



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121189** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)
A01H 5/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 00939	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(22) Дата подання заявки:	29.06.2012	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007/047016 A2, 26.04.2007 US 2002/062499 A1, 23.05.2002 WO 99/46396 A2, 16.09.1999 WO 2009/085982 A1, 09.07.2009 US 2011/150832 A1, 23.06.2011 US 2007/209085 A1, 06.09.2007 US 2001/023501 A1, 20.09.2001 WO 2010/099084 A2, 02.09.2010 US 6646186 B1, 11.11.2003 US 2011/126310 A1, 26.05.2011 "PUGBJ25TD ZM_0.6_1.0_KB Zea mays genomic clone ZMMBTa329F02, DNA sequence.", EMBL, 19.03.2003, Database accession no. BZ797057, URL: EBI, XP002735753 Nobuta Kan et al, "Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the mop1-1 mutant", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 01.09.2008, vol. 105, no. 39, P. 14958 - 14963 Stacey A Simon et al, "Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants", Current Opinion In Plant Biology, vol. 14, no. 2, 13.12.2010, P. 148 - 155 Johnson Cameron et al, "CSRDB: a small RNA integrated database and browser resource for cereals", Nucleic Acids Research, 01.01.2007, vol. 35, no. Sp. Iss. SI, P. D829 - D833 Wang et al., "Development and validation of vectors containing multiple siRNA expression cassettes for maximizing the efficiency of gene silencing.", BMC Biotechnology, 22.12.2006, vol. 6, no. 50, P. 1 - 7
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.04.2020		
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/504,102		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	01.07.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2014, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.04.2020, Бюл.№ 8		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/045040, 29.06.2012		
(72) Винахідник(и): Хуан Цзиньтай (US), Івашута Сергій (US), Ци Юлінь (US), Уїггінз Барбара Е. (US), Чжан Юаньцзин (US)			
(73) Власник(и): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America (US)			

(54) КОНСТРУКЦІЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ ДНК, ЯКА ІНДУКУЄ ЧОЛОВІЧУ СТЕРИЛЬНІСТЬ В ТРАНСГЕННІЙ РОСЛИНІ, ТА СПОСІБ ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

UA 121189 C2

Винахід стосується конструкції рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок CP4-EPSPS послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає специфічний для чоловічої тканини елемент мі-РНК (чтс-міРНК), де вказаний елемент чтс-міРНК є гетерологічним відносно вказаної кодуючої білок CP4-EPSPS послідовності, де експресія білка CP4-EPSPS, що кодується CP4-EPSPS кодуючою послідовністю, пригнічена в чоловічих репродуктивних тканинах трансгенної рослини, яка експресує вказану конструкцію рекомбінантної ДНК. Винахід також стосується способу одержання конструкції рекомбінантної ДНК, трансгенної рослини кукурудзи, яка має у своєму геномі конструкцію рекомбінантної ДНК, насіння, потомства або частини трансгенної рослини кукурудзи, способу вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини кукурудзи, способу одержання гібридного насіння та гібридного насіння.

Дана заявка заявляє про пріоритет тимчасової заявки на патент США 61/504102, поданої 1 липня 2011 р., яка включена сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання.

Включення переліку послідовностей

Перелік послідовностей міститься у файлі з назвою "MONS294WO.txt" розміром 41 кілобайт (згідно з оцінкою Microsoft Windows®), який був створений 29 червня 2012 р., представлений в електронному вигляді й включений сюди за допомогою посилання.

Галузь техніки

Винахід у цілому стосується галузі сільського господарства, рослинництва й молекулярної біології. Зокрема, винахід стосується способів і композицій для вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в репродуктивній тканині чоловічих особин трансгенних рослин і їх застосування.

Рівень техніки

Гібридне насіння, тобто насіння, одержане способом гібридизації або перехресного запилення близькоспоріднених рослин, може бути вирощене в потомстві гібридні рослини, які мають необхідну комбінацію ознак, відсутніх у будь-якої з батьківських рослин. Гібридні рослини можуть демонструвати кращі агрономічні характеристики, включаючи покращення розміру рослин, урожайності, поживну композицію, стійкість до захворювань, толерантність до гербіцидів, толерантність до стресу, кліматичну адаптацію й інші бажані ознаки. Ефективне одержання гібридного насіння потребує відсутності самозапилення рослини власним пилом.

При одержанні гібридного насіння у жіночої особини батьківської рослини можна запобігти утворенню пилку і/або скидання пилку для полегшення перехресного запилення жіночої особини, а не для самозапилення. Таке запобігання може бути досягнуте, наприклад, видаленням вручну структур, що містять пилок (наприклад, видалення суцвіття волоті кукурудзи ручним або механічним способом), використанням генетичних способів контролю запилення (наприклад, цитоплазматична стерильність чоловічих особин, ядерна чоловіча стерильність) і/або використанням хімічного препарату.

Суть винаходу

Винахід стосується в цілому способів вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенних рослин, конструкцій рекомбінантної ДНК, придатних для таких способів, а також трансгенних рослин, клітин і насіння, що містять такі конструкції рекомбінантної ДНК. Конструкції рекомбінантної ДНК і трансгенні рослини, клітини й насіння, що містять такі конструкції, забезпечують значно покращений спосіб використання гербіцидів для індукції чоловічої стерильності у трансгенних рослин для одержання гібридного насіння.

В одному аспекті винахід надає конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодує білок послідовність, яка кодує рекомбінантний білок і специфічний для чоловічої тканини елемент міРНК (чтс-міРНК), функціонально зв'язаний з кодує білок послідовністю. В одному варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включений в 3'-нетрансльовану ділянку кодує білок послідовності. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК розташований між кодує білок послідовністю і послідовністю поліаденілування, яка є частиною 3'-нетрансльованої ділянки. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104. В іншому варіанті втілення винаходу експресія рекомбінантного білка в трансгенній рослині надає рослині щонайменше вегетативну толерантність до гербіциду. В іншому варіанті втілення винаходу рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS.

Інший аспект винаходу надає спосіб одержання конструкції рекомбінантної ДНК, включаючи ідентифікацію елемента чтс-міРНК, включаючи щонайменше одну послідовність чтс-міРНК і функціонально зв'язаний елемент чтс-міРНК із кодує білок послідовністю, наприклад, послідовністю ДНК, що кодує рекомбінантний білок. В одному варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149, або щонайменше один елемент чтс-міРНК, вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК є специфічним для волоті.

У додатковому аспекті винахід надає трансгенну рослину, включаючи конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом, а також насіння, клітину або частину трансгенної рослини. В одному варіанті втілення винаходу рослина є однодольною рослиною. В іншому варіанті втілення винаходу рослина є рослиною кукурудзи (*Zea mays*).

У додатковому аспекті винахід також надає спосіб вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини шляхом експресії в трансгенній рослині конструкції рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, включаючи елемент чтс-міРНК. В одному варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК. В іншому варіанті втілення винаходу чоловіча репродуктивна тканина є волоттю рослини кукурудзи. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149. В іншому варіанті втілення винаходу елемент чтс-міРНК є щонайменше одним елементом, 5 вибраним із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104. В іншому варіанті втілення винаходу експресія рекомбінантного білка в трансгенній рослині надає рослині щонайменше вегетативну толерантність до гербіциду. В іншому варіанті втілення винаходу рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS.

Винахід також надає спосіб індукції чоловічої стерильності трансгенної рослини, включаючи етап застосування гербіциду до трансгенної рослини, що має у своєму геномі конструкцію 15 рекомбінантної ДНК, що включає кодуючу білок послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, включаючи елемент чтс-міРНК, який надає трансгенній рослині щонайменше вегетативну толерантність до гербіциду, при цьому гербіцид застосовують під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини трансгенної рослини, тим самим індукуючи чоловічу 20 стерильність у трансгенній рослині. В одному варіанті втілення винаходу трансгенна рослина є рослиною кукурудзи. В іншому варіанті втілення винаходу застосування гербіциду запобігає щонайменше осипанню пилку або випинанню пиляків в обробленій трансгенній рослині. В іншому варіанті втілення винаходу стадію розвитку чоловічої репродуктивної тканини, під час якої використовують гербіцид, вибирають із групи, яка складається зі стадії розвитку рослини кукурудзи V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 і V14. В іншому варіанті втілення винаходу 25 гербіцид вибраний із групи, яка складається з інгібіторів ацетил коензим А карбоксилази (ACCCase), інгібіторів ацетолактатсинтази (ALS), інгібіторів фотосистеми II (PSII), інгібіторів протопорфіриногеноксидази (PPO), інгібіторів 4-гідроксифенілдіоксигенази (HPPD), інгібіторів 5-еноліпірувілшкімат 3-фосфатсинтази (EPSPS), інгібіторів глутамінсинтетази (GS) і синтетичних ауксинів. В іншому варіанті втілення винаходу гербіцид є гліфосатом, а рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS.

Винахід також надає спосіб одержання гібридного насіння, включаючи застосування ефективною кількості гербіциду до трансгенної рослини, що включає у своєму геномі конструкцію 35 рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, включаючи елемент чтс-міРНК, при цьому гербіцид застосовують під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини трансгенної рослини, тим самим індукуючи чоловічу стерильність у трансгенної рослини; запилення трансгенної рослини пилком від другої рослини; і збирання гібридного насіння від трансгенної рослини. В одному варіанті втілення винаходу трансгенна рослина є кукурудзою. Ефективна кількість гербіциду є дозою гербіциду, достатньою 40 для надання трансгенній рослині, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом, чоловічої стерильності (ефективна доза). В іншому варіанті втілення винаходу гербіцид є гліфосатом, а рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS. В іншому варіанті втілення винаходу гліфосат застосовують під час розвитку в ефективній дозі від приблизно 0,125 фунтів кислоти в еквіваленті на акр до приблизно 8 фунтів кислоти в еквіваленті на акр. Інші специфічні варіанти втілення винаходу описані в представленому нижче докладному описі. У тексті даної заявки й формулі винаходу, якщо в контексті не вказане інше, слово "включає" і його варіації, такі як "містить" і "той, що містить", будуть розуміти як такий, що 45 припускає включення вказаного цілого числа, елемента або етапу, або групи цілих чисел, елементів або етапів, але не виключення будь-якого іншого цілого числа, елемента або етапу, або групи цілих чисел, елементів або етапів.

Короткий опис креслень

Фігура 1 відображає мапування послідовностей чтс-міРНК на елементі чтс-міРНК (SEQ ID NO: 85), як це описано в Прикладі 1. Вісь X зліва направо представляє орієнтацію елемента чтс-міРНК, при цьому верхня спіраль представлена у верхній половині діаграми, а нижня спіраль 55 представлена в нижній половині діаграми; нуклеотидна позиція в напрямку від 5' до 3' показана зліва направо вгорі й справа наліво вниз. Послідовності чтс-міРНК показані у відповідних позиціях вирівнювання. Вісь Y представляє відносну численність чтс-міРНК, що експресується у тканині волоті у вигляді транскриптів на чверть мільйона послідовностей (trp). чтс-міРНК, представлені в бібліотеці частіше, обведені кільцем.

Фігура 2 відображає нозерн-блот аналіз для вимірювання експресії мРНК, специфічної для волоті, як це описано в Прикладі 2.

Фігура 3 відображає мапування послідовностей чтс-міРНК на елементі чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87), як це описано в Прикладах 2 і 8. Вісь X зліва направо представляє орієнтацію елемента чтс-міРНК, при цьому верхня спіраль представлена у верхній половині діаграми, а нижня спіраль представлена в нижній половині діаграми; нуклеотидна позиція в напрямку від 5' до 3' показана зліва направо вгорі й справа наліво вниз. Послідовності чтс-міРНК показані в їх відповідних позиціях вирівнювання. Вказані три послідовності чтс-міРНК, використовувані для одержання трьох специфічних зондів (sR648011 (SEQ ID NO: 8), sR1372590 (SEQ ID NO: 26) і sR410590 (SEQ ID NO: 33)).

Фігура 4 відображає нозерн-блот аналіз тимчасової експресії елемента чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87) у зрілій волоті з використанням РНК від різної інбредної зародкової плазми, як це описано в Прикладі 2.

Фігура 5 відображає локалізацію експресії міРНК *in situ* у зрілому пиляку з використанням антисмислових (ліворуч) або смислових (праворуч) зондів для послідовності чтс-міРНК (sR648011, SEQ ID NO: 8), як це описано в Прикладі 2.

Фігура 6 відображає локалізацію білка CP4-EPSPS у пиляках від необроблених розпиленням рослин, трансгенних відносно конструкції 3 (Фігура 6A) або конструкції 4 (Фігура 6B), як це описано в Прикладі 4. Рослини кукурудзи, трансгенні на конструкцію 3, містять касету експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК. Рослини з конструкцією 4 є контролем.

Фігура 7 відображає трансгенні рослини кукурудзи, одержані з конструкцій, що містять касету експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК, які були вегетативно толерантні до гліфосату й мали індуковану чоловічу стерильність із пізнім застосуванням гліфосату, як це описано в Прикладі 7. Фігура 7A відображає трансгенні рослини кукурудзи з обробкою гліфосатом і без неї. Фігура 7B відображає волоті від необроблених трансгенних рослин, і Фігура 7C відображає пилкові зерна необроблених трансгенних рослин. Фігура 7D відображає волоті від оброблених трансгенних рослин, і Фігура 7E відображає пилкові зерна оброблених трансгенних рослин.

Фігура 8 відображає дані для одного року польових досліджень, що вимірюють показник чоловічої фертильності (ПЧФ) після пізньої обробки гліфосатом. Фігура 8A відображає середнє значення ПЧФ, одержане від трьох різних режимів обробки гліфосатом (Trt 1, Trt 2 і Trt 3) для NK603 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза), MON 87427 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза з індукованою гліфосатом чоловічою стерильністю) і двох явищ, пов'язаних з конструкцією 3, як це описано в Прикладі 5; пунктирна лінія вказує на промисловий стандарт для чоловічої стерильності, ПЧФ 2. Фігура 8B відображає волоть рослини, у якої оброблене розпиленням тільки насіння. Фігура 8C відображає волоть рослини, обробленої розпиленням гліфосатом на пізній стадії для індукції чоловічої стерильності.

Фігура 9 відображає результати польового дослідження, що вимірюють кількість рослин на ділянці, при цьому чоловіча стерильність виміряна за випинанням пиляка через S90, за S90+3 і S90+6, у двох різних режимах обробки гліфосатом способом розпилення (Trt 2 і Trt 3) для NK603 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза), MON 87427 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза з індукованою гліфосатом чоловічою стерильністю) і чотирьох явищ, пов'язаних з конструкцією 3, як це описано в Прикладі 5.

Фігура 10 відображає результати досліджень життєздатності пилку, як це описано в Прикладі 5. Фігури 10A і 10B відображають приклад пізнього випинання пиляків у волоті в явищі розпилення за наявності стерильності й конструкції 3. Квадрат на Фігурі 10A є ділянкою, збільшеною на Фігурі 10B. Приклад пізнього випинання пиляка обмежений кільцем на Фігурі 10B. Забарвлення пилку зі стерильного пиляка з пізнім випинанням у явищах розпилення конструкції 3 згідно з Alexander виявило тільки нежиттєздатний пилкок (напівпрозорий блакитний колір, неправильна форма пилкових зерен) (Фігура 10C). Пилкок від пиляків, необроблених конструкцією 3, був повністю життєздатний й під час забарвлення згідно з Alexander був непрозорим, темно-фіолетовим і сферичним (Фігура 10D).

Фігура 11 відображає результати польового дослідження, яке вивчало рослини NK603 і явища конструкції 3 для одержання інбредних зерен і чоловічої фертильності, як це описано в Прикладі 6. Врожай інбредних зерен був виміряний у значеннях бушелі/акр, а індукована чоловіча стерильність була виміряна як показник чоловічої фертильності (ПЧФ). Горизонтальні вусики вказують промисловий стандарт для чоловічої стерильності, ПЧФ 2. Trt 1, Trt 2 і Trt 3 означають режими обробки 1, 2 і 3.

