріоний калюс типу-I трансформували загалом відповідно до методу, описаного в Negrotto і ін. [Plant Cell Reports 19,2000, стор. 798-803, 2000], публікація включена в даний опис як посилання, використовуючи ДНК-фрагмент із плазмиди pZM26 (фіг. 1). pZM26 містить нуклеотидну послідовність, яка несе тандем касет експресії. Перша касета експресії містить послідовність промотору MTL (US 6018099), функціонально зв'язану з кодувальною послідовністю, Cru3A055, яка додатково функціонально зв'язана з 3'-кінцем термінатора транскрипції нопалінсинтази й послідовністю поліаденілування. Друга касета експресії містить промотор убікітину з кукурудзи (ZmUbiInt) [Christensen і ін., PMB 18, 1992, с 675], функціонально зв'язаний з кодувальною послідовністю, рm1, яка додатково функціонально зв'язана з 3'-кінцем термінатора транскрипції нопалінсинтази й послідовністю поліаденілування. Незрілі ембріони вирізали з 8 - 12-денних качанів і промивали свіжим середовищем для підготовки до трансформації. Ембріони змішували із суспензією клітин *Agrobacterium*, які несуть трансформаційний вектор pZM26, інтенсивно перемішували протягом 30 с і давали інкубуватися протягом ще 5 хв. Надлишок розчину *Agrobacterium* видаляли аспірацією й потім ембріони переносили в чашки, які містять неселективне культуральне середовище. Ембріони культивували разом із *Agrobacterium*, що залишилися, при 22°C протягом 2-3 днів у темряві. Ембріони переносили в культуральне середовище, доповнене тикарицином (100 мг/мл) і нітратом срібла (1,6 мг/л) і інкубували в темряві протягом 10 днів. Ембріони, які продукують ембріоний калюс, переносили в культуральне середовище, що містить манозу.

Отримані в результаті регенерації проростки тестували за допомогою ПЛР-аналізу TAQMAN® (див. приклад 2), визначаючи присутність як гена рт1, так і гена Cru3A055, а також відсутність гена, який обумовлює стійкість до антибіотика спектиноміцину (spes). Рослини, позитивні щодо обох трансгенів і негативні щодо гена spes, переносили в теплицю для подальшого культивування. Позитивні варіанти ідентифікували й піддавали скринінгу за допомогою біологічних аналізів з використанням комах, тобто кукурудзяного жука. У варіантів, які мають інсектицидну дію, визначали кількість копій за допомогою TAQMAN-аналізу. Основою для вибору варіанта MIR604 для подальшого аналізу служила наявність однієї копії трансгенів, достатній рівень експресії білка, визначений за допо-

могою ELISA, і висока інсектицидна активність у відношенні кукурудзяного жука.

Рослини варіанта MIR604 популяції T<sub>0</sub> піддавали зворотному схрещуванню з інбредною лінією кукурудзи CG00526, створюючи популяцію T<sub>1</sub>. Рослинам популяції T<sub>1</sub> давали самозапилюватися для створення покоління T<sub>2</sub> і цей процес повторювали, створюючи покоління T<sub>3</sub>. Потомство T<sub>3</sub>-рослин застосовували для ідентифікації гомозиготних (конвертованих) родин. Інбредну MIR604-конвертовану лінію CG00526 схрещували з іншими елітними інбредними лініями, одержуючи застосовувані в подальших дослідженнях гібриди.

Приклад 2. Виявлення MR604 за допомогою ТАОМАН-ПЛР

ТАQMAN-аналіз здійснювали в основному відповідно до методу, описаного в Ingham і ін. [Biotechniques, 31, 2001, стор. 132-140], публікація включена в даний опис як посилання. У цілому, метод полягає в наступному: геному ДНК виділяли з листя трансгенів і нетрансгенів рослин кукурудзи, використовуючи набір для екстракції геномної ДНК Puregene® (фірма Gentra Systems, Мінеаполіс, шт. Мінесота) у цілому відповідно до інструкції виробника, за винятком того, що всі стадії здійснювали в 1,2-мілілітрових 96-лункових планшетах. Висушений дебрис ДНК ресуспендували в ТЕ-буфері (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTK).

ТАQMAN-ПЛР здійснювали в 96-лункових планшетах. Для ендogenous контролю генів кукурудзи створювали праймери й зонди, специфічні для гена алкоголь-дегідрогенази (adh) *Zea mays* (Genbank, реєстраційний № AF044295). Фахівцям в даній галузі повинно бути очевидно, що як ендogenous контролю можна застосовувати інші гени кукурудзи. Реакції здійснювали в декількох повторях для одночасної ампліфікації генів Cru3A055 і adh або рm1 і adh. Для кожного зразка створювали майстер-суміш, об'єднуючи 20 мкл екстрагованої геномної ДНК із 35 мкл 2×TAQMAN Universal PCR Master Mix (фірми Applied Biosystems), доповненої праймерами до кінцевої концентрації кожного 900 нМ, зондами до кінцевої концентрації кожного 100 нМ і водою до кінцевого об'єму 70 мкл. Цю суміш розподіляли на 3 повтори по 20 мкл кожна в 96-лункові планшети для ампліфікації й запечатували оптично прозорою термоплівкою для покриття (фірма Marsh Bio Products). ПЛР здійснювали з використанням пристрою ABI Prism 7700, застосовуючи наступні параметри ампліфікації: 2 хв при 50°C і 10 хв при 95°C, потім 35 циклів по 15 із при 95°C і 1 хв при 60°C.

Результати TAQMAN-аналізу продемонстрували, що варіант MIR604 мав одну копію гена Cru3A055 і одну копію тенарті.

Приклади прийнятих застосовуваних комбінацій послідовностей праймерів/зондів, наведені нижче:

Назва праймеру	Послідовність праймеру	SEQ ID NO:
Cry3A055-прямий	5'-TACGAGAGCTGGGTGAACCTTCA-3'	SEQ ID NO: 47
Cry3A055-зворотний	5'-CGATCAGGTCCAGCACGG-3'	SEQ ID NO: 48
Cry3A055-зонд	5'-CCGCTACCGCCGCGAGATGA-3'	SEQ ID NO: 49
(5'-мітка = FAM, 3'-мітка = TAMRA)		
PMI-прямий	5'-CCGGGTGAATCAGCGTTT-3'	SEQ ID NO: 50
PMI-зворотний	5'-GCCGTGGCCTTTGACAGT-3'	SEQ ID NO: 51
PMI-зонд	5'-TGCCGCCAACGAATCACCGG-3'	SEQ ID NO: 52
(5'-мітка = FAM, 3'-мітка = TAMRA)		
ZmADH-267-прямий	5'-GAACGTGTGTGGGTTTGCAT-3'	SEQ ID NO: 53
ZmADH-337-зворотний	5'-TCCAGCAATCCTTGACACCTT-3'	SEQ ID NO: 54
ZmADH-316-зонд	5'-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-3'	SEQ ID NO: 55
(5'-мітка = TET, 3'-мітка = TAMRA)		

Приклад 3. Виявлення MIR604 за допомогою Саузерн-блотингу. Застосовували для аналізу методом Саузерн-блотингу геномну ДНК виділяли з об'єднаної листової тканини 10 рослин, що представляють собою отриману в результаті 6 зворотних схрещувань (BC6) генерацію MIR604, використовуючи в цілому метод, описаний в Thomas і ін. [Theor. Appl. Genet. 86, 1993, стор. 173-180], публікація включена в даний опис як посилання. Всі рослини, застосовували для виділення ДНК, індивідуально аналізували за допомогою TAQMAN-ПЛР (відповідно до методу, описаного в прикладі 2) для підтвердження присутності однієї копії гена Cry3A055 і теіарті. Для одержання негативних сегрегантних контролів ДНК виділяли з об'єднаної листової тканини 5 рослин, які представляють собою BC4-генерацію варіанта MIR604. Ці рослини, застосовували як негативні сегрегантні контролі, аналізували індивідуально за допомогою TAQMAN-ПЛР, і за даними аналізу вони виявилися негативними з погляду присутності гена Cry3A055 і гени рт, але, як і очікувалося, виявилися позитивними відносно внутрішнього контролю, тобто ендогенного гена *adh* кукурудзи.