Фігура 12 відображає результати польового дослідження, яке вивчало нетрансгенні жіночі інбредні рослини (Null), лінію MON87427, і три явища конструкції 3, всі з однаковою генетичною основою, які були перехресно запилені чоловічим тестером MON810/MON88017 для одержання

гібридного насіння F1. Врожай гібридних зерен був виміряний у значеннях бушелі/акр. Trt 1, Trt 2 і Trt 3 означають режими обробки 1, 2 і 3.

Фігура 13 відображає аналіз пилкових зерен з гібридних рослин F1, як це описано в Прикладі 7. Панелі відображають результати забарвлення згідно Alexander пилку, одержаного в результаті трьох різних гібридних схрещувань F1: нетрансгенна жіноча особина x MON88017 чоловіча особина; MON87427 жіноча особина x MON88017 чоловіча особина; і явище конструкції 3 жіноча особина x MON88017 чоловіча особина. Фертильність волоті була функціонально відновлена в гібридах F1, одержаних від рослин з явищем конструкції 3 з використанням пилку MON88017.

Фігура 14 відображає схематичні креслення варіантів втілення конструкцій рекомбінантної ДНК (представлено в напрямку від 5' до 3' зліва направо), включаючи (вгорі) послідовність, що кодує білок (наприклад, ДНК, що кодує стійкий до гліфосату EPSPS), функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає елемент чтс-міРНК (наприклад, одну або більше, вибраних із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104) (вгорі). У необмежуючому специфічному варіанті втілення винаходу (унизу) конструкція рекомбінантної ДНК включає промотор, функціонально зв'язаний, по порядку, з інтроном, транзитним пептидом, CP4-EPSPS, що кодується SEQ ID NO: 95, елементом чтс-міРНК (SEQ ID NO: 81) і 3'UTR.

Докладний опис винаходу

Конструкції рекомбінантної ДНК

Винахід надає композиції й способи для вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в репродуктивній тканині чоловічих особин трансгенних рослин і їх застосування. В одному аспекті винахід надає конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодує білок послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, включаючи елемент чтс-міРНК, тобто химерний трансген, що включає кодує білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, і щонайменше один елемент чтс-міРНК, функціонально зв'язаний з кодує білок послідовністю. В одному варіанті втілення винаходу такі конструкції рекомбінантної ДНК є придатними для вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини. В одному аспекті винахід надає рекомбінантну молекулу ДНК, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК, і способи її застосування. Послідовності нуклеїнових кислот можуть бути представлені як ДНК або РНК, залежно від того, що вказане; опис однієї обов'язково визначає іншу, що відомо фахівцю в даній галузі техніки. Крім того, опис даної послідовності нуклеїнової кислоти обов'язково визначає точний комплемент такої послідовності, що відомо фахівцю в даній галузі техніки.

"Чоловіча тканиноспецифічна міРНК" або "чтс-міРНК" є малою РНК (мРНК), що складається з від приблизно 18 до приблизно 26 нуклеотидів (наприклад, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 або 26 нуклеотидів), збагаченою або такою, що специфічно експресується у чоловічій репродуктивній тканині(ах) (наприклад, чоловічому суцвітті) рослини, тобто, такою, що має чоловічу тканиноспецифічну схему експресії. Чоловіча тканиноспецифічна міРНК зустрічається у рослин природно і може бути визначена з використанням відомих у даній галузі техніки способів, таких як низькомолекулярний нозерн-аналіз. Послідовність ДНК, що є комплементарною чтс-міРНК, позначається тут як "послідовність чтс-міРНК". Приклади послідовностей чтс-міРНК для чтс-міРНК ендогенної рослини представлені як SEQ ID NO: 1-56 і 105-149. У варіанті втілення винаходу послідовність чтс-міРНК є точним комплементом ДНК (без невідповідностей) для заданої чтс-міРНК. В інших варіантах втілення винаходу послідовність чтс-міРНК варіює в межах 1-3 нуклеотидних невідповідностей у порівнянні із заданою чтс-міРНК, але при цьому має достатню комплементарність для зв'язування або гібридизації, наприклад, у звичайних фізіологічних умовах, з такою чтс-міРНК. "Комплементарність" означає здатність нуклеотидів в одному полінуклеотидному ланцюзі утворювати пари з нуклеотидами іншого полінуклеотидного ланцюга відповідно до стандартних правил комплементарності Уотсона-Крика (тобто пари гуаніну із цитозином (Г:Ц) і пари аденіну з тиміном (А:Т) або урацилом (А:У); можлива внутрішньоланцюгова гібридизація між двома або більше комплементарними ділянками окремого полінуклеотиду. При включенні в конструкцію рекомбінантної ДНК, як це описане тут, чтс-міРНК здатна здійснювати міРНК-опосередковану супресію або порушення експресії гена і/або білка.

Щонайменше один, щонайменше два, щонайменше три або більше трьох послідовностей чтс-міРНК можуть бути з'єднані в кластер або навіть перекриватися в одній молекулі ДНК. Така молекула ДНК позначається тут як "чоловічий тканиноспецифічний елемент міРНК" або "елемент чтс-міРНК" і визначається як такий, що включає щонайменше одну, щонайменше дві, щонайменше три або більше трьох послідовностей чтс-міРНК у вікні послідовності із приблизно 500 нуклеотидів. Елемент чтс-міРНК може мати будь-яку довжину, таку як приблизно 20

нуклеотидів (нт), приблизно 25 нт, приблизно 30 нт, приблизно 40 нт, приблизно 50 нт, приблизно 60 нт, приблизно 70 нт, приблизно 80 нт, приблизно 100 нт, приблизно 150 нт, приблизно 200 нт, приблизно 250 нт, приблизно 300 нт, приблизно 350 нт, приблизно 400 нт, приблизно 450 нт, приблизно 500 нт, приблизно 550 нт або приблизно 600 нт.

5 Конструкція рекомбінантної ДНК згідно з винаходом є молекулою ДНК, що включає послідовність, яка щонайменше кодує білок, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, включаючи елемент чтс-міРНК. Термін "рекомбінантний" означає молекулу або клітину, або організм, який був одержаний штучно за допомогою генної інженерії й, таким чином, є продуктом діяльності людини й звичайно інакше не зустрічається у природі. Як
10 використовується тут, конструкція рекомбінантної ДНК є молекулою рекомбінантної ДНК, що включає дві або більше гетерологічні послідовності ДНК. Термін "гетерологічний" означає взаємозв'язок між двома або більше послідовностями нуклеїнових кислот або білка, які були одержані з різних джерел (наприклад, з різних місць у геномі або від різних видів). В одному прикладі промотор і послідовність ДНК, що кодує білок, є гетерологічними один відносно одного,
15 якщо промотор не є нативним промотором кодуючої білок послідовності ДНК. В іншому прикладі кодуюча білок послідовність є гетерологічною відносно елемента чтс-міРНК, якщо така комбінація не зустрічається природно, наприклад, елемент чтс-міРНК рослини, функціонально зв'язаний з геном толерантності до гербіциду, такого як CP4-EPSPS. Крім того, окрема послідовність може бути "гетерологічною" відносно клітини або організму, у який її вводять
20 (тобто послідовність, що не зустрічається природно в такій окремій клітині або організмі).

Термін "функціонально зв'язаний" означає дві молекули полінуклеотидів, зв'язані таким чином, що одна молекула може впливати на експресію іншої. Наприклад, перша молекула полінуклеотиду функціонально зв'язана із другою молекулою полінуклеотиду, при цьому молекули полінуклеотидів розташовуються таким чином, що перша молекула полінуклеотиду
25 може впливати на експресію іншої молекули полінуклеотиду. Дві молекули полінуклеотидів можуть бути частиною окремої нерозривної молекули полінуклеотиду й можуть бути суміжними або розділеними. Наприклад, елемент чтс-міРНК є функціонально зв'язаним з кодуючою білок послідовністю, якщо після транскрипції в клітині чоловічої репродуктивної тканини, присутність елемента чтс-міРНК призводить до супресії експресії рекомбінантного білка в клітині.
30 Функціональний зв'язок кодуючої білок послідовності, і елемента чтс-міРНК може бути досягнений, наприклад, за допомогою введення елемента чтс-міРНК, що прилягає до кодуючої білок послідовності (такій як розташована на 5" або 3" кінці кодуючої білок послідовності, але не обов'язково суміжним способом), в або прилягаючій до нетрансльованої ділянки (UTR) конструкції рекомбінантної ДНК (такій як розташована в або після 5" UTR або 3" UTR) і/або після кодуючої білок послідовності і перед сигналом поліаденілування. В одному варіанті втілення винаходу один або більше елементів чтс-міРНК розташовуються між кодуючою білок послідовністю і послідовністю поліаденілування, тобто в напрямку 3" і прилягаючи до кодуючої білок послідовності. В іншому варіанті втілення винаходу один або більш елементів чтс-міРНК розташовані між стоп-кодоном кодуючої білок послідовності і послідовністю поліаденілування. В
40 іншому варіанті втілення винаходу один або більше елементів чтс-міРНК розташовані в межах 3" UTR послідовності, що прилягає до кодуючої білок послідовності.

Послідовність ДНК елемента чтс-міРНК може варіювати при використанні різних комбінацій і розташувань окремих послідовностей чтс-міРНК і/або при введенні 1-3 нуклеотидних невідповідностей в елементі чтс-міРНК (відносно заданої послідовності чтс-міРНК). Приклади елементів чтс-міРНК представлені тут як SEQ ID NO: 57-94 і 96-104 і в робочих Прикладах.
45 Елемент чтс-міРНК може функціонувати в будь-якому напрямку, тобто він ненаправлений і, таким чином, він може використовуватися в напрямку від 5" до 3" або в напрямку від 3" до 5" у конструкції рекомбінантної ДНК.

Елементи чтс-міРНК, послідовності чтс-міРНК і чтс-міРНК можуть бути ідентифіковані
50 способами, відомими фахівцям у даній галузі, наприклад, за допомогою біоінформаційного аналізу мРНК рослин і бібліотек кДНК. Приклад такого способу ідентифікації представлений у Прикладах нижче. Зокрема, чтс-міРНК і послідовності чтс-міРНК можуть бути ідентифіковані з бібліотек мРНК. Ідентифіковані послідовності чтс-міРНК можуть бути зіставлені із кДНК і/або геномними колекціями послідовностей для ідентифікації елементів чтс-міРНК (тобто ділянок
55 ДНК, що включають щонайменше одну, щонайменше дві, щонайменше три або більше трьох послідовностей чтс-міРНК у вікні з 500 нуклеотидів у послідовності), які придатні для розробки конструкцій рекомбінантної ДНК, як це описане тут.

У деяких варіантах втілення винаходу такі елементи чтс-міРНК синтезують або модифікують in vitro для вмісту більшої, меншої або різної кількості послідовностей чтс-міРНК і/або для зміни
60 відносного положення однієї або більше послідовностей чтс-міРНК, при цьому така модифікація

є кращою в збільшенні або зниженні ефекту елемента чтс-міРНК. Способи синтезу або *in vitro* модифікації елемента чтс-міРНК і визначення оптимальної варіації необхідного рівня супресії відомі фахівцям у даній галузі. Химерні елементи чтс-міРНК також можуть бути одержані з використанням способів, відомих фахівцям у даній галузі, таких як вставка додаткових
 5 необхідних послідовностей чтс-міРНК всередину елемента чтс-міРНК або приєднання додаткових послідовностей чтс-міРНК на 5' або 3' кінці відносно елемента чтс-міРНК. Необмежуючі варіанти втілення химерного елемента чтс-міРНК включають елементи чтс-міРНК, що мають приблизно 80 нт, приблизно 100 нт, приблизно 150 нт, приблизно 200 нт, приблизно 250 нт або приблизно 300 нт послідовності SEQ ID NO: 86; приблизно 80 нт, приблизно 100 нт,
 10 приблизно 150 нт, приблизно 200 нт, приблизно 250 нт або приблизно 300 нт послідовності SEQ ID NO: 87; і/або приблизно 80 нт, приблизно 100 нт, приблизно 150 нт, приблизно 200 нт, приблизно 250 нт, приблизно 300 нт, приблизно 350 нт, приблизно 400 нт, приблизно 450 нт, приблизно 500 нт або приблизно 550 нт послідовності SEQ ID NO: 85. Додаткові варіанти втілення винаходу представлені в робочих Прикладах.

15 Конструкція рекомбінантної ДНК може використовуватися для вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічих репродуктивних тканинах трансгенної рослини, що експресують конструкцію, тобто для одержання експресії щонайменше у вегетативних тканинах, але не в чоловічих репродуктивних тканинах. Як використовується тут, "експресія рекомбінантного білка" означає вироблення рекомбінантного білка з кодуєчої білок
 20 послідовності і одержаного транскрипта (іРНК) у клітині. Як використовується тут, термін "супресія" означає зниження; наприклад, супресія експресії рекомбінантного білка означає зниження рівня рекомбінантного білка, вироблюваного в клітині, наприклад, за допомогою посттранскрипційної супресії гена, опосередкованої інтерференцією РНК.

Вибіркова супресія рекомбінантного білка, як використовується тут, означає зниження
 25 вироблення рекомбінантного білка в клітині або тканині в порівнянні з еталонною клітиною або тканиною щонайменше приблизно на 75 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 85 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 95 % або щонайменше приблизно на 99 %. Еталонна клітина або тканина може бути, наприклад, вегетативною клітиною або тканиною від тієї самої або подібної трансгенної рослини, що
 30 експресує рекомбінантний білок, або, наприклад, вегетативною клітиною або тканиною трансгенної рослини, що має подібний трансген для експресії рекомбінантного білка, але з відсутністю елемента чтс-міРНК. Супресія експресії білка може бути визначена з використанням будь-якого способу, відомого фахівцю в даній галузі, такого як безпосереднє вимірювання накопичення білка в зразку клітини або тканини з використанням способу, такого як ІФА або
 35 вестерн-блот, шляхом вимірювання ферментативної активності білка або шляхом фенотипічного визначення експресії білка. В одному варіанті втілення винаходу вибіркова супресія рекомбінантного білка означає достатнє зниження експресії рекомбінантного білка, здатного надавати толерантність до гербіциду в чоловічій тканині трансгенної рослини, що призводить до обумовленого фенотипу зміненої чоловічої фертильності в трансгенній рослині,
 40 відносно якої був застосований гербіцид як вплив на стерильність. Визначення зміненої чоловічої фертильності в такій трансгенній рослині, таким чином, буде вказувати на вибірккову супресію рекомбінантного білка.

Як використовується тут, термін "кодуєча білок послідовність" означає молекулу полінуклеотиду, яка має нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептидну або білкову
 45 послідовність, тобто поліпептидну послідовність, що кодує рекомбінантний білок. Залежно від умов нуклеотидна послідовність може фактично транслюватися або не транслюватися в поліпептидну молекулу в клітині. Межі кодуєчої білок послідовності звичайно визначаються старт-кодоном трансляції на 5'-кінці й стоп-кодоном трансляції на 3'-кінці. Кодуюча білок послідовність згідно з винаходом включає, але не обмежується цим, кодуєчу білок
 50 послідовність, яка забезпечує необхідні характеристики, пов'язані з морфологією, фізіологією, ростом і розвитком рослини, врожайністю, підвищенням поживності, стійкістю до хвороб або шкідників, толерантністю до гербіцидів або толерантністю до навколишнього середовища або хімічних препаратів. В одному варіанті втілення винаходу кодуєча білок послідовність згідно з винаходом кодує рекомбінантний білок, який під час експресії в трансгенній рослині, надає
 55 толерантність до гербіцидів щонайменше клітині і/або тканині, у якій виникає білок, що експресується; вибіркова супресія білка толерантності до гербіциду в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини в комбінації зі своєчасним застосуванням гербіциду призводить щонайменше до зниженої чоловічої фертильності або до чоловічої стерильності. Така індукована чоловіча стерильність у комбінації з вегетативною толерантністю до гербіцидів може
 60 використовуватися для підвищення ефективності, з якої одержують гібридне насіння,

наприклад, способом елімінації або зниження необхідності фізичного видалення маточок у рослини кукурудзи, використовуваної як жіночої в заданому схрещуванні під час одержання гібридного насіння. Системи індукованої гербіцидами чоловічої стерильності були описані, наприклад, у патенті США № 6762344 і публікації патенту США 2011/0126310. Приклади гербіцидів, придатних для практичного застосування винаходу, включають, але не обмежуються цим, інгібітори ацетил коензим А карбоксилази (ACCase) (наприклад, т. зв. fops і dims), інгібітори ацетолактатсинтази (ALS) (наприклад, сульфонілсечовини (SU) й імідазолінони (IMI)), інгібітори фотосистеми II (PSII) (наприклад, триазини й фенілові ефіри), інгібітори протопорфіриногеноксидази (PPO) (наприклад, флуміоксазин і фомесафен), інгібітори 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази (HPPD) (наприклад, ізоксафлутол і трикетони, такі як мезотрион), інгібітори 5-еноліпірувіл шикімат 3-фосфатсинтази (EPSPS) (наприклад, гліфосат), інгібітори глутамінсинтетази (GS) (наприклад, глюфосинат і фосфінотрицин), синтетичні ауксини (наприклад, 2,4-D і дикамба). Приклади послідовностей, що кодують білок, і/або рекомбінантних білків для використання в практичному застосуванні винаходу включають, але не обмежуються цим, гени, що кодують рекомбінантні білки, що надають толерантність до інгібіторів HPPD (таких як нечутливий до гербіцидів HPPD), гени, що кодують рекомбінантні білки, що надають толерантність до глюфосинату (такого як pat і bar), гени, що кодують рекомбінантні білки, що надають толерантність до гліфосату (такого як толерантний до гліфосату EPSPS, відомого як CP4-EPSPS, представленого тут як SEQ ID NO: 95), і гени, що кодують рекомбінантні білки, що надають толерантність до дикамби (такої як дикамба монооксигеназа (DMO)).

Конструкції рекомбінантної ДНК згідно з винаходом одержують способами, відомими в даній галузі техніки, і в різних варіантах втілення винаходу вони включені у вектори трансформації рослини, плазміди або ДНК пластид. Такі конструкції рекомбінантної ДНК придатні для одержання трансгенних рослин і/або клітин і, таким чином, вони також можуть міститися в геномній ДНК трансгенної рослини, насіння, клітини або частини рослини. Отже, винахід включає варіанти втілення, у яких конструкція рекомбінантної ДНК розташована у векторі трансформації рослини або на біолістичній частинці для трансформації клітини рослини, або в хромосомі, або пластиді клітини трансгенної рослини, або в трансгенній клітині, тканині трансгенної рослини, насінні трансгенної рослини, пилковому зерні трансгенної рослини або в трансгенній або частково трансгенній (наприклад, щепленій) рослині. Вектором є будь-яка молекула ДНК, яка може використовуватися з метою трансформації рослини, тобто введення ДНК у клітину. Конструкції рекомбінантної ДНК згідно з винаходом можуть бути, наприклад, вставлені у вектор трансформації рослини й використовуватися для трансформації рослини з метою одержання трансгенних рослин, насіння і клітин. Способи побудови векторів трансформації рослини добре відомі в даній галузі техніки. Вектори трансформації рослини згідно з винаходом звичайно включають, але не обмежуються цим: відповідний промотор для експресії функціонально зв'язаної ДНК, функціонально зв'язану конструкцію рекомбінантної ДНК і сигнал поліаденілювання (який може бути включений в послідовність 3'UTR). Промотори, придатні для практичного застосування винаходу, включають промотори, що функціонують у рослині для експресії функціонально зв'язаного полінуклеотиду. Такі промотори є різними й добре відомими в даній галузі техніки, і включають промотори, що є індукованими, вірусними, синтетичними, конститутивними, тимчасово регульованими, просторово регульованими і/або просторово-тимчасово регульованими. Додаткові необов'язкові компоненти включають, але не обмежуються цим, один або більше наступних елементів: 5' UTR, енхансер, цис-діючий елемент, інтрон, сигнальну послідовність, транзитну пептидну послідовність і один або більше вибіркових маркерних генів. В одному варіанті втілення винаходу вектор трансформації рослини включає конструкцію рекомбінантної ДНК.

Конструкції рекомбінантної ДНК і вектори трансформації рослини згідно з даним винаходом одержують будь-яким способом, що є придатним для наміченого застосування, беручи до уваги, наприклад, тип необхідної експресії, необхідну кодуючу білок послідовність (і, таким чином, толерантність до гербіцидів), а також зручність використання в рослині, у якій повинна експресуватися конструкція рекомбінантної ДНК. Загальні способи, придатні для роботи з молекулами ДНК для одержання й застосування конструкцій рекомбінантної ДНК і векторів трансформації рослини, добре відомі в даній галузі техніки й описані докладно, наприклад, у довідниках і лабораторних посібниках, включаючи Sambrook and Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (third edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001. Конструкції рекомбінантної ДНК згідно з винаходом можуть бути модифіковані способами, відомими в даній галузі техніки, повністю або частково, наприклад, для підвищеної зручності роботи із ДНК (такі як сайти розпізнавання рестриктази або сайти клонування на основі рекомбінації) або для включення кращих для рослини послідовностей (таких як використання рослинного кодону або

консенсусних послідовностей Kozak), або для включення послідовностей, придатних для розробки конструкції рекомбінантної ДНК (таких як послідовності спейсера або лінкера). У певних варіантах втілення винаходу послідовність ДНК конструкції рекомбінантної ДНК включає послідовність ДНК, яка була оптимізована кодоном для рослини, в якій необхідна експресія конструкції рекомбінантної ДНК. Наприклад, конструкція рекомбінантної ДНК для експресії в рослині може мати всі або частини оптимізованої кодоном послідовності для експресії в рослині відомими в даній галузі техніки способами. Конструкції рекомбінантної ДНК згідно з винаходом можуть знаходитися разом з іншими рекомбінантними ДНК для надання додаткових ознак (наприклад, у випадку трансформованих рослин, ознак, що включають резистентність до гербіцидів, резистентність до шкідників, толерантність до проростання в холодних умовах, толерантність до дефіциту води), наприклад, способом експресії або супресії інших генів.

Клітини трансгенної рослини й трансгенні рослини

Аспект винаходу включає клітини трансгенної рослини, тканини трансгенної рослини й трансгенні рослини або насіння, які включають конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом. Додатковий аспект згідно з винаходом включає штучні або рекомбінантні хромосоми рослини, які включають конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом. Придатні способи трансформації клітин рослини-хазяїна для використання в даному винаході включають фактично будь-який спосіб введення ДНК у клітину (наприклад, якщо конструкція рекомбінантної ДНК стабільно інтегрована в хромосому рослини) і добре відомі в даній галузі техніки. Типовий і широко використовуваний спосіб введення конструкції рекомбінантної ДНК у рослини представлений системою трансформації *Agrobacterium*, яка добре відома фахівцям у даній галузі техніки. Трансгенні рослини можуть бути регенеровані із клітини трансформованої рослини способами культивування рослинної клітини. Трансгенна рослина, гомозиготна відносно трансгена, може бути одержана статевим схрещуванням (самозапиленням) незалежного сегреганта трансгенної рослини, що містить одну екзогенну генну послідовність для себе самої, наприклад, рослина F0 для одержання насіння F1. Одна четверта частина одержаного насіння F1 буде гомозиготною відносно трансгена. Рослини, вирощені із пророщеного насіння F1, можуть бути досліджені відносно гетерозиготності звичайно з використанням аналізу ОНП або аналізу термальної ампліфікації, який дозволяє розрізнити гетерозиготи й гомозиготи (тобто аналіз зиготності).

Винахід надає трансгенну рослину, що має у своєму геномі конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом, включаючи, без обмеження, крім усього іншого, люцерну, бавовну, кукурудзу, рапс, рис, сою й пшеницю. Винахід також надає клітини трансгенної рослини, частини рослини й потомство такої трансгенної рослини. У контексті даного винаходу "потомство" включає будь-яку рослину, насіння, клітину рослини і/або частину рослини, одержані або регенеровані з рослини, насіння, клітини рослини і/або частини рослини, які включають конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом. Трансгенні рослини, клітини, частини й насіння, одержані з таких рослин, можуть бути гомозиготними або гетерозиготними на предмет конструкції рекомбінантної ДНК згідно з винаходом.

Крім того, даний винахід включає варіанти втілення, у яких конструкція рекомбінантної ДНК знаходиться в готовому продукті, одержаному із трансгенної рослини, насіння або частині рослини згідно з даним винаходом; такі готові продукти включають, але не обмежуються цим, зібрані частини рослини, дроблені або цільні зерна або насіння рослини, або будь-який харчовий або нехарчовий продукт, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК згідно з винаходом.

Способи індукування чоловічої стерильності у трансгенних рослин і одержання гібридного насіння

Інший аспект винаходу включає спосіб індукування чоловічої стерильності у трансгенної рослини, що включає застосування ефективної кількості гербіциду до трансгенної рослини, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, який надає трансгенній рослині толерантність до гербіциду, і функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає елемент чтс-міРНК, який надає трансгенній рослині щонайменше вегетативну толерантність до гербіциду, при цьому застосування гербіциду проводиться під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини трансгенної рослини, що індукує чоловічу стерильність у трансгенній рослині.

В одному варіанті втілення винаходу трансгенна рослина є рослиною кукурудзи. В одному варіанті втілення винаходу застосування гербіциду запобігає щонайменше осипанню пилку або випинанню пилків. В одному варіанті втілення винаходу розвиток чоловічої репродуктивної тканини є стадією, вибраною із групи, яка складається зі стадії розвитку рослини кукурудзи V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 і V14.

В одному варіанті втілення винаходу гербіцид вибраний із групи, яка складається з інгібіторів ацетил коензим А карбоксилази (ACCase), інгібіторів ацетолактатсинтази (ALS), інгібіторів фотосистеми II (PSII), інгібіторів протопорфіриногеноксидази (PPO), інгібіторів 4-гідроксифеніл піруват діоксигенази (HPPD), інгібіторів 5-еноліпірувілшикімат 3-фосфатсинтази (EPSPS), інгібіторів глутамінсинтази (GS) і синтетичних ауксинів. В одному варіанті втілення винаходу гербіцид є гліфосатом, а рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS.

Додатковий аспект винаходу включає спосіб одержання гібридного насіння, що включає: (а) застосування гербіциду до трансгенної рослини, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, який надає трансгенній рослині толерантність до гербіциду, і функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає елемент чтс-міРНК, при цьому застосування гербіциду проводиться під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини трансгенної рослини, що призводить до індукування чоловічої стерильності в трансгенній рослині; (б) запилення трансгенної рослини пилом другої рослини й (в) збирання гібридного насіння трансгенної рослини. В одному варіанті втілення винаходу трансгенна рослина є кукурудзою. В одному варіанті втілення винаходу гербіцид є гліфосатом, а рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS. В одному варіанті втілення винаходу гліфосат застосовують під час розвитку в ефективній дозі від приблизно 0,125 фунтів кислоти в еквіваленті на акр до приблизно 8 фунтів кислоти в еквіваленті на акр.

В іншому аспекті винахід включає гібридне насіння, зібране в трансгенній рослині із чоловічою стерилізацією, яка була запилена пилом другої рослини, при цьому чоловіча стерильна трансгенна рослина включає конструкцію рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, який надає трансгенній рослині толерантність до гербіцидів, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає елемент чтс-міРНК, і при цьому в трансгенній рослині була індукована чоловіча стерильність застосуванням ефективної кількості гербіциду в період розвитку чоловічої репродуктивної тканини трансгенної рослини. В одному варіанті втілення винаходу гібридне насіння є гібридним насінням трансгенної кукурудзи. В одному варіанті втілення винаходу гербіцид є гліфосатом, а рекомбінантний білок є толерантним до гліфосату EPSPS. В одному варіанті втілення винаходу гліфосат застосовують під час розвитку в ефективній дозі від приблизно 0,125 фунтів кислоти в еквіваленті на акр до приблизно 8 фунтів кислоти в еквіваленті на акр. В одному варіанті втілення винаходу застосування гербіциду запобігає щонайменше осипанню пилку або випинанню пиляків. В одному варіанті втілення винаходу розвиток чоловічої репродуктивної тканини є стадією, вибраною із групи, яка складається зі стадії розвитку рослини кукурудзи V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 і V14.

Приклади

Приклад 1

Даний приклад описує ідентифікацію чтс-міРНК і елементів чтс-міРНК. Біоінформаційний аналіз даних секвенування з декількох бібліотек малих РНК кукурудзи ідентифікував групу малих РНК (мРНК), які знаходилися в надлишковій кількості або специфічно експресувались у волотях кукурудзи. Відносно поширення таких чтс-міРНК у волотях кукурудзи варіювало від приблизно 50 до 631 транскриптів на чверть мільйона послідовностей, що є нормалізованою кількістю. Такі мРНК ідентифіковані як міРНК через їх довжини (18-26 нуклеотидів) і їх імовірного походження від попередника дсРНК. Через свою схему експресії міРНК, специфічну для чоловічої тканини, позначають як "чтс-міРНК". У контексті даного винаходу "схема експресії" є будь-якою схемою диференціальної експресії ДНК, РНК або білка. Наприклад, специфічна для волоті схема експресії означає специфічну або підвищену експресію ДНК, РНК або білка в тканині волоті і/або клітині. Приклади відповідної послідовності ДНК для чтс-міРНК, позначені тут як "послідовності чтс-міРНК", представлені у вигляді SEQ ID NO: 1-56 і 105-149.

Такі послідовності чтс-міРНК потім були зіставлені з колекціями послідовностей кДНК. Порівняння послідовності чтс-міРНК відносно колекції генів кукурудзи unigene (збірні послідовності кДНК) з використанням BLAST привело до такого дивовижного результату, що велика кількість чтс-міРНК була зібрана у вигляді кластерів разом і відзначалися навіть перекривання в ділянці ДНК, що знаходиться в декількох близькоспоріднених, але при цьому унікальних послідовностях кДНК. У групі послідовностей кДНК всі послідовності містили таку ділянку, однак послідовність ДНК ділянки варіювала через різні комбінації й розташування окремих послідовностей чтс-міРНК і/або 1-3 нуклеотидних невідповідностей окремим послідовностям чтс-міРНК. Ділянка, визначена як така, що має щонайменше одну послідовність чтс-міРНК у вікні нуклеотидної послідовності, позначається тут як "елемент чтс-міРНК". У різних варіантах втілення винаходу вікно нуклеотидної послідовності включає щонайменше приблизно 20 суміжних нуклеотидів (нт) (наприклад, щонайменше 18, 19, 20, 21, 22, 23 або 24 нт),

щонайменше приблизно 25 нт, щонайменше приблизно 30 нт, щонайменше приблизно 40 нт, щонайменше приблизно 50 нт, щонайменше приблизно 100 нт або щонайменше приблизно 150 нт. Приклади послідовності ДНК для елементів чтс-міРНК представлені тут як SEQ ID NO: 57-94 і 96-104. Елемент чтс-міРНК може мати більше ніж одну послідовність чтс-міРНК, наприклад,

щонайменше дві, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять або більше п'яти послідовностей чтс-міРНК у заданому вікні нуклеотидної послідовності. Дві або більше послідовностей чтс-міРНК у заданому елементі чтс-міРНК можуть перекриватися через те, що щонайменше частина їх нуклеотидних послідовностей є ідентичною (див. Таблицю 5, де представлені приклади чтс-міРНК із нуклеотидними послідовностями, що перекриваються).