Аналіз методом Саузерн-блотингу здійснювали за допомогою загальноприйнятих для молекулярної біології методів. Геномну ДНК (7,5 мкг) розщеплювали за допомогою рестриктази KpnI, яка має єдиний сайт розпізнавання в Т-ДНК-вставці MIR604 із плазміді рZM26 (фіг. 1). Цей підхід дозволяє визначати кількість копій елементів, що відповідають специфічному застосовуваному для Саузерн-блотингу зонду, який був вбудований в MIR604. Це привело до утворення однієї смуги гібридизації на одну копію елемента, який присутній в MIR604. Після електрофорезу на агарозному гелі й лужному переносі на мембрану типу Nytran® здійснювали гібридизацію з використанням специфічних для елемента повнорозмірних отриманих за допомогою ПЛР зондів. Зонд, застосовуваний для Саузерн-блотів cry3A055 ірті, містив нуклеотидні послідовності, представлені в SEQ ID NO: 58 і SEQ ID NO: 61 відповідно. Зонди мітили за допомогою <sup>32</sup>P шляхом довільного примування з використанням системи Rediprime™ II (фірма Amersham Biosciences, каталожний № RPN1633).

Застосовували наступні строгі умови гібридизації: 1-2 мільйона cpm/мл додавали до середовища PerfectHyb (фірма Sigma), доповненого 100 мкг/мл ДНК тимуса теляти (фірма Invitrogen), який попередньо витримували при 65°C. Попередню гібридизацію проводили в такому ж розчині, що описаний вище, при такій же температурі протягом ночі або протягом принаймні 1 год. Гібридизацію проводили при 65°C протягом 3 год із наступним дворазовим відмиванням в 2×SSC, 0,1% ДСН протягом 20 хв при 65°C і дворазовим відмиванням в 0,1×SSC, 0,1% ДСН протягом 20 хв при 65°C.

У кожний аналіз методом Саузерн-блотингу включали 3 контрольні зразки: (1) ДНК із негативного (нетрансформованого) сегреганту, застосовуваного для ідентифікації будь-яких ендогенних послідовностей *Zea mays*, що може перехресно гібридизуватися зі специфічним для елемента зондом; (2) ДНК із негативного сегреганту, у який інтродукована розщеплена за допомогою KpnI плазміді рZM26 у кількості, що дорівнює одній копії в перерахунку на довжину зонда, для демонстрації чутливості експерименту з погляду виявлення однієї копії гена у геномі *Zea mays*, і (3) розщеплена за допомогою KpnI плазміді рZM26 у кількості, що дорівнює одній копії в перерахунку на довжину зонда, як позитивний контроль гібридизації, а також для демонстрації чутливості методу експерименту.

Дані гібридизації підтвердили результати, отримані за допомогою TAQMAN-ПЛР про те, що MIR604 містить по одній копії гена Cry3A055 і гени рті і що MIR604 не містить яких-небудь послідовностей каркаса вектора, які присутні в рZM26. Як і очікувалося для обох Cry3A055- рті-зондів розщеплення за допомогою KpnI приводило до одержання однієї смуги гібридизації правильного розміру, що свідчить про наявність по одній копії кожного гена у варіанті MIR604. Крім того, встановлено, що відсутня гібридизація із зондом для каркаса, що свідчить про відсутність яких-небудь послідовностей каркаса вектора рZM26, включених в MIR604 у процесі трансформації.

Приклад 4. Секвенування Т-ДНК-вставки



Визначали нуклеотидну послідовність повної трансгенної ДНК-вставки, яка присутня у варіанті MIR604, для підтвердження повної цілісності вставки, послідовності функціональних елементів і для виявлення будь-яких замін індивідуальних пар основ. MIR604-вставку ампліфікували за допомогою ПЛР із використанням ДНК, отриманої з BC5-генерації, у вигляді двох індивідуальних фрагментів, які перекриваються. Кожний фрагмент ампліфікували за допомогою одного полінуклеотидного праймеру, гомологічного до геномних послідовностей рослини, які фланкують MIR604-вставку, і одного полінуклеотидного праймеру, гомологічного до гену *сгу3A055*. Для створення 5'-фрагмента перший полінуклеотидний праймер, гомологічний до 5'-фланкуючої послідовності, тобто 5'S1 (SEQ ID NO: 15), об'єднували із другим полінуклеотидним праймером, гомологічним до ДНК, вбудованої в ген *сгу3A055*, тобто 5'AS1 (SEQ ID NO: 28). Для створення 3'-фрагмента перший полінуклеотидний праймер, гомологічний до 3'-фланкуючої послідовності, тобто 9268AS (SEQ ID NO: 45), об'єднували із другим полінуклеотидним праймером, гомологічним до ДНК, вбудованої в ген *сгу3A055*, тобто 5161S (SEQ ID NO: 27).

Для ПЛР-ампліфікації застосовували ПЛР-систему Expand High Fidelity (фірма Roche, каталожний № 1732650) і наступні параметри ампліфікації: 2 хв при 94°C протягом 1 циклу, потім 10 циклів по 15 із при 94°C, 30 із при 55-65°C і 5 хв при 68°C, потім 20 циклів по 15 із при 94°C, 30 із при 55-65°C і 5 хв+5 з/цикл при 72°C, потім один цикл 7 хв при 72°C.

Амплікони, отримані у результаті ПЛР-ампліфікації з використанням SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 28, містив послідовність 5'-стику (SEQ ID NO: 1). Амплікони, отримані у результаті ПЛР-ампліфікації з використанням SEQ ID NO: 45 і SEQ ID NO: 27, містив послідовність 3'-стику (SEQ ID NO: 2). Кожний секвенований фрагмент клонували індивідуально у векторі pCR® -XL-TOPO (фірма Invitrogen, каталожний №. K4700-20) і три різні клони кожного фрагмента ідентифікували й секвеновали. Секвеновання здійснювали за допомогою аналізатора ABI3730XL, використовуючи хімічний аналіз на основі ABI BigDye® 1.1 або Big Dye 3.1 дГТФ (для багатих на GC матриць). Аналіз послідовностей здійснювали за допомогою пакета програм Phred, Phrap і Consed, отриманих з Університету Вашингтона, і здійснювали при частоті появи помилок менше 1 на 10000 основ (Ewing і Green, 1998). Кінцеву консенсусну послідовність визначали, об'єднуючи дані про послідовності шести індивідуальних клонів (по три для кожного фрагмента, який підлягає секвенованню), для створення однієї консенсусної послідовності MIR604-вставки. Для додаткового підтвердження будь-яких індивідуальних відмінностей пар основ між MIR604-вставкою й плазмідною рZM26 за допомогою вказаного вище методу ампліфікували невеликі (приблизно 300-500 пар основ) ПЛР-продукти, специфічні для будь-яких ділянок, у яких відмінності пар основ були виявлені в початковій консенсусній послідовності. Для всіх передбачуваних відмінностей пар основ в MIR604-вставці безпосереднє сек-

венування ПЛР-продукту показало наявність індивідуальних чітких піків, які відповідають всім розглянутим парам основ, що свідчить про те, що ці відмінності, імовірно, присутні в MIR604-вставці. Порівняльний аналіз первинної структури здійснювали за допомогою програми Clustal з наступними параметрами: зчитувальна матриця *blosum55*, штраф за відкриття пролому 15, штраф за подовження пролому 6.66 (Thompson і ін., *Nucleic Acids Research*, 22, 1994, еє. 4673-4680).