Біоінформаційний аналіз показав, що множинні чтс-міРНК можуть бути одержані з того самого транскрипта РНК, наприклад, транскрипта, одержаного з однієї з послідовностей кДНК, описаних вище як такі, що включають елемент чтс-міРНК. Також було виявлено, що велика кількість чтс-міРНК мають 1-3 невідповідності при порівнянні з елементами чтс-міРНК у групі близькоспоріднених послідовностей кДНК. Вважається, що це вказує на те, що такі чтс-міРНК одержують із множинних близькоспоріднених транскриптів, що призводить до одержання великої близькоспорідненої групи чтс-міРНК. Таким чином, транскрипт РНК, одержаний із кДНК, що включає елемент чтс-міРНК (що містить множину послідовностей чтс-міРНК), буде комплементарним і, отже, здатним гібридизувати у множинні чтс-міРНК і/або їх компоненти. Таким чином чтс-міРНК, що зустрічається в природі, має послідовність РНК, яка є ідеальним або майже ідеальним компонентом послідовності чтс-міРНК (наприклад, коли чтс-міРНК має послідовність РНК не більше ніж приблизно з 1-3 невідповідностями відносно послідовності чтс-міРНК); у цілому така чтс-міРНК має послідовність РНК, що є ідеальним або майже ідеальним компонентом до елемента чтс-міРНК.

Пошук схожості послідовностей чтс-міРНК відносно бази даних геномної ДНК кукурудзи з використанням BLAST виявив множину локусів із схожістю по суті відносно елемента чтс-міРНК. Такі локуси потім були проаналізовані з використанням відкритих рамок зчитування (ORF), однак ідентифіковані гіпотетичні поліпептиди, як було визначено, не мали гомології по суті з будь-яким відомим білком. Біоінформаційний аналіз чтс-міРНК, що приводять до одержання послідовностей кДНК, показав, що значна гомологічність послідовностей на нуклеотидному рівні відносно будь-якого відомого гена рослини відсутня. Такі дані вказують на те, що чтс-міРНК може бути одержана з будь-якого такого локусу способом процесінгу дсРНК, утвореної між транскриптами із протилежною полярністю, або способом процесінгу дсРНК від аберантних транскриптів внаслідок РНК-залежної активності РНК-полімерази. Також можливо, що чтс-міРНК піддається процесінгу із внутрішніх вторинних структур дсРНК, які можуть бути утворені в деяких транскриптах, що приводять до утворення чтс-міРНК.

Зворотна транскрипція чтс-міРНК приводила до утворення послідовностей чтс-міРНК, які були маповані в один з елементів чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87). Це представлено на Фігурі 1, де вісь Х представляє розташування нуклеотидів у напрямку від 5' до 3' зліва направо вгорі й справа наліво вниз. Відносний надлишок чтс-міРНК представлений у вигляді транскриптів на чверть мільйона послідовностей (trq), відкладених на осі Y. Як це можна побачити з Фігури 1, декілька чтс-міРНК (обведені кільцем) широко представлені в специфічній для волоті бібліотеці мРНК (вісь Y). Прогнозовані послідовності чтс-міРНК також неоднорідно розподілені серед елемента чтс-міРНК (вісь X).

Приклад 2

Даний приклад демонструє аналіз чтс-міРНК ендогенної експресії в волотях. Нативні схеми експресії чтс-міРНК in planta були проаналізовані з використанням декількох різних способів. Такі аналізи підтвердили, що мРНК, гібридизовані в елементи чтс-міРНК, знаходяться у переважній кількості і/або специфічно експресуються в волотях у зародковій плазмі кукурудзи (тобто чтс-міРНК знаходяться у надлишковій кількості і/або специфічно експресуються в волотях), і що у варіанті втілення винаходу чтс-міРНК знаходиться в переважній кількості в і/або експресується специфічно в пилковому зерні на стадії розвитку пилку у вигляді одноядерної мікроспори.

Для доказу накопичення чтс-міРНК специфічно в волотях in planta використовували три репрезентативні послідовності чтс-міРНК (SEQ ID NO: 26 (1372590), SEQ ID NO: 8 (648011), SEQ ID NO: 33 (410590)) для розробки зондів для низькомолекулярного (НМ) аналізу нозерн-блот з використанням мРНК, одержаних з кукурудзи або рису. Для таких експериментів уся РНК була екстрагована із тканини рослини з використанням реагенту TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA). РНК (7,5 мкг) з кожного зразка була денатурована за температури 95 °C протягом 5 хвилин перед розділенням на гелі 17 % PAGE, що містить 7 М сечовини в 0,5X TBE буфері (Allen et al. (2004) Nature Genetics 36:1282-1290). Після електрофорезу гель був підданий блоту на

мембрані Nytran SuPerCharge® (Whatman-Schleicher & Schuell, Florham Park, NJ) з використанням системи для напівсухого електрофоретичного перенесення клітин Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) відповідно до протоколу виробника. Одержаний блот був перехресним способом з'єднаний за $1200 \text{ мікроджоулів/см}^2 \times 100$ в Stratalinker® 1800 (Stratagene, Cedar Creek, TX). Для приготування зондів матриця із зондом РНК була одержана способом ПЛР і містила промотор Т7 на одному кінці й одну з послідовностей малих РНК на протилежному кінці. Послідовності мРНК, включені в матрицю зонда РНК, включали: [1] Gma-miR159a (miRBase.org номер доступу MI0001773), яку використовували як контроль для завантаження, [2] sR1372590 (SEQ ID NO: 26), [3] sR648011 (SEQ ID NO: 8) і [4] sR410590 (SEQ ID NO: 33). Зонди РНК були транскрибовані з використанням РНК полімерази Т7 і мічені дигоксигеніном (DIG) з використанням набору DIG Northern Starter (Roche, Indianapolis, IN) відповідно до протоколу виробника. Гібридизацію проводили з 100 нг міченого DIG зонда в буфері гібридизації PerfectHyb™ (Sigma, St. Louis, MO) за температури 38 °C протягом 16 годин. Визначення проводили з використанням набору DIG Northern Starter, відповідно до протоколу виробника, перед впливом на плівку Kodak® Biomax™ XAR (Sigma, St. Louis, MO). Протестовані зразки включали все або підгрупу з наступного: лист кукурудзи від рослин, вирощених при стресовому впливі азотом; паросток, корінь або ендосперм кукурудзи від рослин, вирощених при стресовому впливі холодом; лист і корінь кукурудзи від рослин, вирощених при стресовому впливі сухості; кукурудзяні рильця; молоді волоті кукурудзи; зрілі волоті кукурудзи; незапилені ядра кукурудзи; ембріон кукурудзи – 24 дні після запилення (ДПЗ); ядра кукурудзи – 22 ДПЗ; зрілі ядра кукурудзи; ембріон кукурудзи – зрілі (сухі) ядра; ендосперм кукурудзи – сухий; рисове зерно й рисові проростки. Результати, одержані за допомогою НМ нозерн-блоту з використанням щонайменше трьох різних зондів чтс-міРНК (sR1372590, sR648011 і sR410590), виявили сигнал тільки в рядах, відповідних до молоді волоті й зрілої волоті, що підтверджує біоінформаційний аналіз і висновок про те, що експресія чтс-міРНК є сильно підвищеною або специфічною для тканини волоті.

Тканинна специфічність і накопичення мРНК, які можуть розпізнавати елемент чтс-міРНК, були оцінені з використанням широкого спектра зародкової плазми й НМ нозерн-блоту. Для цього аналізу був відібраний елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87, що містить множинні послідовності чтс-міРНК). Такий елемент чтс-міРНК включає три послідовності чтс-міРНК, використовувані для розробки зондів мРНК sR1372590, sR648011 і sR410590, що дозволяє використовувати ці зонди для НМ нозерн-блоту зразків зародкової плазми кукурудзи. Для цих експериментів була одержана РНК від двадцяти різних інбредних ліній кукурудзи з різним генетичним фоном, наприклад, з відносною зрілістю, що варіює від 83 до 120 (Таблиця 1). Для трьох таких інбредних ліній (91DUA6, 01DKD2 і LH244) була зібрана тканина з молоді волоті, старої волоті, листка, качана й кореня. У Таблиці 1 представлені відповідні стадії V і розмір волоті при зборі молоді волоті й старої волоті. Вся РНК була екстрагована з використанням розчину TRIzol®. НМ РНК була виділена з використанням набору для виділення мРНК mirVana™ (№ за каталогом AM1560, Ambion, Austin, TX). НМ нозерн-блот був проведений з використанням акриламідного гелю Bio-Rad Criterion™ Precast 15 % TBE-сечовина (№ за каталогом 345-0092, BioRad, Hercules, CA). Гель був підданий блоту на позитивно зарядженій мембрані (№ за каталогом 11209272, Roche Applied Systems, Mannheim, Germany). Зонди були помічені (1) 32-Р для випадкового примірування або (2) DIG ДНК із використанням набору для мічення Roche PCR, або (3) зондом DIG РНК, як це описано вище. Всі зонди, використовувані для зондування нозерн-блотів, були зворотно комплементарні ендогенному транскрипту або послідовності кДНК елемента чтс-міРНК. Присутність мРНК, яка гібридизувала в трансгенний елемент чтс-міРНК, була специфічною для волоті; сигнал для листу, качана або кореня для кожного із трьох інбредних генотипів кукурудзи 91DUA6, 01DKD2 і LH244 не був визначений (Фігура 2).

Для визначення часової схеми експресії під час розвитку мРНК волоті, яка змогла б розпізнавати елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87), був проведений НМ нозерн-блот. РНК була одержана з молодих і старих волотей від різних інбредних ліній кукурудзи, див. Таблицю 1. Одержання РНК і спосіб НМ нозерн-блоту проводили по суті так, як це описане вище.

Таблиця 1:

Інбредна зародкова плазма, показник зрілості й стадія розвитку волоті

Інбрид	Показник зрілості	Молода волоть		Стара волоть	
		Стадія	Розмір волоті (дюйми)	Стадія	Розмір волоті (дюйми)
C3SUD402	108	V9	5	V12	10
HIQA202	113	V9-10	4,5	V13	13
BEBE788	83	V10-11	10	V13	7,5
BIQA207	103	V10	7	V11	9,5
DIDA404	112	V10	2,5-3	V11	9,5
5DA92	107	V10-11	5,7	V12	11
DIDA406	109	V10	6,5	V12	9
80DJD5	114	V10	6,5	V11	10
JEDO115	120	V9	2,5	V11-12	10
FIDA240	116	V9-10	2,5	V12	11
BIQA347	99	V9-10	3,5	V11-12	10,5-11
HOQA203	105	V10-11	5,5	V12-13	11
91DUA6	90	V10-11	10	V12-13	10
BIDA345	95	V10	5	V12-13	10
01DKD2	111	V9-10	5	V13	10,5-11
DIDA403	108	V10	2,5-3	V12	10,5-11
64DJD1	105	V9-10	2,5-3	V12	10,5-11
DIQA423	108	V9-10	3	V12	9,5
BIQA208	102	V10	5,5	V13	9,5
LH244	111	V9-10	1-2,5	V13	10

Як це можна бачити на Фігурі 4, мічений DIG зонд РНК, відповідний до зворотного комплементу елемента чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87), гібридизував у мРНК як у молодій, так і в старій волоті, за винятком того, що довжина молодої волоті була від 2,5 дюймів до 3 дюймів: ряди 5 (інбрид DIDA404), 9 (інбрид JEDO115), 10 (інбрид FIDA240), 16 (інбрид DIDA403), 17 (інбрид 64DJD1), 18 (інбрид DIQ423) і 20 (інбрид LH244). Крім того, цей експеримент підтвердив відсутність визначення гібридизації мРНК в елемент чтс-міРНК зі зразків листу (ряди 21 і 22) або качана (ряди 23 і 24) від інбридів BIQA208 і LH244. У цілому ці дані вказують на те, що мРНК, гібридизовані в елемент чтс-міРНК, специфічно експресуються в волоті кожного протестованого інбредного генотипу, коли довжина волоті перевищує приблизно 3,5 дюймів.

Аналіз гібридизації *in situ* проводився для вивчення клітково-специфічної експресії послідовності чтс-міРНК (sR648011, SEQ ID NO: 8). У пиляках кукурудзи мікроспори виробляються за допомогою мейозу й розвиваються в зрілий пилкок. Мікроспорогенез кукурудзи може бути чітко розділений на наступні стадії: мейоз спорогенних клітин, вивільнення тетрад у вигляді вільних мікроспор, мітоз однопідрних мікроспор з одержанням триклітинного пилку й зрілі пилкові зерна. Для цих експериментів використовували волоті кукурудзи, зібрані до періоду цвітіння в рослин кукурудзи, вирощених у стандартних умовах у теплиці. Зонди замкненої нуклеїнової кислоти (LNA) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) використовували так, як це вказане нижче, при цьому положення LNA позначене символом «+». Антисмисловий зонд був розроблений для визначення чтс-міРНК для sR648011 (SEQ ID NO: 8) (5'-біотин-CAAT+GCA+CTG+GTG+AGT+CAC+TGT-3"), у той час як смисловим зондом був зворотний комплемент антисмислового зонда (5'-біотин-ACA+GTG+ACT+CAC+CAG+TGC+ATG-3") для використання як негативний контроль. Зонди LNA дозволяють проводити промивання в дуже точних умовах і, отже, забезпечують високоспецифічну гібридизацію (Válóczi et al., 2006; Nuovo et al., 2009). Всі зонди були мічені біотином. Зразки волоті кукурудзи були фіксовані в 4 % параформальдегіді в 1×ФСБ за температури 4 °C протягом 36 годин і потім дегідратовані за температури 4 °C з використанням установлених серій етанол:H₂O. Потім волоті були поміщені в 75 % EtOH і 25 % Histoclear (National Diagnostics, Atlanta, GA) на період 1,5 год., 50 % EtOH і 50 % Histoclear на період 1,5 год., 25 % EtOH і 75 % Histoclear на період 1,5 год. і 100 % Histoclear на період 3×1,5 год., все за температури 25 °C. Потім Histoclear був поступово заміщений розплавленим парапластом за температури 50 °C, а волоті були перенесені у

форми, і перед розділенням їх зберігали за температури 4 °С. Занурені в парафін волоті були розділені на зрізи мікротомом товщиною 8 мкм. Серія зрізів була одержана з тих самих пиляків, а потім зрізи, що прилягають, використовували для зондування смисловим або антисмисловим зондом, відповідно. Прегібридизацію й гібридизацію проводили за температури 42 °С із промиванням за температури 55 °С. Визначення мічених біотином зондів LNA, ренатурованих із транскриптом, проводили з розведенням від 1 до 400 антибіотину лужної фосфатази (ЛФ) і субстрату BM Purple AP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Зображення були одержані за допомогою камери на мікроскопі Olympus (Center Valley, PA). Зрізи від тих самих пиляків були поділені на дві групи – одну використовували для антисмислового зонда (Фігура 5, ліворуч), а другу - для смислового зонда (Фігура 5, праворуч). Сигнал гібридизації (темно-фіолетовий) був визначений тільки на зрізах, які були гібридизовані антисмисловим зондом, але не на зрізах, які були інкубовані зі смисловим зондом (Фігура 5). Сильний сигнал, одержаний для антисмислового зонда, вказує, що така чтс-міРНК знаходиться в надмірній кількості (активно експресується) у пилковому зерні на стадії одноядерної мікроспори в ході розвитку пилку.

Приклад 3

Даний приклад ілюструє конструкції для трансформації рослини й одержання трансгенної рослини. Елемент чтс-міРНК був введений в 3'UTR касети трансгенної експресії й використовувався для одержання трансгенних рослин кукурудзи для дослідження впливу елемента на трансгенну експресію в трансгенних рослинах. Елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87) був вставлений в 3'UTR касети трансгенної експресії CP4-EPSPS для трансформації кукурудзи. Такий елемент чтс-міРНК був вибраний через численність у ньому послідовностей чтс-міРНК (Фігура 3), включаючи послідовності трьох зондів міРНК (sR1372590, sR648011 і sR410590), використовуваних для НМ нозерн-блоту в Прикладі 2. Такий елемент чтс-міРНК також дозволяв протестувати ефект невідповідностей чтс-міРНК. Протестований тут елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 87) має одну нуклеотидну зміну (CΔT: AAGCTATTGATTCCCTAAGTGCCA) у порівнянні з однією з початкових послідовностей чтс-міРНК (SEQ ID NO: 33 використовували для розробки зонда sR410590). Елемент чтс-міРНК був вставлений у трансгенну касету у зворотній комплементарній орієнтації відносно свого положення в ендогенній кДНК, однак вважається, що елемент функціонує подібним способом в обох напрямках, оскільки специфічні для волоті молекули міРНК, комплементарні будь-якому ланцюгу елемента чтс-міРНК, можуть бути виявлені в волоті кукурудзи (Фігури 1 і 3).

Були сконструйовані декілька касет експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК (Таблиця 2), які використовували для трансформації рослини кукурудзи. У касетах експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК досліджували різні комбінації елементів експресії. Елементи експресії, такі як промотори, лідери, інтрони, транзитні пептиди хлоропластів і 3'UTR, необхідні для ефективної й стабільної експресії трансгена, добре відомі в даній галузі техніки. Касети експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК були розроблені для включення одного із двох окремих промоторів; функціонального зв'язку із ДНК одного із двох лідерів; функціонального зв'язку із ДНК одного із двох інтронів; функціонального зв'язку з однією із двох молекул ДНК, що кодують той самий транзитний пептид хлоропластів (СТР); функціонального зв'язку з молекулою ДНК, одержаною з гена *aroA* від *Agrobacterium* sp. штаму CP4, що кодує білок CP4-EPSPS; функціонального зв'язку із ДНК, що кодує елемент чтс-міРНК; функціонального зв'язку з 3'UTR однієї із двох молекул ДНК. Конструкція 4 містила ген CP4-EPSPS дикого типу, а всі інші вектори містили версію гена CP4-EPSPS, оптимізованого рослинним кодоном. Конструкції 3, 5 і 6 (Таблиця 2) були розроблені для визначення того, чи буде елемент чтс-міРНК, включений в 3'-UTR, призводити до одержання рослин зі специфічною чутливістю волотей до гліфосату й вегетативною толерантністю до гліфосату. Конструкції 4 і 7 є контрольними конструкціями без елемента чтс-міРНК.

Таблиця 2:

Конструкції для трансформації рослин

Конструкція	Промотор	Лідер	Інtron	СТР	Трансген	чтс-міРНК	3'UTR
3	A	A	A	A	CP4	SEQ ID NO: 87	A
4	A	A	A	A	CP4	**	A
5	B	B	B	B	CP4	SEQ ID NO: 87	A
6	B	B	B	B	CP4	SEQ ID NO: 87	B
7	B	B	B	B	CP4	**	A

Трансгенні рослини кукурудзи, трансформовані кожною з п'яти касет експресії, були одержані з використанням добре відомих способів. Коротко, клітини кукурудзи були трансформовані *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією кожною з конструкцій, перерахованих у Таблиці 2 (індивідуально), і регенеровані в інтактні рослини кукурудзи. Окремі рослини, що характеризувалися цілісністю касети трансгенної експресії й резистентністю до гліфосату, були відібрані з популяції рослин. Укорінені рослини з нормальними фенотипічними характеристиками були відібрані й перенесені на ґрунт для росту й подальшої оцінки. Рослини R0 були перенесені на ґрунт для росту, зрошені 0,75 фунта/акр гліфосатом на стадії V3-V4, потім 0,75 фунта/акр гліфосатом на стадії V7-V9 і потім запилені перехресним способом пилом нетрансгенних рослин кукурудзи з однакової зародкової плазми (для конструкцій 3, 5 і 6 явищ) або самозапилені (для конструкцій 4 і 7 явищ) з одержанням насіння R1. Потім рослини були відібрані за допомогою комбінації аналітичних способів, включаючи TaqMan, аналіз ПЛР і вегетативну толерантність до розпилення гербіцидів і знижений (необхідний) показник чоловічої фертильності після розпилення гербіциду (гліфосату).

Приклад 4

Цей приклад демонструє способи аналізу трансгенних рослин у теплиці. Трансгенні рослини, трансформовані касетою експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК, були проаналізовані на предмет вегетативної толерантності до гліфосату й чоловічої фертильності. Було виявлено, що трансгенні рослини, одержані з конструкцій, що містять касети експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК, володіють вегетативною толерантністю до гліфосату й індукованою чоловічою стерильністю при пізньому застосуванні гліфосату.

Рослини R0 були вирощені у двох повторностях у теплиці й не були оброблені або були оброблені гліфосатом 0,75 фунта/акр на стадії V6 (ранній), а потім гліфосатом 0,75 фунта/акр на стадії V9 (пізній) (Фігура 7 і Таблиця 3). Досліджувані явища R0 були явищами із множинними копіями. Всі рослини R0, які не були оброблені, мали нормальне випинання пиляків і повністю фертильний пилок, як це визначено забарвленням згідно з Alexander. Всі рослини R0, які були оброблені, мали вегетативну толерантність до гліфосату. Рослини R0, одержані з конструкцій 4 і 7, які не містили елемента чтс-міРНК, не володіли чутливістю волоті до гліфосату або індукованою чоловічою стерильністю. Рослини R0, одержані з конструкцій 3, 5 і 6, які містили елемент чтс-міРНК, мали чутливість волотей до гліфосату й індуковану чоловічу стерильність; такі рослини не мали або мали всього лише декілька випинань пиляків, і >99 % пилку було нежиттєздатним, як це визначено забарвленням згідно з Alexander.

Таблиця 3:

Дані обробки гліфосатом

Конструкція	Рання обробка гліфосатом Вегетативна толерантність	Пізня обробка гліфосатом Індукована чоловіча стерильність
3	Так	Так
4	Так	Ні
5	Так	Так
6	Так	Так
7	Так	Ні

Такі спостереження показали, що присутність елемента чтс-міРНК в 3'UTR трансгенної касети приводило до сайленсингу трансгена, специфічного для волоті. Специфічна для волоті втрата транскрипта іРНК, виробленого касетою експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК, призвела до одержання волотей, які були чутливі до гліфосату, до одержання рослини з індукованою чоловічою стерильністю, у той час як інші тканини рослини були толерантні до гліфосату, що призвело до розвитку вегетативної толерантності до гліфосату й хорошої жіночої фертильності.

Потім використовували імунолокалізацію для вимірювання білка CP4-EPSPS у тканинах трансгенних рослин. Від рослин, трансформованих конструкцією 3 або конструкцією 4, а також від нетрансгенної кукурудзи (LH198) були одержані волоті. Рослини були вирощені в теплиці з 14 годинами світла за температури 26,67 °C і 8 годинами темряви за температури 21,11 °C. У кожний горщик було посаджено по одному насінню. Горщики були випадковим способом розташовані на підлозі теплиці. Рослини поливали за необхідності й удобрювали 20-20 сумішшю азоту, калію й фосфору, відповідно. Рослини з конструкцією 3 або конструкцією 4 були оброблені розпиленням гліфосатом у кількості 0,75 фунта/акр на стадії V2 для підтвердження вегетативної толерантності до гліфосату. Молоді волоті були зібрані на стадіях V10-V11 для одержання тканин пиляків на стадіях мікроспори материнської клітини й вільної мікроспори; зрілі волоті були зібрані на стадії T7, за 1-2 дні до осипання пилку, для одержання тканин пиляків з повністю розвиненим пилком. Пиляки були витягнуті із вторинного колоска волоті з використанням препарувального пінцета й безпосередньо зафіксовані в 3,7 % формальдегіді в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) у м'якому вакуумі. Після промивання у ФСБ тканини були розміщені в загортуючому середовищі й негайно заморожені. Заморожені блоки тканин зберігали за температури мінус -80 °C до моменту одержання зрізів за температури мінус -20 °C з використанням мікротома, після чого зрізи були зібрані на заряджених покривних стеклах.

Зрізи тканин були блоковані блокувальним агентом (10 % нормальна сироватка кози, 5 % бичачий сироватковий альбумін, 0,1 % Тритон X-100 у ФСБ) протягом 2 годин. Зрізи були інкубовані з антитілом до CP4-EPSPS (1/500 у ФСБ). Після трикратного промивання зрізів у ФСБ зрізи тканин були інкубовані із вторинним антитілом кози до IgG миші, кон'югованим із флуорофором Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon). Для негативного контролю інкубацію антитіла CP4-EPSPS не проводили. Як позитивний контроль антитіло до α -тубуліну (Sigma, St. Louis, MO), білку цитоскелета, що експресується в більшості типів клітин, було заміщено антитілом CP4-EPSPS на окремих зрізах. Первинні й вторинні антитіла були інкубовані за кімнатної температури протягом 2-4 годин, а потім додатково інкубовані протягом ночі за температури 4 °C. Після промивання тканини були візуалізовані лазерним скануючим конфокальним мікроскопом Zeiss (LCM) 510 META з використанням лазера 488 нм для збудження й 500-550 нм для набору емісійних фільтрів. Такий же самий параметр візуалізації застосовували для зразків, включаючи контроль. Флуоресцентні зображення й зображення в яскравому полі були скановані з кожного зріза й об'єднані з використанням програмного забезпечення LCM згодом для одержання структурної інформації. Сильний сигнал був одержаний для антитіла до CP4-EPSPS у тканині філаментів (Фігура 6A, коротка стрілка) і пилку (Фігура 6A, довга стрілка) у зрілій волоті від рослин, одержаних з конструкцією 4 (Фігура 6A) з відсутністю елемента чтс-міРНК. Рослина з Фігури 6A є гемізиготною на предмет касети трансгена, таким чином, тільки приблизно 50 % пилку мало позитивний сигнал CP4-EPSPS. На відміну від цього, сильний сигнал був одержаний для антитіла до CP4-EPSPS тільки в тканині філаментів (Фігура 6B, коротка стрілка), а для пилку сигнал був відсутній (Фігура 6B, довга стрілка) у зрілій волоті від рослин, одержаних з конструкцією 3, що містить елемент чтс-міРНК (Фігура 6B). Антитіло позитивного контролю (антитіло до альфа-тубуліну) характеризувалося сигналом пилку в зрілій волоті від рослин, одержаних з конструкцією 4 або конструкцією 3. Дані для негативних контролів характеризувалися очікуваною відсутністю сигналу. Дані для стандартного нетрансгенного контролю характеризувалися очікуваною відсутністю сигналу від забарвлення антитілом до CP4-EPSPS і позитивним сигналом при забарвленні з антитілом до альфа-тубуліну. Ці дані вказують на те, що в пилку або не трансклюються, або трансклюються всього декілька транскриптів з касети трансформації, що містить елемент чтс-міРНК, однак транскрипт був трансльований у вегетативну тканину філаменту. Втрата експресії білка CP4-EPSPS у пилку корелює зі спостережуваною й специфічною для волоті чутливістю до гліфосату в рослин, одержаних з конструкції 3.

Приклад 5

Цей приклад ілюструє польове дослідження трансгенної рослини на предмет чоловічої фертильності або стерильності. У польових умовах було досліджено тринадцять підтверджених унікальних явищ трансгенних рослин R1-R3, одержаних способом трансформації касетою

експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міПНК (конструкція 3), на предмет ефективності касети експресії. У перший рік тринадцять явищ були досліджені при розташуванні на одному полі. У другий рік вісім явищ були досліджені при розташуванні в чотирьох місцях на полі. У третій рік чотири явища були досліджені при розташуванні в чотирьох місцях на полі. Протягом трьох років польових досліджень середній показник чоловічої фертильності (ПЧФ) для явищ, одержаних з конструкції 3, приблизно дорівнював або був нижчим ніж ПЧФ 2, що вважається промисловим стандартом чоловічої стерильності.

Дані для однорічних польових досліджень ефективності представлені на Фігурі 8 із середнім показником ПЧФ, одержаним за трьох різних режимів обробки гліфосатом розпиленням, представлених на графіку (Фігура 8А) для NK603 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза), MON87427 (CP4-EPSPS трансгенна кукурудза з індукованою гліфосатом чоловічою стерильністю) і двох явищ із конструкції 3. Фотографії волотей рослин, вирощених під час даного окремого польового дослідження ефективності, ілюструють фертильну волоть під час обробки рослин розпиленням гліфосатом 0,75 фунта/акр тільки на стадії V3 (Фігура 8В); і стерильну волоть (відсутність або мінімальне випинання пиляків) на рослинах, оброблених гліфосатом розпиленням 0,75 фунта/акр на стадії V3, потім 0,75 фунта/акр на стадії V8, після чого 0,75 фунта/акр на стадії V10 (Фігура 8С). Для такого польового дослідження режими розпилення були наступними: обробка 1 складалася з 0,75 фунта/акр гліфосату на стадії V3 (боротьба з бур'янами); обробка 2 складалася з 0,75 фунта/акр гліфосату на стадії V3 (боротьба з бур'янами), потім 0,75 фунта/акр на стадії V8, потім 0,75 фунта/акр на стадії V10; обробка 3 складалася з 0,75 фунта/акр гліфосату на стадії V3 (боротьба з бур'янами), потім 1,25 фунта/акр на стадії V8, потім 1,25 фунта/акр на стадії V10. Останні дві обробки (тобто на стадіях V8 і V10) позначаються як обробки для одержання стерильності. Ці результати вказують, що тільки з обробкою гліфосатом розпиленням 1 для боротьби з бур'янами всі рослини (NK603, MON87427 і явища конструкції 3) мали чоловічу фертильність. При обробці гліфосатом розпиленням 2 для одержання стерильності рослини NK603 мали ПЧФ=5, MON87427 були стерильними із ПЧФ=2, і явища 2 і 3 конструкції 3 мали часткову чоловічу фертильність із ПЧФ<3. При обробці гліфосатом розпиленням 3 для одержання стерильності рослини NK603 мали ПЧФ=5, MON87427 мали чоловічу стерильність із ПЧФ<2, і явища 2 і 3 конструкції 3 мали чоловічу стерильність із ПЧФ близько або нижче значення 2.

Незважаючи на те, що середнє значення ПЧФ було приблизно або на рівні 2, випинання пиляків відзначалося в явищах конструкції 3 при обробці гліфосатом при S90+3 і S90+6 (Фігура 9). Для таких даних чотири окремі явища конструкції 3 були зіставлені з рослинами MON87427 і NK603 при двох режимах обробки розпиленням гліфосатом: обробка 2 складалася з 1,5 фунта/акр гліфосату на стадіях V2/V3 (боротьба з бур'янами), потім 0,75 фунта/акр гліфосату на стадії одиниць ступеню росту (ОСР) 875 (~V8), потім 0,75 фунта/акр гліфосату на стадії ОСР 1025 (~V10), і обробка 3 складалася з 1,5 фунта/акр гліфосату на стадіях V2/V3 (боротьба з бур'янами), потім 1,25 фунта/акр гліфосату на стадії ОСР 875 (~V8), потім 1,25 фунта/акр гліфосату на стадії ОСР 1025 (~V10). Кількість рослин на ділянку (68-74 рослини/ділянку), що демонструють випинання пиляків, була підрахована при S90, S90+3 і S90+6, при цьому S90 є днем, коли 90 % рослин у полі викинули рильця; S90+3 є 3 днем після S90; і S90+6 є 6 днем після S90. Як це продемонстровано на Фігурі 9, при S90 відзначалося 70(±15) рослин NK603 на ділянку з випинанням пиляків при обох режимах обробки гліфосатом. На відміну від цього, для MON87427 і чотирьох явищ конструкції 3 відзначалося 1(±12) рослина на ділянку з випинанням пиляків при S90 для обох режимів обробки гліфосатом. При S90+3 і S90+6 відзначалося від 30(±12) до 70(±12) рослин на ділянку для чотирьох явищ конструкції 3 з випинанням пиляків за будь-якого режиму обробки гліфосатом, що приблизно є тим самим, що й для NK603. Випинання пиляків для явища MON87427 залишалося на рівні S90 для часових точок S90+3 і S90+6 і для кожного режиму обробки гліфосатом. Будь-яка рослина з ≥1 пиляком, що випнув, була розрахована як позитивна на предмет випинання пиляків. Таке пізнє випинання пиляків, тобто S90+3 і S90+6, виникає під час розвитку кукурудзи, коли відзначається максимальна висота росту волоті й існує значна відстань для забезпечення машинного зрізу волоті з мінімальним ушкодженням двох верхніх листів рослини кукурудзи, забезпечуючи, таким чином, мінімальний вплив на вихід інбриду. Крім того, випинання пиляків на стадії S90+3 або пізніше вважається як таке, що має незначний вплив на чистоту насіння.