Дані, отримані для консенсусної послідовності Т-ДНК-вставки MIR604, продемонстрували повну цілісність вставки й те, що у вставці зберігалася послідовність функціональних елементів, яка передбачалася для рZM26. Аналіз послідовності дозволив виявити деяке вкорочення кінців правої пограничної ділянки (RB) (SEQ ID NO: 57) і лівої пограничної ділянки (LB) (SEQ ID NO: 62) Т-ДНК-вставки в процесі трансформації, за допомогою якої одержували варіант MIR604. RB-ділянки Т-ДНК-вставки вкоротилася на 44 пари основ, а LB-кінець Т-ДНК-вставки вкоротився на 43 пари основ. Ці делеції не впливали на ефективність Т-ДНК-вставки, і цей феномен раніше описаний для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації [Tinland і Hohn, *Genetic Engineering*, 17, 1995, стор. 209-229]. Крім того, виявлені три заміни пар основ у Т-ДНК-вставці MIR604. Одна зміна відбулася всередині промотору MTL, тобто регуляторної ділянки, яка не кодує білок. Дві інші зміни виявлені в кодувальній послідовності *rm1* і привели до двох амінокислотних замін; валін у положенні 61 замінений аланіном (V61A) і глутамін у положенні 210 замінений гістидином (Q210H). Аланін і валін обидва являють собою аліфатичні амінокислоти, їх заміна являє собою консервативну заміну. Заміна глутаміну на гістидин являє собою заміну кислотного залишку на основний залишок.

Приклад 5. Аналіз фланкуючих послідовностей ДНК

Геномну послідовність ДНК кукурудзи, яка фланкує гетерологічну ДНК, вбудовану в геном рослини кукурудзи варіанта MR604, одержували за допомогою методу OmniPlex™, описаного в цілому в Kamberov і ін. [Proceedings of SPIE, 4626, 2002, стор. 1-12], публікація включена в даний опис як посилання.

5'- і 3'-фланкуючі послідовності й пограничні послідовності підтверджували за допомогою стандартних ПЛР-аналізів. 5'-фланкуючу послідовність і пограничну послідовність підтверджували з використанням першого набору полінуклеотидних праймерів, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 або SEQ ID NO: 13, які об'єднували із другим набором полінуклеотидних праймерів, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 17. 3'-фланкуючу послідовність і пограничну послідовність підтверджували з використанням першого набору полінуклеотидних праймерів, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 або SEQ ID NO: 44, які об'єднували із другим набором полінуклеотидних праймерів, послідовності

яких представлені в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 або SEQ ID NO: 36. Як повинно бути очевидно фахівцю в даній галузі, для підтвердження фланкуючих послідовностей і пограничних послідовностей можна використовувати інші праймерні послідовності.

Встановлено, що MIR604-вставка фланкувалась на правій пограничній ділянці (5'-фланкуюча послідовність) геномною послідовністю рослини кукурудзи, представленою в SEQ ID NO: 5, і фланкувалась на лівій пограничній ділянці (3'-фланкуюча послідовність) геномною послідовністю рослини кукурудзи, представленою в SEQ ID NO: 6. Послідовність 5'-стику представлена в SEQ ID NO: 1. Послідовність 3'-стику представлена в SEQ ID NO: 2.

Приклад 6. Виявлення білка MIR604 за допомогою ELISA

Для оцінки рівня експресії білків Cry3A055 (субстанція, яка має інсектицидну активність) і фосфоманозоізомерази (PMI) (селектований маркер) у рослинах варіанта MIR604 концентрацію білка Cry3A055 і PMI визначали за допомогою ELISA у декількох рослинних тканинах і в цілих рослинах на чотирьох стадіях росту (утворення кільця, цвітіння, зрілість насіння і зів'янення) двох гібридних (MR604-B і MIR604-C) і однієї інбредної лінії (MIR604-A). Гібриди варіанта MIR604 були гемізиготними за трансгенами, а інбредна лінія була гомозиготною за трансгенами.

Цілі рослини і їх окремі частини (крім пилку) перетворювали в тонкоподрібнений порошок шляхом обробки або в кавомолці, або в блендері, або в дробарці типу Grindomix™ (фірма Brinkmann Instruments; Уестбурі, шт. Нью-Йорк, США), за допомогою ступки й товчачика або млина або шляхом сполучення цих пристроїв. Всю обробку здійснювали в присутності або сухого льоду, або рідкого азоту. Зразки добре перемішували до гомогенного стану. Зразок тканини всієї рослини або відповідний більш дрібний зразок зберігали для аналізу, залишаючи зразок достатнього розміру для збереження в архіві резервних зразків рослинної тканини. Визначали масу кожного зразка в сухому стані (у відсотках) і оброблені зразки зберігали при температурі приблизно -80°C до ліофілізації.

Екстрагували свіжу тканину (крім пилку й силосу) і зразки всієї рослини. Для кожного аналізованого зразка аліквотну кількість (1,0 г) порошкоподібного свіжого матеріалу поміщали в 15-мілілітрову поліпропіленову пробірку, суспендували в 3 мл буфера для екстракції [50 mM CAPS, 0,1 M NaCl, 2 mM ЕДТК, 1 mM дитіотреїтол, 1 mM4-(1-аміноетил)бензолсульфоніл фторид  $\times$  HCl, 1 mM лейпептин, pH 10] і екстрагували з використанням гомогенізатора Autogizer® (фірма Tomtek; Хамдем, шт. Коннектикут, США). Після центрифугування протягом 15 хв при 10000  $\times$ g при 4°C супернатант використовували для аналізу Cry3A055 і PMI за допомогою ELISA. Після обробки йодацетамідом відповідно до методу, описаного в HIH і Straka (1988), кількість загального білка в екстрактах визначали за допомогою системи BCA™ Protein Assay

Reagent (фірма Pierce; Рокфорд, шт. Іллінойс, США).

Екстракти пилку готували суспендуванням пилку в співвідношенні 1:30 (мас/об.) у буфері для екстракції. Після витримування протягом 30 хв на льоді суспензії пилку дезінтегрували, пропускаючи тричі через динамометричний елемент Френча приблизно при 15000 фунтів/кв. дюйм із наступним центрифугуванням при 14000  $\times$ g протягом 5 хв при 4°C. Для аналізу Cry3A055 і PMI за допомогою ELISA використовували описані вище супернатанти. Кількість загального білка визначали відповідно до описаного вище методу.

Екстракти силосу готували, суспендуючи силос у співвідношенні 1:25 (мас/об.) в 2х буфері для екстракції. Після витримування протягом 30 хв на льоді суспензії силосу екстрагували, використовуючи гомогенізатор Brinkmann Polytron® (фірма Brinkmann; Уестбурі, шт. Нью-Йорк, США). Супернатанти, отримані після центрифугування протягом 15 хв при 10000  $\times$ g при 4°C використовували для аналізу Cry3A055 і PMI за допомогою ELISA. Кількість загального білка визначали відповідно до описаного вище методу. Кількісна оцінка Cry3A055

В екстрактах, отриманих за допомогою описаного вище методу, кількісно визначали Cry3A055 за допомогою ELISA (Tijssen, 1985), використовуючи очищені за допомогою імуноафінної хроматографії кролячі поліклональні антитіла до Cry3A055 і очищені за допомогою імуноафінної хроматографії козячі поліклональні антитіла до Btt (нативний Cry3A з *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*). Визначали нижню межу кількісної оцінки при використанні подвійного сендвіч-ELISA на основі найнижчої концентрації чистого референс-білка, що знаходиться у лінійній ділянці стандартної кривої, максимального об'єму контрольного екстракту, який можна аналізувати без урахування фонового рівня й відповідної маси зразка в даній аліквоті.

Рівні білка Cry3A055, які піддаються кількісній оцінці, виявляли у всіх отриманих з рослин варіанта MIR604 тканинах крім пилку. У більшості випадків результати виражали у вигляді середніх значень для зразків, взятих у п'ятьох повторях. Для силосу аналізували один зразок; тому середнє значення не розраховували. Рівні в контрольних зразках були нижче за межу кількісної оцінки для всіх стадій розвитку й тканин.