Аналіз життєздатності пилку проводили для визначення того, чи є низький рівень (при цьому стабільне випинання пиляків, спостережуване від S90+3 до S90+6) індикатором потенційної пізньої чоловічої фертильності. Фігури 10А і 10В відображають приклад пізнього випинання пиляків у волоті при явищі розпилення за наявності стерильності й конструкції 3. Квадрат на Фігурі 10А є ділянкою, збільшеною на Фігурі 10В. Приклад пізнього випинання пиляка обведений

кільцем на Фігурі 10В. Для визначення життєздатності пилку пилкок був зібраний від пізніх пиляків, що випнулися, і забарвлений способом Alexander, Фігура 10С. Пилкок також був зібраний від таких, що не піддавались обробці розпиленням явищ конструкції 3 того самого дня й забарвлений як порівняння способом Alexander, Фігура 10D. Результати такого забарвлення згідно з Alexander показують тільки нежиттєздатний пилкок (напівпрозорий блакитний колір, неправильна форма пилкових зерен) від пізно виламуваних пиляків, підданих обробці розпиленням явищ конструкції 3 (Фігура 10С). Повністю життєздатний пилкок виявився непрозорим, темно-фіолетовим й сферичним при забарвленні згідно з Alexander (Фігура 10D). Крім забарвлення пилку, зібраного від індивідуально виділених пізно виламуваних пиляків, мішки для запилення були поміщені на деякі піддані обробці розпиленням явища конструкції 3 для визначення осипання пилку. Будь-якого помітного осипання пилку в такі мішки для запилення не було визначено, що не дозволило одержати будь-якого насіння при використанні для перехресного запилення качанів. Цей результат вказує на відсутність осипання пилку від пізніх пиляків, що випнулися, або на те, що будь-який опалий пилкок є нежиттєздатним.

У цілому ці дані вказують на те, що, незважаючи на низький рівень випинання пиляків при обробці розпиленням для одержання стерильності для явищ конструкції 3, такі пиляки, що випнулися, не скидали життєздатний пилкок.

Приклад 6

Цей приклад відображає польові дослідження трансгенних рослин, що визначали врожайність. Рослини конструкції 3 R2 були досліджені на предмет інбредного й гібридного врожаю. Для інбредного врожаю рослини R2 конструкції 3 були досліджені в чотирьох різних польових місцях на предмет урожайності, вегетативної толерантності до обробки гліфосатом і чоловічої стерильності при обробці гліфосатом. Для таких польових досліджень чотири явища конструкції 3 були висаджені на ділянки в кількості 68-74 рослини/ділянку. Обробка розпиленням була наступною: обробка 1 складалася з 1,5 фунта/акр гліфосату на стадії V3 (боротьба з бур'янами); обробка 2 складалася з 1,5 фунта/акр гліфосату на стадії V3, потім 0,75 фунта/акр на стадії V8, потім 0,75 фунта/акр на стадії V11; обробка 3 складалася з 1,5 фунта/акр гліфосату на стадії V3, потім 1,25 фунта/акр на стадії V8, потім 1,25 фунта/акр на стадії V11. Як це можна побачити на Фігурі 11, явища конструкції 3 за всіх трьох режимів обробки гліфосатом володіли хорошою вегетативною толерантністю (білі смуги), як це виміряно за висотою рослини, і хорошим інбредним урожаєм (чорні смуги), як це виміряно в бушелях/акр. Ці ж самі явища володіли повною чоловічою фертильністю при режимі обробки гліфосатом для контролю бур'янів (обробка 1), але мали чоловічу стерильність із показником ПЧФ, що дорівнював або становив менше 2 (сірі смуги) при режимах обробки гліфосатом 2 або 3. Горизонтальні смуги на Фігурі 11 вказують промисловий стандарт стерильності, ПЧФ 2. NK603 представлено для порівняння. Вимірювання врожайності інбредного насіння для явищ конструкції 3 і NK603 з обробкою гліфосатом розпиленням представлені в Таблиці 4, де MST = % вологості насіння, TWT = натурна маса (показник щільності, звичайно у фунтах на бушель) і S50D є кількістю днів до 50 % викиду рилець із качанів на ділянці. Була відсутня значна різниця (вр), виміряна для врожайності при будь-яких із чотирьох явищ конструкції 3, досліджуваних при обробці гліфосатом 2 або 3 у порівнянні з контролем NK603.

Таблиця 4:

Вимірювання врожайності інбредних зерен

Явища	Порівняння режимів обробки 2 і 3 з режимом 1		
	MST	TWT	S50D
cNK603	вр	вр	вр
Явище 1	вр	вр	вр
Явище 2	вр	вр	вр
Явище 4	вр	вр	вр
Явище 3	вр	вр	вр

Для врожайності гібридного зерна F1 явища R3 конструкції 3 були досліджені в чотирьох польових місцях. Для таких польових досліджень гібридного врожаю нетрансгенні жіночі інбредні рослини (Null), лінія MON87427, і три явища конструкції 3, всі з однаковою генетичною основою, були перехресно запилені чоловічим тестером MON810/MON88017 для одержання гібридного насіння F1. Гібридне насіння F1, одержане від кожного з таких схрещувань, було висіяне на стандартних ділянках у кількості 68-74 рослин/ділянку. Обробка розпиленням

складалася з обробки 1 без розпилення гліфосатом; обробки 2-2,25 фунта/акр гліфосату на стадії V4, потім 2,25 фунта/акр на стадії V7; обробки 3-2,25 фунта/акр гліфосату на стадії V4, потім 2,25 фунта/акр на стадії V7, потім 2,25 фунта/акр на стадії V10. Рослини F1 були відкрито запилені для одержання зерна F2, що є врожаєм, вимірюваним у бушелях/акр. Всі три явища

5 конструкції 3 мали еквівалентну врожайність гібридних зерен F1 за всіх режимів обробки гліфосатом при порівнянні з контрольними схрещуваннями NullxMON810/MON88017 і MON87427xMON810/MON88017 (Фігура 12).

Приклад 7

Даний приклад ілюструє відновлення чоловічої фертильності в гібридних рослинах F1. Гібридні рослини F1, одержані від схрещування явищ конструкції 3, як жіночий партнер були досліджені на предмет чоловічої фертильності. Були проведені три різні схрещування гібридів F1: нетрансгенна жіноча рослина x MON88017 чоловіча рослина; MON87427 жіноча рослина x MON88017 чоловіча рослина; і явище конструкції 3 жіноча рослина x MON88017 чоловіча рослина. Гібридне насіння F1 було зібране від кожного з таких трьох схрещувань, висіяне в полі й оброблене розпиленням гліфосатом 1,125 фунта/акр на стадії V4, потім 1,125 фунта/акр на стадії V10. Чоловічу фертильність в F1 оцінювали за показником чоловічої фертильності (ПЧФ) і за визначенням життєздатності пилку під час забарвлення згідно з Alexander. Для кожного з таких схрещувань ПЧФ гібридних рослин F1 становив 5 або відзначалася повна фертильність. Забарвлення життєздатного пилку згідно з Alexander виявило 50 % життєздатного пилку, виробленого гібридом F1 при кожному схрещуванні, як і очікувалося (Фігура 13). Ці дані вказують, що чоловіча фертильність може бути функціонально відновлена в гібридних рослинах F1, одержаних із трансгенних рослин з індукованою гліфосатом чоловічою стерильністю, трансформованих касетою експресії CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК.

Приклад 8

Даний приклад ілюструє варіантну й химерну конструкцію елемента чтс-міРНК. Окремі чтс-міРНК були маповані на елемент чтс-міРНК, як це представлено на Фігурі 3; вісь X вказує на розташування нуклеотидів у напрямку від 5" до 3" зліва направо вгорі й справа наліво вниз, і вісь Y вказує на відносну численність чтс-міРНК, вказану у вигляді транскриптів на чверть мільйона послідовностей (tpq). Чтс-міРНК також були неоднорідно розподілені серед елемента чтс-міРНК (вісь X).

Використовуючи дану інформацію, були одержані варіанти елемента чтс-міРНК і/або химерні варіанти, одержані з використанням одного або більше елементів чтс-міРНК, для вмісту більшої (або меншої) кількості всіх послідовностей чтс-міРНК (необов'язково або альтернативно одну або більше послідовностей чтс-міРНК додають або видаляють), що приведе до більшого (або меншого) сайленсингу функціонально зв'язаної кодувочої білок послідовності. Такі варіанти або химерні елементи чтс-міРНК придатні для підвищення або зниження вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини.

Приклади варіантів і химер елементів чтс-міРНК були побудовані з використанням фрагментів SEQ ID NO: 87. Перший варіант (SEQ ID NO: 88) був побудований з використанням фрагмента з 104 нуклеотидів від 5'-кінця SEQ ID NO: 87. Другий варіант (SEQ ID NO: 89) був побудований з використанням фрагмента з 80 нуклеотидів від 3'-половини SEQ ID NO: 87. Химерні елементи чтс-міРНК були побудовані шляхом з'єднання одного фрагмента (SEQ ID NO: 88) з іншим фрагментом (SEQ ID NO: 89) з утворенням нових химерних елементів чтс-міРНК (SEQ ID NO: 90 і SEQ ID NO: 91). Додаткові химерні елементи чтс-міРНК були побудовані шляхом з'єднання трьох окремих чтс-міРНК, що містяться в SEQ ID NO: 87: перша химера (SEQ ID NO: 92) була побудована з'єднанням послідовностей чтс-міРНК SEQ ID NO: 26, 27 і 8; друга химера (SEQ ID NO: 93) була побудована з'єднанням послідовностей чтс-міРНК SEQ ID NO: 10, 33 і 5; третя химера (SEQ ID NO: 94) була побудована з'єднанням послідовностей чтс-міРНК SEQ ID NO: 26, 10 і 33. Такі варіанти й химери можуть бути функціонально зв'язані з послідовностями, що кодують білок, для одержання конструкцій рекомбінантної ДНК (див. Фігуру 14), які можуть бути досліджені в рослинах і рослинних клітинах на предмет вибіркової супресії рекомбінантного білка, що кодується кодувочною білок послідовністю у чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини.

Приклад 9

Даний приклад ілюструє розробку варіантних і химерних елементів чтс-міРНК. Варіантні й химерні елементи чтс-міРНК були розроблені на основі 300-нуклеотидного (нт) елемента чтс-міРНК, що має SEQ ID NO: 81, який подібний 300-нуклеотидним елементам чтс-міРНК, що мають SEQ ID NO: 82 і 87. Висококонсервативною консенсусною послідовністю для елементів чтс-міРНК SEQ ID NO: 81, 82 і 87 є SEQ ID NO: 96. Окремо кожний з них також може бути придатним як елемент чтс-міРНК або як основа для розробки варіантних або химерних

елементів чтс-міРНК, наприклад, шляхом відбору фрагментів елемента чтс-міРНК, ідентифікованих з геномної послідовності або кДНК, таких як фрагментів, що включають щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, і комбінуванням або з'єднанням таких фрагментів.

Були відібрані два фрагменти в SEQ ID NO: 81; фрагмент А (SEQ ID NO: 97) містив 104 суміжних нуклеотиди від 5" ділянки (положення 1–104) SEQ ID NO: 81, а фрагмент В (SEQ ID NO: 98) містив 80 суміжних нуклеотидів від 3" ділянки (положення 215–294) SEQ ID NO: 81; очевидно, що фрагмент А (SEQ ID NO: 97) або фрагмент В (SEQ ID NO: 98) окремо є елементами чтс-міРНК, що містять щонайменше одну послідовність чтс-міРНК. Розташування фрагментів А і В (вказане підкресленим текстом) представлено в наступній повній послідовності SEQ ID NO: 81, яка також указує розташування послідовностей чтс-міРНК (вказане курсивом; елементи, вказані курсивом, мають більше 18 суміжних нуклеотидів і можуть включати більше ніж одну послідовність чтс-міРНК, що перекривається), мапованих для даного елемента чтс-міРНК:

GGACAACAAGCACCTTCTTGCCCTTGCAAGGCCTCCCTTCCCTATGGTAGCCACTTGAGTGGA
15 TGA CTTCA CTTAAAGCTATCGATTCCCTAAGTGCCAGACATAATAGGCTATACATTCTCTCTGGT
GGACA AATGAGTCATTTTGGTTGGTGTGGTAGTCTATTATTGAGTTTGT TTTGGCACCGTACTCC
CATGGAGAGTACAAGACAAACTCTTCACCGTTGTAGTCGTTGATGGTATTGGTGGTGACGACATC
CTTGGTGTGCATGCACTGGTGAGTCACTGTTGTACTCGGCG (SEQ ID NO: 81). Варіантні
елементи чтс-міПНК були розроблені з використанням фрагментів "A" і "B", включаючи елемент
20 чтс-міПНК "A+B" (SEQ ID NO: 99) і елемент чтс-міПНК "B+A" (SEQ ID NO: 100). Химерний
елемент (SEQ ID NO: 101) був розроблений для включення послідовностей чтс-міПНК
(представлене вище курсивом в SEQ ID NO: 81), які були маповані для елемента чтс-міПНК
(SEQ ID NO: 81).

Подібним чином елемент чтс-міРНК із 251 нт у довжину (SEQ ID NO: 102) і елемент чтс-міРНК із 121 нт у довжину (SEQ ID NO: 103, фрагмент SEQ ID NO: 102, тобто безперервний елемент, розташований у положеннях нуклеотидів 47–167 послідовності SEQ ID NO: 102) були ідентифіковані з геномної послідовності кукурудзи (Zm_B73_CR10:Segment{75361491...75361742}) як специфічні для волоті й відповідних чтс-міРНК із молодії волоті (кукурудза LH244, бібліотека 347; окремо ідентифіковані чтс-міРНК у деяких випадках перекривають більшу частину своєї послідовності й варіюють тільки в декількох нуклеотидах; див. Таблицю 5). Ґрунтуючись на SEQ ID NO: 102 і 103, був розроблений химерний елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 104).

Таблиця 5:

Маповані чТС-міРНК в SEQ ID NO: 103

ID у бібліотеці	ID мРНК (специфічний для кожної бібліотеки)	Початок на мапі*	Кінець на мапі*	спіраль	експресія (tpq для lib9, необроблені значення для інших)	SEQ ID NO:	Послідовності (як еквівалентна ДНК)
347	710618	48	72	-1	1	105	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCTA
347	325	49	72	-1	667	106	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	75221	49	72	-1	14,0375	107	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
9	79587	49	70	-1	1,7547	108	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1443964	49	70	-1	1	109	CAAAGCCGCAATACTTAGCCCT
347	1798947	50	72	-1	1	110	ACCAAAGCCGCAATACTTAGCCC
9	993198	51	74	1	5,264	111	GGCTAAGTATTGCGGCTTTGGTAG
346	2511625	56	79	-1	1	112	GACAACTACCAAAGCCGCAATACT
347	1978935	62	84	-1	1	113	GATATGACAACTACCAAAGCCGC
347	955660	63	86	-1	1	114	TAGATATGACAACTACCAAAGCCG
347	1183103	64	84	-1	1	115	GATATGACAACTACCAAAGCC
347	36752	73	96	-1	12	116	ATCAAAAGTTTATGATATGACAACT
347	151532	75	98	1	4	117	TTGTCATATCTAAACTTTTGATAG
347	1372	97	120	-1	197	118	ACGAGTACTCTAACATATAAGACT
347	316040	97	117	-1	2	119	AGTACTCTAACATATAAGACT
347	1310155	98	121	1	1	120	GTCTTATATGTTAGAGTACTCGTT
347	26503	99	122	1	15	121	TCTTATATGTTAGAGTACTCGTTA
347	490490	109	132	-1	2	122	ATCAAAACCCTAACGAGTACTCTA

Таблиця 5:

Маповані чтс-міРНК в SEQ ID NO: 103

ID у бібліотеці	ID мРНК (специфічний для кожної бібліотеки)	Початок на мапі*	Кінець на мапі*	спіраль	експресія (trq для lib9, необроблені значення для інших)	SEQ ID NO:	Послідовності (як еквівалентна ДНК)
347	1125767	114	137	-1	1	123	AGACAATCAAAACCCTAACGAGTA
347	442804	115	138	-1	2	124	GAGACAATCAAAACCCTAACGAGT
347	965720	118	141	-1	1	125	CAGGAGACAATCAAAACCCTAACG
345	1549424	119	142	-1	1	126	ACAGGAGACAATCAAAACCCTAAC
347	311196	120	143	-1	2	127	CACAGGAGACAATCAAAACCCTAA
347	190	121	144	-1	1018	128	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
346	591709	121	144	-1	2	129	ACACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	363241	121	143	-1	2	130	CACAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	1603891	121	141	-1	1	131	CAGGAGACAATCAAAACCCTA
347	135176	122	144	-1	4	132	ACACAGGAGACAATCAAAACCCT
347	48157	123	146	1	9	133	GGGTTTTGATTGTCTCCTGTGTAT
347	1866298	123	144	-1	1	134	ACACAGGAGACAATCAAAACCC
347	1707358	124	147	-1	1	135	AATACACAGGAGACAATCAAAACC
347	1788406	129	146	1	1	136	TGATTGTCTCCTGTGTAT
347	519539	130	153	1	2	137	GATTGTCTCCTGTGTATTTACCCT
347	383791	133	156	-1	2	138	GAGAGGGTAAATACACAGGAGACA
347	273115	135	158	1	2	139	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCGC
345	1244664	135	157	-1	1	140	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
346	1460995	135	157	-1	1	141	CGAGAGGGTAAATACACAGGAGA
347	697148	135	157	1	1	142	TCTCCTGTGTATTTACCCTCTCG
347	1716970	136	159	1	1	143	CTCCTGTGTATTTACCCTCTCGCA
347	839648	137	157	-1	1	144	CGAGAGGGTAAATACACAGGA
347	8578	145	168	-1	38	145	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
9	519321	145	168	-1	8,7734	146	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	423280	145	167	-1	2	147	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAAT
347	377787	146	168	-1	2	148	TACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA
9	444803	146	167	-1	1,7547	149	ACAATAAGTGCGAGAGGGTAAA

*розташування нуклеотиду в SEQ ID NO: 103

Приклад 10

Даний приклад ілюструє вектори й клітини трансгенної рослини, тканини й рослини, що містять конструкції рекомбінантної ДНК, які включають кодуючу білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, і елемент чтс-міРНК, функціонально зв'язаний з кодуючою білок послідовністю.

Вектор трансформації рослини, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК, використовують для опосередкованої *Agrobacterium* трансформації клітин кукурудзи. Такий вектор трансформації включає ДНК для опосередкованого *Agrobacterium* трансферу Т-ДНК, касети експресії (промотора, функціонально зв'язаного з послідовністю ДНК, що представляє інтерес), касети вибіркового маркера експресії (для зручного відбору трансформованих клітин кукурудзи або рослин) і ДНК для підтримки вектора в *E. coli* (наприклад, походження послідовності реплікації від *E. coli*). В одному варіанті втілення винаходу вектор трансформації включає касету експресії, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК, фланковану правою й лівою граничними послідовностями від *Agrobacterium*, при цьому конструкція рекомбінантної ДНК включає трансген толерантності до гербіцидів CR-AGRtu.aroA-CP4.nat (представлений як SEQ ID NO: 95) у якості послідовності ДНК, що кодує рекомбінантний білок. Трансген толерантності до гербіцидів CR-AGRtu.aroA-CP4.nat функціонально зв'язаний із чтс-міРНК, представленою як SEQ ID NO: 81 у якості послідовності ДНК, що кодує елемент чтс-міРНК.

Вектори трансформації для експресії різних конструкцій рекомбінантної ДНК побудовані шляхом вставки полінуклеотиду, що включає елемент чтс-міРНК (наприклад, SEQ ID NO: 57-94

або 97-104), у вектор трансформації рослини. Елемент чтс-міРНК вставлений у прилягаючому положенні до послідовності ДНК, що кодує рекомбінантний білок, або в 3'-нетрансльовану ділянку послідовності ДНК, що кодує рекомбінантний білок. Такі вектори трансформації рослини придатні для одержання трансгенних рослин, у яких може бути індукована чоловіча

5 стерильність застосуванням гербіциду.

Способи трансформації рослин добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, рослини кукурудзи трансформованої лінії вирощують у теплиці й качани збирають, коли ембріон досягає в довжину від 1,5 до 2,0 мм. Поверхню качанів стерилізують 80 % етанолом, потім висушують на повітрі. Незрілі ембріони видаляють із окремих ядер стерилізованих качанів. Перед інокуляцією клітин кукурудзи окремі культури *Agrobacterium*, кожна з яких містить вектор трансформації для експресії щонайменше однієї конструкції рекомбінантної ДНК згідно з даним винаходом, вирощують протягом ночі за кімнатної температури. Клітинні культури незрілих ембріонів кукурудзи інокулюють *Agrobacterium*, інкубують за кімнатної температури з *Agrobacterium* протягом 5-20 хвилин, співкультивують з *Agrobacterium* протягом 1-3 днів за

15 температури 23 градуси за Цельсієм в темряві, переносять у вибіркоче середовище й культивують протягом приблизно 2 тижнів для розвитку ембріонального калюсу. Ембріональний калюс переносять у живильне середовище, що містить 100 мг/л паромоміцину і субкультивують протягом інтервалу, що становить приблизно два тижні. Множинні явища трансформованих клітин рослин відновлюються через 6-8 тижнів після початку відбору.

20 Трансгенні рослини кукурудзи регенерують із калюсу клітини трансгенної рослини для кожного із множинних трансгенних явищ, що виникли в результаті трансформації й добору, шляхом приміщення трансгенного калюсу кожного явища в середовище для ініціації розвитку відростків і коренів у проростках, які переносять у горшковий ґрунт для початкового росту в камері росту за температури 26 градусів за Цельсієм, потім росту на ослоні з водяним пилом

25 перед пересаджуванням у горщики, де рослини виростають до зрілості. Регенеровані рослини самозапилюються. Перше покоління насіння ("R1") збирають. Рослини від насіння R1 (рослини "R2") використовують для одержання потомства.

Приклад 11

Даний приклад ілюструє способи вибору послідовностей чтс-міРНК і елементів чтс-міРНК для використання в конструкціях рекомбінантної ДНК, що включають кодує білок послідовність, що кодує рекомбінантний білок, і елемент чтс-міРНК, функціонально зв'язаний з кодує білок послідовністю.

Один спосіб верифікації ефективності елемента чтс-міРНК для вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини включає використання аналізу протопласта, при цьому протопласти рослинних клітин співтрансформують: (а) вектором, що містить конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодує білок послідовність і елемент чтс-міРНК, функціонально зв'язаний з кодує білок послідовністю; і (б) РНК, що мають послідовності міРНК, відповідні до елемента(ів) чтс-міРНК (або, з іншого боку, послідовності(ям) чтс-міРНК)), при цьому рівень експресії рекомбінантного білка очікується обернено пропорційним ступеню, до якого елемент чтс-міРНК розщеплюється РНК.

Це ілюструється наступним необмежуваним прикладом. Аналіз проводили на двох послідовностях чтс-міРНК (відповідних двом міРНК, які сильно експресуються в волоті кукурудзи). Коротко, протопласт листу кукурудзи співтрансформують за допомогою: (а) плазмиди (3 мікрограми/320000 клітин), що містить конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодує білок послідовність що кодує рекомбінантний білок (CP4-EPSPS, SEQ ID NO: 95), і елемент чтс-міРНК (SEQ ID NO: 81), і (б) першої дсРНК, у якій перший ланцюг має послідовність SEQ ID NO: 150 у напрямку від 5' до 3', а другий ланцюг є комплементарним першому ланцюгу, і другої дсРНК, у якій перший ланцюг має послідовність SEQ ID NO: 151 у напрямку від 5' до 3', а другий ланцюг є комплементарним першому ланцюгу. ДсРНК (від Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa) були протестовані в кількості 0, 5, 25 або 50 нанограмів/320000 клітин, при цьому загальна кількість РНК, використовувана в кожному аналізі співтрансформації, була скоректована з "наповнюючою" РНК, що складається з будь-якої з мікроРНК395 (у якості зрілого 21-мер, представленого як дсРНК) або тРНК дріжджів у кількості до 50 нанограмів/320000

55 клітин. Рівень білка CP4-EPSPS визначали за допомогою ІФА й використовували для оцінки здатності досліджених дсРНК супресувати експресію рекомбінантного білка. Результати наводяться в Таблиці 6.

Таблиця 6:

Рівень білка CP4-EPSPS

Досліджена дсРНК	дсРНК (нг)	Наповнююча РНК (нг)	Білок CP4-EPSPS (нг/мг всього білка)
Немає (контроль)	0	50	317
SEQ ID NO: 150	5	45	294
	25	25	167*
	50	0	114*
SEQ ID NO: 151	5	45	315
	25	25	223*
	50	0	91*

*статистична значущість у порівнянні з контролем

Кожна із дсРНК (SEQ ID NO: 150 і 151) сильно супресувала експресію CP4-EPSPS (вказана за зниженням накопиченням білка CP4-EPSPS) при співтрансформації із плазмідом, що містить конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодуючу білок CP4-EPSPS послідовність і елемент чтс-міРНК. Спостережувана супресія CP4-EPSPS була залежною від дози від кількості дсРНК і незалежною від типу наповнюючої РНК. Супресія CP4-EPSPS не відзначалася в контрольних зразках, співтрансформованих наповнюючою РНК замість досліджуваних дсРНК.

Приклад 12

Даний приклад ілюструє конструкції рекомбінантної ДНК, вектори й трансформовані рослини згідно з винаходом. Вектори й способи трансформації, подібні описаним у Прикладі 10, використовувалися для одержання стабільно трансформованих рослин кукурудзи, що містять у своєму геномі конструкцію рекомбінантної ДНК, що включає кодуючу білок послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає елемент чтс-міРНК. Досліджували шість комбінацій схема конструкції/елемент чтс-міРНК (див. Таблицю 7). Рослини були двічі оброблені розпиленням (на стадіях V5 і V8) 0,75 фунта/акр/A Roundup WeatherMAX®. Результати надаються в Таблиці 7. Для кожної комбінації схема конструкції/елемент чтс-міРНК приблизно 20 рослин було необробленими для порівняння з обробленими гліфосатом рослинами. У необроблених рослин був зібраний пилкок і визначена хороша чоловіча фертильність (дані не вказані). Рослини кукурудзи, трансформовані конструкцією за схемою В, мали більш виражену чоловічу стерильність ніж рослини кукурудзи, трансформовані конструкцією за схемою А. Схеми конструкцій (від 5" до 3" зліва направо) були представлені: конструкція А є промотор А/інтрон А/транзитний пептид А/CP4-EPSPS (SEQ ID NO: 95)/елемент чтс-міРНК/3'UTR, і конструкція В є промотор В/інтрон В/транзитний пептид В/CP4-EPSPS/елемент чтс-міРНК/3'UTR. Як вказано нижче, "нв" позначає "не виміряне". Шкала показника чоловічої фертильності (ПЧФ) є наступною: 5 = утворення пиляка нормальне, об'єм пилку такий самий, як і на необроблених ділянках, пилкок може обсіпатися або не обсіпатися; 4 = утворення пиляка нормальне на 50 %, але осипання пилку слабке або не осипається достатня кількість пилку; 3 = волоті виглядають нормальними, але відзначається спорадичне випинання пиляків (>10 пиляків на волоть), осипається незначна кількість пилку або пилкок не осипається; 2,5 = пилкок не осипається, кількість пиляків значно зменшена (<10 пиляків на волоть) або з'являються занадто пізно (1 тиждень) відносно закінчення утворення рилець; 2 = пилкок не обсіпається, пиляків немає або вони з'являються занадто пізно (1 тиждень) відносно закінчення утворення рилець; і 1 = пилкок не обсіпається, волоті мають аномально стоншений фенотип або утворення пиляків уповільнене на два або більше тижнів після утворення рилець. S90 представлена тоді, коли 90 % рослин мають рилеця, готові для запилення, і S90+3 представлено 3 днями після S90.

Таблиця 7:

Дані розпилення схема конструкції/елемент чтс-міРНК

Схема конструкції*	SEQ ID NO елемента чтс-міРНК:	Веgetативне ушкодження	Обпадання пилку за S90	ПЧФ за S90 до S90+2	% аномального пилку
A	97	Немає	Немає	5	100 %
A	97	Немає	Немає	2,5	100 %
A	97	Немає	Немає	2	100 %
A	98	Немає	Є	5	нв
A	98	Немає	Немає	3	60 %
A	98	Немає	Немає	5	70 %
A	98	Немає	Немає	2,5	100 %
A	104	Немає	Немає	4	нв
A	104	Немає	Немає	2	50 %
A	104	Немає	Немає	2,5	100 %
B	101	Немає	Немає	2	нв
B	101	Немає	Немає	2,5	100 %
B	101	Немає	Немає	4	нв
B	101	Немає	Немає	2	нв
B	101	Немає	Немає	2,5	нв
B	101	Немає	Немає	2,5	100 %
B	101	Немає	Немає	2	100 %
B	101	Немає	Немає	2,5	100 %
B	101	Немає	Немає	2,2	нв
B	101	Немає	Немає	3	20 %
B	101	Немає	Немає	2	100 %
B	97	Немає	Немає	2,5	нв
B	97	Немає	Немає	2	100 %
B	97	Немає	Немає	2,5	100 %
B	97	Немає	Немає	4	100 %
B	97	Немає	Немає	2	нв
B	98	Немає	Немає	2	100 %
B	98	Немає	Немає	2,5	100 %
B	98	Немає	Немає	2	=нв
B	98	Немає	Немає	2,5	=нв

Всі описані тут матеріали й способи і представлена формула винаходу можуть бути одержані й використовуватися без зайвих експериментів відповідно до представлених вище інструкцій. Представлені вище приклади включені для демонстрації варіантів втілення винаходу. Фахівцям у даній галузі стане очевидним, що описані в прикладах способи, що представляють способи винахідників, широко використовуються на практиці й, отже, можуть розглядатися як невід'ємні кращі варіанти втілення винаходу на практиці. Однак фахівцям у даній галузі, у світлі даного винаходу, повинна бути очевидна можливість внесення чисельних змін в описані специфічні варіанти втілення винаходу, а також одержання подібних або схожих результатів без відхилення від сутності й обсягу винаходу. Всі такі подібні заміни й модифікації, очевидні для фахівців у даній галузі, вважаються включеними в сутність, обсяг і концепцію винаходу, як це визначено прикладеною формулою винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Monsanto Technology LLC
Huang, Jintai
Ivashuta, Sergey
Qi, Youlin
Wiggins, Barbara E
Zhang, Yuanji

	<120> СПОСОБИ Й КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ВИБІРКОВОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ БІЛКА	
5	<130> MONS:294W0	
	<140> Невідомо	
	<141> 2012-06-29	
10	<150> US 61/504,102	
	<151> 2011-07-01	
	<160> 151	
15	<170> Патентна версія 3.5	
	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
20	<213> Zea mays	
	<400> 1	
	catgcactgg tgagtcactg ttg	23
25	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
30	<400> 2	
	acagtgactc accagtgcac	20
35	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
40	<400> 3	
	ggcctccctt ccctatggta gcc	23
45	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
50	<400> 4	
	aagctattga ttccctaagt gcc	24
55	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 5	
	aggcctccct tccctatg	18

	<210> 6		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
5	<213> Zea mays		
	<400> 6		
	acagtgactc accagtgcac gcac		24
10			
	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
15			
	<400> 7		
	catccgcca ttcttcagtc		20
20			
	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
25			
	<400> 8		
	acagtgactc accagtgcac g		21
30			
	<210> 9		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
35			
	<400> 9		
	aaggcaagaa ggtgcttggt gtc		23
40			
	<210> 10		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
45			
	<400> 10		
	gcatgcactg gtgagtcact gttg		24
50			
	<210> 11		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
55			
	<400> 11		
	atcaacgact acaacggtga a		21
	<210> 12		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		