Для всіх стадій розвитку середні рівні Cry3A055, визначені в листі, коріннях і цілих рослинах становили приблизно 3-23 мкг/г свіжої маси (4 - 94 мкг/г сухої маси), приблизно 2-14 мкг/г свіжої маси (7 - 62 мкг/г сухої маси) і приблизно 0,9 -11 мкг/г свіжої маси (3 - 28 мкг/г сухої маси) відповідно. Середні рівні Cry3A055 у зернах на стадії зрілості насіння і на стадії зів'янення становили приблизно 0,6 -1,4 мкг/г свіжої маси (0,8 - 2,0 мкг/г сухої маси). Середні рівні Cry3A055 у листі, виміряні в тканині шовку на стадії цвітіння виявилися нижче за нижню межу кількісної оцінки (LOQ), <0,1 мкг/г свіжої маси (<1,0 мкг/г сухої маси). Середні рівні Cry3A055 у тканині шовку, оцінені на стадії зрілості насіння, становили приблизно 0,6 -1,9 мкг/г свіжої маси (1-3 мкг/г сухої маси). Білок Cry3A055 не виявлений у пилку ні в інбредній лінії

MIR604-A, ні в гібридах MIR604-B і MIR604-C [межа визначення (LOD) = 0,07 мг/г свіжої маси, 0,15 мг/г сухої маси].

Рівні Cry3A055, у цілому, виявилися близькими в гібридах для кожного типу тканини в кожний момент часу. В інбредній лінії рівень експресії Cry3A055 у цілому виявився вище в порівнянні з гібридами в листі, коріннях і цілих рослинах на стадіях утворення кільця й цвітіння, і в коріннях на стадії зрілості насіння. Середні рівні Cry3A055 у тканинах силосу становили приблизно 2,5 мг/г свіжої маси (7,3 мг/г сухої маси) при оцінці через 15, 29 і 75 днів. Для порівняння, рівень Cry3A055, визначені в кукурудзяній січці до силосування (день 0 до силосування), становив приблизно 8 мг/г свіжої маси (20 мг/г сухої маси.).

#### Кількісне визначення PMI

Кількісну оцінку PMI в екстрактах, отриманих відповідно до описаного вище методу, здійснювали за допомогою ELISA (Tjissen, 1985), використовуючи очищені на протеїні А поліклональні кролячі й очищені за допомогою імуноафінної хроматографії поліклональні козячі антитіла, специфічні для PMI. Визначали нижню межу кількісної оцінки при використанні подвійного сендвіч-ELISA на основі найнижчої концентрації чистого референс-білка, що знаходиться у лінійній ділянці стандартної кривої, максимального об'єму контрольного екстракту, який можна аналізувати без урахування фонового рівня й відповідної маси зразка в даній аліквоті.

Рівень білка PMI виявляли в більшості отриманих з рослин варіанта MIR604 проаналізованих тканинах, хоча він виявився дуже низьким у листі. У більшості випадків результати виражали у вигляді середніх значень для п'яти повторів зразків. Для силосу аналізували один зразок; тому середнє значення не розраховували. Рівні в контрольних зразках були нижче за межу кількісної оцінки для всіх стадій розвитку й тканин.

Для всіх стадій рослини середні рівні PMI, визначені в листі, коріннях і цілих рослинах знаходилися в діапазоні від невизначуваних (ND) до приблизно 0,4 мг/г свіжої маси. (ND відповідає 2,1 мг/г сухої маси), від рівня нижче LOQ (<0,03 мг/г свіжої маси) до приблизно 0,2 мг/г свіжої маси (<0,1 - 1,0 мг/г сухої маси) і від рівня нижче LOQ (<0,02 мг/г свіжої маси) до приблизно 0,3 мг/г свіжої маси (<0,04 - 2 мг/г сухої маси) відповідно. Середні рівні PMI у зернах на стадії зрілості насіння і на стадії зів'язання знаходилися в діапазоні від рівня нижче LOQ (<0,06 мг/г свіжої маси) до приблизно 0,4 мг/г свіжої маси (<0,07 - 0,5 мг/г сухої маси). Середні рівні PMI у тканині шовку, оцінені на стадії цвітіння й зрілості насіння знаходилися в діапазоні від рівня нижче LOQ (<0,1 мг/г свіжої маси) до приблизно 0,8 мг/г свіжої маси (<0,2 - 6,8 мг/г сухої маси.). Рівні PMI у пилку становили приблизно 1,9 - 2,6 мг/г свіжої маси (3,9 - 5,2 мг/г сухої маси.).

Рівні PMI, у цілому, виявилися близькими в гібридах для кожного типу тканини в кожний момент часу. PMI не був виявлений у силосі у всіх трьох зразках, отриманих у різні моменти часу (день 15, 29 і 75), у той час як рівні, визначені в кукурудзяній

січці до силосування (день 0 до силосування) становили приблизно 0,3 мг/г свіжої маси (0,7 мг/г сухої маси).

Визначення загальних рівнів білка Cry3A055 на акр і на гектар

Рослини інбредної лінії (MIR604-A) і обох гібридних ліній (MIR604-B і MIR604-C) досягали найбільшої біомаси на стадії зрілості насіння. На стадії зрілості насіння у рослинах виявлені також максимальні встановлені середні рівні Cry3A055 у перерахунку на акр (і на гектар), які становили приблизно 78, 141 і 240 г Cry3A055/акр (193, 348 і 592 г/га) для MIR604-A, MIR604-B і MIR604-C відповідно. Залежно від вегетаційного періоду й генотипів визначені середні рівні Cry3A055, отриманого з рослин варіанта MIR604, становили від приблизно 8 г Cry3A055/акр (21 г Cry3A055/га) на стадії зів'язання до приблизно 240 г Cry3A055/акр (592 г Cry3A055/га) на стадії зрілості насіння, приймаючи, що щільність посадки становила 26500 рослин на акр (65500 рослин/га).

Приклад 7. Ефективність MIR604 у польових умовах

Кукурудзяний жук західний й північний

Оцінювали ефективність рослин варіанта MIR604 у відношенні кукурудзяного жука західного і північного в 12 районах Сполучених Штатів. Оцінку ефективності MIR604 проводили в умовах додаткової інсектицидної обробки насіння інсектицидом Crusier® і без такої обробки. Контрольні групи включали насіння, оброблені Cruiser® при використанні двох різних норм витрати, і необроблені контроль. Для обробок використовували взяті в 4 повторах два 17,5-20-футових ряди, розташовані під кутом 30° від центру, які представляють собою рандомізований повний блок. Довільно вибирали по 10 рослин на обробку й оцінювали ефективність за допомогою 0-3-бальної шкали, де 0 означає відсутність зв'язаних з харчуванням ушкоджень (найнижчий бал, який можна одержувати; 1 означає один поїджений вузол (коло на корені) або еквівалентний повний вузол на відстані в межах приблизно 2 дюймів стебла (на лінії ґрунту знаходиться 7-ий вузол); 2 означає два повністю поїджених вузли; 3 означає три або більшу кількість поїджених вузлів (найвищий бал, який можна одержувати). Ушкодження повних вузлів виражали у відсотках втрати вузла, тобто 1,50 означає, що з'їдено 1/2 вузла, 0,25 означає що з'їдено 1/4 вузла.

Результати, наведені в таблиці 1, демонструють, що корені двох ліній-сибсів MIR604, 3-11 і 3-12, мали істотно менше зв'язаних з харчуванням ушкоджень, ніж корені рослин, насіння яких були оброблені інсектицидом Cruiser®, або корені необроблених контрольних рослин. Бал ушкодження коренів рослин MIR04-3-11 і MIR604-3-12 становив 0,44 і 0,42 відповідно, для порівняння, бал ушкодження коренів рослин, насіння яких обробляли інсектицидом Cruiser® з розрахунку 0,25 і 1,25 мг д. р. /насінину, становив 1,6 і 0,9 відповідно, а в контрольній лінії бал ушкодження становив 2,14. Виявлено тенденцію до одержання меншого бала ушкодження коренів рослин MIR604, насіння яких обробляли інсектицидом Cruiser®, що дозволяє

припустити, що Crusier® підвищує рівень білка Cru3A055 або що існує синергізм між інсектицидом Crusier® і білком Cru3A055. Це підтверджується тим, що при обробці з розрахунку 1,0 і 1,25 мг д.р./насініну варіанта MIR604 бал ушкодження коренів становив 0,33 і 0,29 відповідно.

Таблиця 1

Ефективність MIR604 у сполученні з обробкою насіння інсектицидом Crusier® і без обробки

Лінія кукурудзи	Обробка Crusier® (мг буд. в. /насініня)	Бал ушкодження коренів (0-3 за CRW-шкалою)
MIR604-3-11	0	0,44
MIR604-3-12	0	0,42
MIR604	0,25	0,43
MIR604	0,50	0,39
MIR604	1,0	0,33
MIR604	1,25	0,29
Контрольний гібрид	0,25	1,60
Контрольний гібрид	1,25	0,99
Контрольний гібрид	0	2,14

Ефективність MIR604 порівнювали зі стандартними гранульованими інсектицидами, які надходять у продаж, при внесенні в борозну. Експерименти здійснювали аналогічно до описаного вище методу. Результати, наведені в таблиці 2, демонструють, що ефективність MIR604 відносно захисту рослин від ушкоджень, зв'язаних з харчуванням кукурудзяного жука, порівнянна з ефективністю стандартних інсектицидів, які надходять у продаж.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність MIR604 і інсектицидів, які надходять у продаж, при внесенні в борозну

Обробка	Бал ушкодження коренів (0-3 за CRW-шкалою)
MIR604	0,43
Force® 3G	0,44
Aztec® 6,7G	0,32
Lorsban® 15 G	0,75
Необроблений контроль	2,4

Кукурудзяний жук мексиканський

Оцінювали стійкість рослин варіанта MIR604 у відношенні кукурудзяного жука мексиканського у двох районах Техасу. Експерименти здійснювали аналогічно до описаного вище методу.

Результати, представлені в таблиці 3, демонструють, що обидві лінії-сисби MIR604 мали істотно менше зв'язаних з харчуванням ушкоджень у порівнянні з необробленим контролем. Виявлено

поліпшений результат відносно боротьби із кукурудзяним жуком мексиканським, коли насіння MIR604 додатково обробляли інсектицидом Crusier. Добре видна залежність реакції від норми витрати. Результати, представлені в таблиці 4, демонструють, що ефективність MIR604 відносно захисту рослин від ушкоджень, зв'язаних з харчуванням кукурудзяного жука мексиканського, порівнянна з ефективністю стандартних інсектицидів, які надходять у продаж.

Таблиця 3

Ефективність у відношенні кукурудзяного жука мексиканського MIR604 у сполученні з обробкою насіння інсектицидом Crusier і без обробки

Обробка	Обробка Crusier® (мг д. р./насініну)	Бал ушкодження коренів (0-3 за CRW-шкалою)
MIR604-3-11	0	1,14
	0,125	0,19
	0,25	0,18
	0,50	0,09
	1,25	0,02
MIR604-3-12	0	0,68
	0,125	0,46
	0,25	0,18
	0,50	0,21
	1,25	0,04
Контрольний гібрид	0,125	1,59
	1,25	0,71
	0	2,76

Таблиця 4

Порівняльна ефективність у відношенні кукурудзяного жука мексиканського MIR604 і інсектицидів, які надходять у продаж, при внесенні в борозну

Обробка	Бал ушкодження коренів (0-3 за CRW-шкалою)
MIR604	0,68
Force® 3G	0,66
Aztec® 6,7G	0,88
Lorsban® 15 G	0,81
Необроблений контроль	2,76

Всі заявки на патент і публікації що згадують у даному описі, представлені для фахівців в галузі, до якої належить даний винахід. Всі публікації й заявки на патент включені в даний опис як посилання в тому ступені, яким кожна індивідуальна публікація або заявка на патент була спеціально й індивідуально включена в нього як посилання.

Хоча вище винахід описаний із зазначенням деяких деталей, які дані з метою ілюстрації, і прикладів, які подані для кращого розуміння винаходу, очевидно що під обсяг даного винаходу при його втіленні на практиці підпадають певні заміни й модифікації.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Сінгента Партісіпейшнс АГ  
 STEINER, Henry-York  
 CHEN, Eric  
 MEGHJI, Moez

<120> Варіант кукурудзи MIR604

<130> 70227PCT

<160> 63

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> стик 5'-кінця геному - вставки

<400> 1

aattcaacag aaggcgggaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223> стик 3'-кінця вставки - геному

<400> 2

tgttattaag agttggtggt

20

<210> 3

<211> 1312  
 <212> ДНК  
 <213> *Zea mays*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1310)  
 <223> послідовність 5'-кінця геному +вставки

<400> 3  
 ccccgcggtt cgttgcccct ggccgggtacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60  
 ggccggccgc tcgctcgctt ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120  
 caccaccac ccgtctttgc ccaaagcgac ccggcacagg ccgcgcggc ttcactaacc 180  
 actagcgctt gtactaataa aatggtttct agcgtttggt gctctctttt ttcttttttc 240  
 gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgcca gtccagcagg cataggggtg 300  
 tctcggcggc ggtcgctcga cgacgatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360  
 ggaaagctgg gcccttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctccccaa 420  
 tcatttcgac gcgccctttc ttcgccacc ctcgtggccg tgtttcgcg ccggccctta 480  
 tctcttccc gtgacgcgtt cttttgtagc ttagcggccg gcacgttgct aaccaggcta 540  
 gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600  
 ggctcttct gcaggcattt ggcatgtgaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagatggacg 660  
 gatgctgctc agatacgag tcaaacctgc cggcgaaatt acggggggag ctggctggct 720  
 ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780  
 ctctgcgcac gcaattcaac agaaggcggg aaacgacaat ctgatcatga gcggagaatt 840  
 aaggagtcg cgttatgacc cccgccgatg acgcgggaca agccgtttta cgtttggaac 900  
 tgacagaacc gcaacgctgc aggaattggc cgcagcggcc atttaaatac attgggcgcg 960  
 ccgaattcga gctcggtaga agcttgacac tgacaacaat tgtaagagga tggagaccac 1020  
 aacgatccaa caatacttct gcgacgggct gtgaagtata gagaagttaa acgccccaaa 1080

45

94893

46

gccattgtgt ttggaatddd tagttattct atttttcatg atgtatcttc ctctaactg 1140  
ccttaatttg caaatdtggt ataactactg attgaaaata tatgtatgta aaaaaatact 1200  
aagcatatdt ttgaagctaa acatgatggt atttaagaaa atatgttggt aacagaataa 1260  
gattaatatc gaaatggaaa catctgtaaa ttagaatcat cttacaagct aa 1312

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1570

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Zea mays*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(1570)

&lt;223&gt; послідовність 3'-кінця+вставки

&lt;400&gt; 4

ttgtggaaag gttctcagca gttacagctt aaaccgggtg aatcagcgtt tattgccgcc 60  
aacgaatcac cggtgactgt caaaggccac ggccgttttag cgcgtgttta caacaagctg 120  
taagagctta ctgaaaaaat taacatctct tgctaagctg ggagctcgat ccgtcgcacct 180  
gcagatcgtt caaacatdtg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccgggtctt 240  
gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa 300  
tgcctgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcatt atacatttaa 360  
tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcgggtgtca 420  
tctatgttac tagatctgct agccctgcag gaaatdtacc ggtgcccggt cggccagcat 480  
ggccgtatcc gcaatgtggt attaagaggt ggtggtacgg gtactttaac taacgaggtg 540  
tgtcgcgcag cgtctctgca cggatgtagc tttggattgc tggataatgt ctgcgcgaag 600  
cgtcgtatdt atttatdtat ttattacagc ctccaccgcc gtgcgtgctc cgtttcggat 660  
tataataaaa ctaatattda ataaaaaat cggattaaag gatgtttccg aaataaagat 720

```

ctccaccaca ggagcgaaag aaaaaaaaaag agaaacgggc tatggagaaa tgggtgttcg 780
agtatacggc ggctccgctg tcgtcggatc gacatgtaca aagtaggtgc acaaaaggca 840
aagcaaaatc acctcatcaa agaccaaaag cggagcaaag aatcgatact aaatccacat 900
gttttttttg ttctgtctta ctacgtgctg tgcctgtgcg tgaagcacga ttagtacgtg 960
tactcactct tgtcatattc tttttagtgt cttgtcacta gtcacatgga gtagcaacca 1020
tggctggcga taccgcgat aaataaaaaa aagagagagg gagtaatata ttagatactc 1080
accattata aattataaaa tattttagag tttgaatagg tagttcttgt atatttat 1140
atagaccttc aagtttgtcc gcctctcgag agccgaactt tgttgcccat gcttccccgg 1200
ctcaggctcat gccacctcct tcaccaaggg cacacggaag atctggtgaa gcttgtcatc 1260
accccgcgcc cttcaaacat gtgaggatgc gtcgtcgctg gcactagtag cactcattgt 1320
aggcactact ttgacagttt cctccaaata tgtagtgagg aaacacttga acaacacgtt 1380
tggttactat tatgatgttt ggttngtcca tcaatgataa ttccttcttc ttgcttaatg 1440
attggctcta gaaccgatac ttggcacatt tcatacaggaa gggcgcatgc acnaatttaa 1500
cctgttatcg atgttccggt tcctaagttg aagaaaacaa tggctaacaa ttagcccatg 1560
tgagcataac 1570

```

<210> 5

<211> 801

<212> ДНК

<213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(801)

<223> 5' -фланкуюча послідовність

<400> 5

```

ccccgcgttt cggtgcccct ggccggtacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60

```

```

ggccggccgc tcgtcgcct ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120

```



```

caccaccac cegtctttgc ccaaagcgac cgggcacagg ccgcgccggc ttcactaacc 180
actagcgctt gtactaataa aatggtttct agcgtttggt gctctccttt ttcttttttc 240
gccggttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgcca gtccagcagg cataggggtg 300
tctcggcggc ggtcgtccga cgacgatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360
ggaaagctgg gccctttctca ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac gcgccctttc ttgccaccc ctctgggccc tgtttcgagg ccggccctta 480
tctccttccc gtgacgcgtt cttttgtagc ttagcggccg gcacgttgct aaccaggcta 540
gcttcgttcg tttttaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggcctcttct gcaggcattt ggcatgtgaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagatggacg 660
gatgctgctc agatacgag tcaaacctgc cggcgaaatt acgggggggag ctggctggct 720
ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780
ctctgcgcac gcaattcaac a 801

```

<210> 6

<211> 1064

<212> ДНК

<213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1064)

<223> 3'-фланкуюча послідовність

<400> 6

```

agttgggtgt acgggtactt taactaacga ggtgtgtcgc gcagcgctcc tgcacggatg 60
tagctttgga ttgctggata atgtctcgcg caagcgtcgt atttatttat ttatttatta 120
cagcctccac cgccgtgcgt gtcctgtttc ggattataat aaaactaata ttaaataaaa 180
aaatcggatt aaaggatggt tccgaaataa agatctccac cacaggagcg aaagaaaaaa 240

```

aaagagaaac gggctatgga gaaatggtgt tgcgagtata cggcggctcc gtcgtcgtcg 300  
 gatcgacatg tacaagtag gtgcacaaaa ggcaaagcaa aatcacctca tcaaagacca 360  
 aaagcggagc aaagaatcga tactaaatcc acatgttttt tttgttcctg tctactacgt 420  
 gctgtgcctg tgcgtgaagc acgattagta cgtgtactca ctcttgtoat attcttttta 480  
 gtgtcttgtc actagtcaca tggagtagca accatggctg gcgatacccg cgataaataa 540  
 aaaaaagaga gagggagtaa tatattagat actcacccat tataaattat aaaatatttt 600  
 agagtttgaa taggtagtgc ttgtatatatt atttatagac cttcaagttt gtccgcctct 660  
 cgagagccga actttgttgc ccatgcttcc cgggtcagg tcatgccacc tccttcacca 720  
 agggcacacg gaagatctgg tgaagcttgt catcaccccg cgcccttcaa acatgtgagg 780  
 atgcgtcgtc gctggcacta gtagcactca ttgtaggcac tactttgaca gtttcctcca 840  
 aatatgtagt gaggaacac ttgaacaaca cgtttgggat tacttatgat gtttggttng 900  
 tccatcaatg ataattcctt cttcttgctt aatgattggc tctagaaccg atacttggca 960  
 catttcatca ggaagggcgc atgcacnaat ttaacctgtt atcgatgttc cggttcctaa 1020  
 gttgaagaaa acaatggcta acaattagcc catgtgagca taac 1064

<210> 7

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604(59)

<400> 7

cgctcgctt tggattcttc

20

<210> 8

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604 (60)

<400> 8

aagccgctga tgggatggt

19

<210> 9

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604 (54)

<400> 9

cgttcgtttt taatctgcct atcg

24

<210> 10

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604 (55)

<400> 10

aggcatttgg catgtgaagg aa

22

<210> 11

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604 (38)

<400> 11

atgtgaagga асссгаасса g

21

55	94893	56
<210> 12		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер MIR604 (39)		
<400> 12		
gtgaatggag atggacggat g		21
<210> 13		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер MIR604 (51)		
<400> 13		
cagatcacac atggatgacg c		21
<210> 14		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер 604 SEN		
<400> 14		
gtgacgcgtt cttttgtagc		20
<210> 15		
<211> 23		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер 5'S1		

<400> 15

tgaatggaga tggacggatg ctg

23

<210> 16

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MTL(11)

<400> 16

attagaatca tcttacaagc taa

23

<210> 17

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MTL(10)

<400> 17

стааgagatg ttcacgcttt gag

23

<210> 18

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MTL AS

<400> 18

gactcaacga aggctgctgc

20

<210> 19

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер WRSEN-1

<400> 19

gcacgtctctct gtgtcctcgt

20

<210> 20

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер WRAS-1

<400> 20

aggcacgcta tcggaggcta

20

<210> 21

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер WR-1

<400> 21

ggacatcgcc gagttctaca

20

<210> 22

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер WR-2

<400> 22

gatgtgcttc ctgatgcagg

20

<210> 23

61	94893	62
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер WRSEN-2		
<400> 23		
сааgсаааtа аgасgасttg		20
<210> 24		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер WRAS-2		
<400> 24		
аgсассасса аggасgtgat		20
<210> 25		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер WRSEN-3		
<400> 25		
tасаасagct tсаасctggc		20
<210> 26		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер WRAS-3		
<400> 26		
ссgtгааста gatctgagct		20

63

94893

64

<210> 27  
<211> 22  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Праймер 5161S

<400> 27  
tcaaccaata ctacttcgac aa

22

<210> 28  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер 5'AS1

<400> 28  
асаагаассат саасааgggc gac

23

<210> 29  
<211> 22  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер WRSEN-4

<400> 29  
atcggcggttc cgggccatgg tt

22

<210> 30  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер WRAS-4



65

94893

66

&lt;400&gt; 30

ggaatcctgg gatggctcta

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер РМІ-1

&lt;400&gt; 31

gatgtgcttc ctgatgcagg

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер РМІ-2

&lt;400&gt; 32

ctggaagtga tggсааас

18

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер РМІ (6)

&lt;400&gt; 33

cgctgcatga ccttagtgat a

21

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер PMI(7)

<400> 34

cggggtgaatc agcgtttatt g

21

<210> 35

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер PMI(5)

<400> 35

ttgccgcсаа сgaatcac

18

<210> 36

<211> 23

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер PMI(16)

<400> 36

agtccccсаа ttatacattt aat

23

<210> 37

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер WRSEN-5

<400> 37

gaaaatgccg caggtatccc

20

<210> 38  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер WRAS-5

<400> 38  
caggtgcaca tccggcgatt 20

<210> 39  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер MIR604 (20)

<400> 39  
gctcctgcac ggatgtagct 20

<210> 40  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер MIR604 (21)

<400> 40  
gctttggatt gctggataat gtc 23

<210> 41  
<211> 23  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Праймер MIR604 (31)

<400> 41

ссассасagg агсгааагаа ааа

23

<210> 42

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604(30)

<400> 42

gggctatgga gaaatggtgt tg

22

<210> 43

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604(40)

<400> 43

cttcaccaag ggcacacgg

19

<210> 44

<211> 19

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Праймер MIR604(41)

<400> 44

atgtgaggat gcgtcgtcg

19

<210> 45

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

73

94893

74

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер 9268AS

&lt;400&gt; 45

cacggatgta gctttggatt

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Праймер WRAS-6

&lt;400&gt; 46

tссассасag gacсgаааgа

20

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; «Прямий» праймер TaqMan cry3A055

&lt;400&gt; 47

atсgаgаgсt gggтgаасtт са

22

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; «Зворотний» праймер TaqMan cry3A055

&lt;400&gt; 48

сgаtсaggтс саgсасgg

18

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> TaqMan cr3A055-зонд

<400> 49

ccgctaccgc cgcgagatga

20

<210> 50

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> «Прямий» праймер TaqMan pmi

<400> 50

ccgggtgaat cagcgttt

18

<210> 51

<211> 18

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> «Зворотний» праймер TaqMan pmi

<400> 51

gccgtggcct ttgacagt

18

<210> 52

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> TaqMan pmi-зонд

<400> 52

tgccgccaac gaatcaccgg

20

<210> 53

<211> 21

77	94893	78
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZmADH-267		
<400> 53		
gaacgtgtgt tgggtttgca t		21
<210> 54		
<211> 20		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Праймер ZmADH-337		
<400> 54		
tccagcaatc cttgcacctt		20
<210> 55		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд ZmADH-316		
<400> 55		
tgcagcctaa ccatgcgcag ggta		24
<210> 56		
<211> 779		
<212> ДНК		
<213> Штучна послідовність		
<220>		
<223> Зонд MIR604		
<400> 56		
ggacatcgcc gagtctaca agcgccagct gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg		60
cgtgaagtgg tacaacgtgg gtctagacaa gctccgcggc agcagctacg agagctgggt		120

gaacttcaac cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgccctgtt 180  
 cccctgttac gacgtgcgcc tgtaccccaa ggaggtgaag accgagctga cccgcgacgt 240  
 gctgaccgac cccatcgtag gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa 300  
 catcgagaac tacatccgca agccccacct gttcgactac ctgcaccgca tccagttcca 360  
 cacgcgtttc cagcccggt actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta 420  
 cgtgagcacc cgccccagca tcggcagcaa cgacatcatc accagcccct tctacggcaa 480  
 caagagcagc gagcccgtag agaacctga gttcaacggc gagaagggtg accgcgcgt 540  
 ggctaacacc aacctggcgc tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaagggtga 600  
 gttcagccag tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg 660  
 caacgtgggc gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga 720  
 gccctggag aagggtaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcagg 779

<210> 57

<211> 183

<212> ДНК

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(183)

<223> Права погранична ділянка

<400> 57

gaaggcggga aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgaccc 60  
 ccgccgatga cgcgggacaa gccgttttac gtttggaact gacagaaccg caacgctgca 120  
 ggaattggcc gcagcggcca tttaaatcaa ttgggcgcgc cgaattcgag ctcggtacaa 180  
 gct 183

<210> 58



<211> 2556

<212> ДНК

<213> *Zea mays*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2556)

<223> Промотор MTL

<400> 58

tgacatgac aacaattgta agaggatgga gaccacaacg atccaacaat acttctgcga	60
cgggctgtga agtatagaga agttaaacgc ccaaaagcca ttgtgtttgg aatttttagt	120
tattctatctt ttcattgatgt atcttctctt aacatgcctt aatttgcaaa ttgggtataa	180
ctactgattg aaaatatatg tatgtaaaaa aatactaagc atatttttga agctaaacat	240
gatgttatctt aagaaaatat gttgttaaca gaataagatt aatatcgaaa tggaaacatc	300
tgtaaatag aatcatctta caagctaaga gatgttcacg ctttgagaaa cttcttcaga	360
tcatgaccgt agaagtagct ctccaagact caacgaaggc tgctgcaatt ccacaaatgc	420
atgacatgca tccttgtaac cgtcgtcgcc gctataaaca cggataactc aattccctgc	480
tccatcaatt tagaaatgag caagcaagca cccgatcgct caccocatat gcaccaatct	540
gactcccaag ctctgtttcg cattagtacc gccagcactc cacctatagc taccaattga	600
gacctttcca gcctaagcag atcgattgat cgttagagtc aaagagttgg tggtaacggg	660
actttaacta ccatggaatg atggggcgtg atgtagagcg gaaagcgcct ccctacgcgg	720
aacaacaccc tcgccatgcc gctcgactac agcctcctcc tcgtcggcgc cacaacgagg	780
gagcccggtg tcgcagccac cgaccagcat gtctctgtgt cctcgtccga cctcgacatg	840
tcatggcaaa cagtcggacg ccagcaccag actgacgaca tgagtctctg aagagccgcg	900
cacctagaaa gatccgagcc ctgctgctgg tagtggtaac cattttcgtc gcgctgacgc	960
ggagagcgag aggccagaaa tttatagcga ctgacgctgt ggcaggcacg ctatcgagg	1020
ttacgacgtg gcgggtcact cgacgcggag ttcacaggtc ctatccttgc atcgctcggc	1080

gcggagttta cggggactta tccttacgac gtgctctaag gttgcgataa cgggcggagg 1140  
 aaggcgtgtg gcgtgcggag acggtttata cacgtagtgt gcgggagtgt gtttcgtaga 1200  
 cgcgggaaaag cacgacgact tacgaagggt agtggaggag gaggacacac taaaatcagg 1260  
 acgcaagaaa ctcttctatt atagtagtag agaagagatt ataggagtgt gggttgattc 1320  
 taaagaaaat cgacgcagga caaccgtcaa aacgggtgct ttaatatagt agatatatat 1380  
 atatagagag agagagaaaag tacaaaggat gcatttgtgt ctgcatatga tcggagtatt 1440  
 actaacggcc gtcgtaagaa ggtccatcat gcgtggagcg agcccatctg gttggttgtc 1500  
 aggccgcagt taaggcctcc atatatgatt gtcgtcgggc ccataacagc atctcctcca 1560  
 ccagtttatt gtaagaataa attaataga gatatttgtc gtcgggcaga agaaacttgg 1620  
 acaagaagaa gaagcaagct aggccaatct cttgccggca agaggaagat agtggcctct 1680  
 agtttatata tcggcgtgat gatgatgctc ctagctagaa atgagagaag aaaaacggac 1740  
 gcgtgtttgg tgtgtgtcaa tggcgtccat ccttccatca gatcagaacg atgaaaaagt 1800  
 caagcacggc atgcatagta tatgtatagc ttgttttagt gtggctttgc tgagacgaat 1860  
 gaaagcaacg gcgggcatat ttttcagtgg ctgtagcttt caggctgaaa gagacgtggc 1920  
 atgcaataat tcagggaatt cgtcagccaa ttgaggtagc tagtcaactt gtacattggt 1980  
 gcgagcaatt ttccgcactc aggagggcta gtttgagagt ccaaaaacta taggagatta 2040  
 aagaggctaa aatcctctcc ttatttaatt ttaaataagt agtgtatttg tattttaact 2100  
 cctccaaccc ttccgatttt atggctctca aactagcatt cagtctaag catgcatgct 2160  
 tggctagagg tcgtatgggg ttgttaatag catagctagc tacaagttaa ccgggtcttt 2220  
 tatatttaat aaggacaggc aaagtattac ttacaaataa agaataaagc taggacgaac 2280  
 tgctggatta ttactaaatc gaaatggacg taatattcca ggcaagaata attgttcgat 2340  
 caggagacaa gtggggcatt ggaccggttc ttgcaagcaa gagcctatgg cgtggtgaca 2400  
 cggcgcgttg ccatacatc atgcctccat cgatgatcca tctcacttg ctataaaaag 2460

85

94893

86

agggtgcat ggtgctcaag ctcagccaag caaataagac gacttgtttc attgattctt 2520  
caagagatcg agcttctttt gcaccacaag gtcgag 2556

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 1797

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Ген cry3A055

&lt;400&gt; 59

atgacggccg acaacaacac cgaggccctg gacagcagca ccaccaagga cgtgatccag 60  
aagggcacatca gcgtgggtggg cgacctgctg ggcgtgggtg gcttccccctt cggcggcgcc 120  
ctggtgagct tctacaccaa cttcctgaac accatctggc ccagcgagga cccctggaag 180  
gccttcatgg agcagggtgga ggcctgatg gaccagaaga tcgccgacta cgccaagaac 240  
aaggcactgg ccgagctaca gggcctccag aacaacgtgg aggactatgt gagcgccctg 300  
agcagctggc agaagaaccc cgctgcaccg ttccgcaacc cccacagcca gggccgcac 360  
cgcgagctgt tcagccaggc cgagagccac ttccgcaaca gcatgccag cttcgccac 420  
agcggctacg aggtgctgtt cctgaccacc tacgccagg ccgccaacac ccacctgttc 480  
ctgctgaagg acgccccaat ctacggagag gagggtggct acgagaagga ggacatcgcc 540  
gagttctaca agcgccagct gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg cgtgaagtgg 600  
tacaacgtgg gtctagacaa gctccgcggc agcagctacg agagctgggt gaacttcaac 660  
cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tcgccctgtt cccctgtac 720  
gacgtgcgcc tgtaccccaa ggagggtgaag accgagctga cccgcgacgt gctgaccgac 780  
cccatcgtgg gcgtgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa catcgagaac 840  
tacatccgca agccccacct gtgcgactac ctgcaccgca tccagttcca cagcggttc 900  
cagcccggt actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta cgtgagcacc 960

87

94893

88

cgccccagca tcggcagcaa cgacatcatc accagcccct tctacggcaa caagagcagc 1020

gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaagggtg accgcgccgt ggctaacacc 1080

aacctggccg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaagggtga gttcagccag 1140

tacaacgacc agaccgacga ggccagcacc cagacctacg acagcaagcg caacgtgggc 1200

gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga gcccctggag 1260

aagggtaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcaggg cagccgcggc 1320

accatccccg tgctgacctg gaccacaag agcgtcgact tcttcaacat gatcgacagc 1380

aagaagatca ccagctgcc cctggtgaag gcctacaagc tccagagcgg cgccagcgtg 1440

gtggcaggcc cccgcttcac cggcggcgac atcatccagt gcaccgagaa cggcagcgcc 1500

gccaccatct acgtgacccc cgacgtgagc tacagccaga agtaccgcgc ccgcatccac 1560

tacgccagca ccagccagat caccttcacc ctgagcctgg acggggcccc cttcaaccaa 1620

tactacttcg acaagacat caacaagggc gacaccctga cctacaacag cttcaacctg 1680

gccagettca gcaccccttt cgagctgagc ggcaacaacc tccagatcgg cgtgaccggc 1740

ctgagcgccg gcgacaaggt gtacatcgac aagatcgagt tcatccccgt gaactag 1797

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 253

&lt;212&gt; ДНК

<213> *Agrobacterium tumifaciens*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(253)

&lt;223&gt; Терминатор NOS

&lt;400&gt; 60

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60

atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120

atgacgttat ttatgagatg gggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180  
 gcgatatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240  
 atgttactag atc 253

<210> 61  
 <211> 1993  
 <212> ДНК  
 <213> *Zea mays*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1993)  
 <223> Промотор ZmUbInt  
 <400> 61  
 ctgcagtgcg gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60  
 agttataaaa aattaccaca tattttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120  
 tctttatata tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180  
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atggtctaaa ggacaattga 240  
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtgt tctccttttt 300  
 ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360  
 gtttaggggtt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420  
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480  
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaacaaat accctttaag aaattaaaaa 540  
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 600  
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcggggcaa gcgaagcaga 660  
 cggcacggca tctctgtcgc tgctcttgga cccctctega gagttccgct ccaccgttgg 720  
 acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780  
 ggcaggcggc ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 840

gctccttcgc tttcccttcc tcgcccgcgc taataaatag acaccccctc cacaccctct 900  
 ttccccaacc tcgtgttggt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca 960  
 cccgtcggca cctccgcttc aaggtagcgc gctcgtctc ccccccccc cctctctacc 1020  
 ttctctagat cggcggtccg gtccatgggt agggcccggt agttctactt ctgttcatgt 1080  
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac 1140  
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctcttttg ggaatcctgg 1200  
 gatggctcta gccgttccgc agacgggac gatttcatga ttttttttgt ttcgttgcac 1260  
 agggtttggt ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 1320  
 atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctgggttg gcggtcgttc 1380  
 tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 1440  
 tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct 1500  
 aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gcttttttgt 1560  
 cgcttggttg tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 1620  
 gaatactggt tcaaactacc tgggtgtatt attaatattg gaactgtatg tgtgtgtcat 1680  
 acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat 1740  
 gttgatgtgg gttttactga tgcataatac tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800  
 tctaaccttg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 1860  
 tgatatactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920  
 catacgctat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgetcacccct gttggttggt 1980  
 gttacttctg cag 1993

<210> 62

<211> 1176

<212> ДНК

<213> *E.coli*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(1176)

&lt;223&gt; Ген pmi

&lt;400&gt; 62

```

atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact      60

gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca      120

catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat      180

gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaaac ctttggcgaa      240

ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca      300

aacaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat      360

gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg      420

cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg      480

gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta      540

agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg cagggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg      600

attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt      660

tctgaatfff acccggaaga cagcgggtctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa      720

ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc      780

gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa      840

tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag      900

ttgttgaccc agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat      960

tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc     1020

gccatfttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag     1080

cttaaacccg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc     1140

cacggccggt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa                                1176

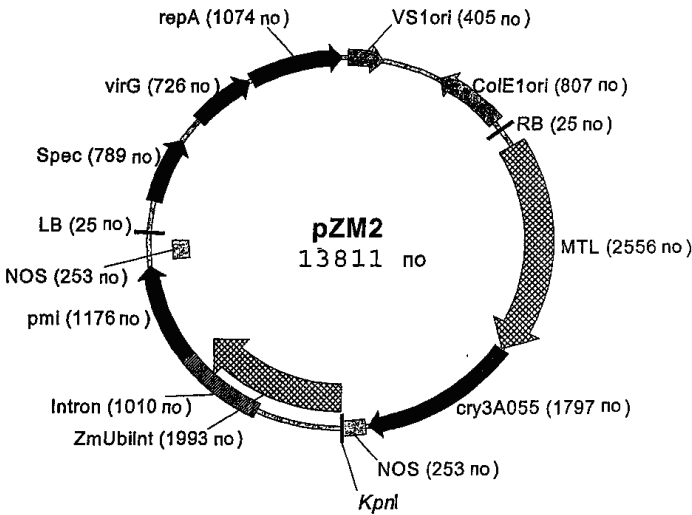
```

<210> 63  
<211> 323  
<212> ДНК  
<213> *Agrobacterium tumifaciens*

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(323)  
<223> Ліва погранична ділянка  
<400> 63

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg	60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc	120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac	180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct	240
atgttactag atctgctagc cctgcaggaa atttaccggt gcccgggcgg ccagcatggc	300
cgtatccgca atgtgttatt aag	323

Варіант кукурудзи MIR604



Варіант кукурудзи MIR604