	<400> 12 gcatgcactg gtgagtcact gtt	23
5	<210> 13 <211> 25 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 13 caaggcaaga aggtgcttgt tgtcc	25
15	<210> 14 <211> 22 <212> ДНК <213> Zea mays	
20	<400> 14 catcaacgac tacaacggtg aa	22
25	<210> 15 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 15 accatcaacg actacaacgg tgaa	24
35	<210> 16 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 16 aggcctccct tccctatggt agcc	24
45	<210> 17 <211> 22 <212> ДНК <213> Zea mays	
50	<400> 17 gcatgcactg gtgagtcact gt	22
55	<210> 18 <211> 19 <212> ДНК <213> Zea mays	
	<400> 18 aaggcctccc ttccctatg	19

	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
5	<400> 19	
	caaggcaaga aggtgctt	18
10	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
15	<400> 20	
	aaggcaagaa ggtgcttggt gtcc	24
20	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
25	<400> 21	
	aaggcctccc ttccctatgg tagcc	25
30	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
35	<400> 22	
	ctattgattc cctaagtgcc a	21
40	<210> 23	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
45	<400> 23	
	aagaaggtgc ttgttgtc	18
50	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
55	<400> 24	
	aacaagcacc ttcttgccctt gca	23
55	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	

	<400> 25 caaggcaaga aggtgcttgt tgt	23
5	<210> 26 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 26 caaggcaaga aggtgcttgt tgtc	24
15	<210> 27 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
20	<400> 27 accaaggatg tcgtcaccac caat	24
25	<210> 28 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 28 caacaagcac cttcttgccct tgca	24
35	<210> 29 <211> 21 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 29 accatcaacg actacaacgg t	21
45	<210> 30 <211> 21 <212> ДНК <213> Zea mays	
50	<400> 30 aagctatcga ttccctaagt g	21
55	<210> 31 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
	<400> 31 agctatcgat tccctaagt cca	23
	<210> 32	

	<211> 25		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
5	<400> 32		
	aaagctatcg attccctaag tgcca		25
	<210> 33		
10	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 33		
15	aagctatcga ttccctaagt gcca		24
	<210> 34		
	<211> 24		
20	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 34		
25	aggcaagaaa gtgcttggtg tcgg		24
	<210> 35		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
30	<213> Zea mays		
	<400> 35		
	tggctaattg ttgccaccag agag		24
35	<210> 36		
	<211> 25		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
40	<400> 36		
	aagctattga ttcccgtaag tgcca		25
45	<210> 37		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
50	<400> 37		
	caaggcaaga aagtgcttgt tgtc		24
	<210> 38		
55	<211> 22		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 38		

	aagctatcga ttcactaagt gc	22
5	<210> 39 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 39 caaggcaaga aggttcttgt tgtc	24
15	<210> 40 <211> 25 <212> ДНК <213> Zea mays	
20	<400> 40 caaggcgaag aaggtgcttg ttgtc	25
25	<210> 41 <211> 20 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 41 caaggatttc atcaccacca	20
35	<210> 42 <211> 18 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 42 cgaagaaggt gcttggtg	18
45	<210> 43 <211> 22 <212> ДНК <213> Zea mays	
50	<400> 43 aagctatcga ttccctaagt gc	22
55	<210> 44 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
	<400> 44 ttaatgtcat tgccgccgag tac	23
	<210> 45 <211> 23	

	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
5	<400> 45 aatgactcat tgttgccacc aga		23
	<210> 46		
	<211> 20		
10	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 46 tgggtggtgat gaaatccttg		20
15			
	<210> 47		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
20	<213> Zea mays		
	<400> 47 gcatgcactg gtgattcact gttg		24
25			
	<210> 48		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
30	<400> 48 aatgactcat tgttgccacc agag		24
35	<210> 49		
	<211> 25		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
40	<400> 49 caaggcaaga aaggtgcttg ttgtc		25
45	<210> 50		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 50 aaggtaagaa ggtgcttggt gtc		23
50			
	<210> 51		
	<211> 25		
55	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 51 aggcctccct tccctactgg tagcc		25

	<210>	52	
	<211>	24	
5	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
	<400>	52	
10	caaggcaaga agctgcttgt tgtc		24
	<210>	53	
	<211>	24	
	<212>	ДНК	
15	<213>	Zea mays	
	<400>	53	
	caaggcaaga agttgcttgt tgtc		24
20			
	<210>	54	
	<211>	19	
	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
25			
	<400>	54	
	catcaacgac tacaatggt		19
30			
	<210>	55	
	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
35			
	<400>	55	
	gcacggctcgt tgtctggggt tc		22
40			
	<210>	56	
	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
45			
	<400>	56	
	tagactagct aagtgtctgt gc		22
50			
	<210>	57	
	<211>	451	
	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
55			
	<400>	57	
	atccgctgca ggcagccaag caaagatctt tgggacaggt atatagctaa gatctttggc		60
	gcttgctaga attttcggaa tagccagctg gctcgggcat ctccttgcca agatctttgg		120
	gacaggtgac caccagttgc atgggtgaat cccagacgac gaccacatct gatgagacat		180

	acacaacgtc gtcgtctttg tcatcattct acctgacagt tgagaagacg acgaccacaa	240
	ctgatcagat gtacacagcg ccaccgtctt taccatcatt gtaccttaca cccaaggaga	300
5	cgctgaacaa tgggtgtcatt tcgataagca actacaacac tgatgaagca ccttcgccgc	360
	aacctgtatc gttggtatct gatgagatag acatttctga atcatcacct ccgccatctc	420
10	cgtcgccaca tacagtggat gagatggaca a	451
	<210> 58	
	<211> 441	
	<212> ДНК	
15	<213> Zea mays	
	<400> 58	
	ctgtttgcta gaattttcgg aataggctgg ctccggcatc tccttgccaa gatctttggg	60
20	gcaggtgacg agttgcacgg tggatgaatcc cagacgacgg ccacatctga tgagacatac	120
	acaatgccgt cgtctttgtc atcattctac ctgacagttg agaagacgat gaccacatat	180
25	gatgagatct acacagtgcc atcgtcttag tcatcattgt acctgacacc cgaggagacg	240
	ccgaacaatg gtgccatttc gataagcaac tacgacactg atgaaccacc ttcgccgcca	300
	catgtatcgt tggatatctga tgagataaac atttctgaat catcacctcc gccatctccg	360
30	tcgccacata cagcggatga gatggacaac tctgaggcgt caccttcacc tttgtctcac	420
	accatagaac tccaaatgtt t	441
35	<210> 59	
	<211> 321	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
40	<400> 59	
	aataaaccgg ctccaacacc tacttgcaaa gatatttggg accggtgacc agctgcacga	60
	cgatgaatcc tacaagacga ccatgtaata cacagtgtcg tcctcttcgt tctactactc	120
45	aacagagcag tcgccgacca ataacgaatg gagtattatc tctgtccttc accttacacc	180
	atattcacac catagaactg caaatgtccg aggtaccaac taacatcggg acctttggca	240
50	tgaatgatga atgaagagga cggcgaatgac tatattagag aatgggaaag tgaataactg	300
	ctcgatctgt cactaacaat t	321
55	<210> 60	
	<211> 501	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 60	

	aaactcaaac tctatgattt atatgttttc gctaacctac taattgattt atactcttca	60
	cactaattta gattattaac caagagaact agctatcacc atttctaaat ccactatttt	120
5	tttactttga aaactcaatg ttgaaaagag atcaacagag acgacatcta tggcaactta	180
	tgtgttcttc tgcagatgta atacgtgctc acgttcggca cccaaatgct cgtagaccat	240
	ggtcaagggtg agggacgacg tgaaccttcc catctatcag ggtgacaaca tcaatggcaa	300
10	gacatttgac gagaagagtc atgtttggac ccatacaaga tgctttcgga gtacacccaa	360
	tccgctgtca tgctcaacct actctacgcc ttctccaccg gtggctactc aacattcagc	420
15	gcgtcacgca gtggaaactt gatgtcaccg aacatagcaa gtaggggtgac atgtgaaata	480
	aaatctttcca ttcactgagt t	501
20	<210> 61 <211> 241 <212> ДНК <213> Zea mays	
25	<400> 61 agcagacacc acttcacaag caggatggca atgaactctg gttgttgttt tgccagggtc	60
	ccagccctat gaaagcgcgt tacgtttacg cagtgccttt tctactggcc aacttgtgtg	120
30	cgtggctcat gcgagagaac cgtatatcat attacttagc gcagcggggc aacgcccgt	180
	gtcacggtga ccagggtgtg ctgcggctc agagcgtgct gacaattagc cagactttct	240
35	g	241
	<210> 62 <211> 401 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 62 tcaccaaact tggaaataga ccggttcata taacaacat caaaatcaa tatcttgatt	60
45	cgttatcttc tttccttacc atgcaaacac taaatacatg tagacctacg acaaaggccc	120
	ccacattttt ctaggcaacc aaaatccgtg acatatacag ggatacgaag tgtcttcggt	180
	tatatacagt gataacttct atgctggctg gttgagacgg acacgcttga cacatggtgc	240
50	ttccactcat ccacgactcc atagtcaactg tcaggctcggg atcgagccat ctagacccat	300
	gagaagcaag gatgcgaagg actcttcaac aattatttaa ttggacttgc tagatttagt	360
55	tacttatatt caatcccagt tgctctctat attaatttgg t	401
	<210> 63 <211> 466	

<212> ДНК
<213> Zea mays

<400> 63
5 tattttctagc cacacgggtca cgtttggacg accaataata ggcttgcaac ctttcaaatt 60
gtgtccatca gcttcccaac gtgcatatcg ccatcctctg cttcgtgtcc catgtcacca 120
ccccactct tcctctttac atgcaatgca aataaagcag atccaacgtg gatgagggtg 180
10 aatcggatgt tgagggtgggg tctgctaaat ctcccaaata atcaaattggc ggctgcaaca 240
acacgaggga atgtcattgg tcgatgagtt ggaggcgtca aatgcagata aagctacaac 300
15 ttccatgtgg aggatgactg cgacgttgtg gcagactcat ccactacagt gagagtctag 360
gaaagcatga agccgattgt ggacatcgat gtcggtgtca aggacttata gatgtcatgt 420
tgggagagca accatggcac gatagttaag gcgcaagggt atctgt 466
20

<210> 64
<211> 381
<212> ДНК
25 <213> Zea mays

<400> 64
gcaaaatgta taggaactag ccaccatcac cacttttcta gatttggttt caggttatct 60
30 atgatgttct tgctccaatt tgggtgtccgc aagagtcac ctttccttgc ttcaaacaag 120
tgcaaatgtt tagcagattt acaatttttt atttgcttct ataaccatag ggaatctgct 180
ctcataataa gtgatccaga aattcaataa ttattacgag agtcgtcgtg ttagcatggg 240
35 attattaagg ggctctgcaa aaaatgaggc tgagcttctg gatctcgaga aaaatataaa 300
ggcttatcaa tatatgtata gtatgtatgc ttgtcaccat ttggagtcac ataattttcg 360
40 ccaggtgtat gtgtggttgt c 381

<210> 65
<211> 441
45 <212> ДНК
<213> Zea mays

<400> 65
50 cagaagacga cgtaccatat ggcttagtac caagcagaaa gaatgccaaa ggcctagggc 60
aaattaaggg tggcaattac tagagccccg gccaggacgt gtctctgttc ttggaagcc 120
cgaagaacgc cctctcaacg gcctgattcc cgttctaacg ctgcatcaga ttaacatcca 180
55 cagcacggga tgcagcggca ccatgggatg tgagcaaagc gtgtaaccaa ggcgaagaca 240
actcgaacac cattgtccgg catcctcatc aaagaacaaa gagctagcta gcgagcagcg 300
aggatatcaca gtgcaaatgc aatacagacg gacatctgaa tcggccacgt tgcattgatg 360

	tatcggacga cggggagacg agaagcacta tttagaacag ggacagacac catagcttct	420
	agctctgtat cgcttgggag c	441
5		
	<210> 66	
	<211> 451	
	<212> ДНК	
10	<213> Zea mays	
	<400> 66	
	tctgcaggca gccaaagctag cgaagcacgg acgacaataa tgaactgtgt cttctcctgc	60
15	cagggcctca gccctatgaa cgtcagatac ctgtatgcgg ctatcttcct cgtggcgaac	120
	ctgtctgcgt ggttcgacg agagaacacc gtatcgtatt acctgaagca gcgactcagc	180
	ggcgctgtc agggtgaccg gggttgtctc gcggctgaaa gcgtgctcgt ggcgagccat	240
20	gccttctttg tatcctacag tttaaacaac attgtttttt atctaacaat tttctgtatt	300
	atgattgctc tgaccttaac aaatcgcca gctctttttt atggccatgt tcttctccac	360
25	tgtacgcacc ggcaaggatga atgagttgag aaattcatgg cactgcgggt ggtggccagt	420
	gaagattgcc ctcttcatgg tctgttctct c	451
30		
	<210> 67	
	<211> 511	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
35	<400> 67	
	ggagtgaacc aaatgagctt atgttcttat atgactacta gctagaagtt agagcctaga	60
	tgatggctgc ttctgttggc gtgaaagctc gagtgtcctt aaatggctcgt cgtattagct	120
40	gatacgacat ctacccgatg caatagataa tattgtttac acgcgtgagt ccaaaattgt	180
	tggctttggg tcggagcagt taatgcgaga agtgtatttt atcacttctg agtgcaacct	240
	tttttttatt atttttccga gcttctgcct cttgcatatg ttgtagattc tcgccgagaa	300
45	gggagtagta gtattacctg atatctatgc taattcaggt ggtgtggtcg ttagctactt	360
	taattgagtg gggtcagaac attcaagggt tcatgtgggc cgaggagaaa gtggacgatg	420
50	aactagaaaa ggacatgagc agtgcttttc aacacatgaa ggccatgtgc aaatctttgg	480
	tgctgccgaa gtgtgtcgtg acattggaat t	511
55		
	<210> 68	
	<211> 351	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	

	<400> 68	
	tatgaccatg ttcttctcca ctgtacgcac cggcaagggtg aatgagttga gaaattcatg	60
5	gcactccggg tggtagccag tgaagattgc cctcttcatg gtctgttctc tcatctctgt	120
	cttggtcca tcctggtgga tccaaatcta tggtatgaaa cattgtagag tcagaagacg	180
	acgtatcata tgggtatggc tttttccatt tcgccttcgc ggctggctcc atgtacgtca	240
10	ggatggtgtt tgcggtctgg gacacacatc atacaatgaa gcaatggagc gtggatattg	300
	ggtggatgag cacgtgggtt catatcgcca atgaggctct cgtagtagta t	351
15	<210> 69	
	<211> 431	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
20	<400> 69	
	taggactgta cttgtgttgg actctaggct taagctatgt atatatatgc tagcattagg	60
	acctcatatt ataataagta ttatttcaag acgaccatcc gattagtgtg gctacgtcga	120
25	acgcccgcgc catgattgca acattctagt ggccaatgtt gttgacttca ggcaaatcac	180
	ggtggagatg ctctctcgac tagagctcgg gacgacaggg ctcaagacct tcacgcgcga	240
	ggtgatggac gtgctcatcg acaagcccaa gcatgtgaca ctggcaggt ggaaaagacg	300
30	ttcttttggc cccacaggt ctagtacgtc gttgttgatg tctatgagtt ctacaaggtt	360
	ggttgtctgt tgttcatgac agagcgacg cacagctgat ggaaggacgc cgccgtctat	420
35	ttgcatggag a	431
40	<210> 70	
	<211> 461	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
45	<400> 70	
	gtcggaggaa gctgctgaaa aaggtaact ttatctatgg gactaagctt caattcggca	60
	tcctcccatc cttcagtcctt aatgtcgttg ccgccgagta caacagtgac tcaccagtcg	120
	atgcacacca aggatgtcgt caccaccaat accatcaacg actacaacgg tgaagagttt	180
50	gtcttctact ctccatggga gtacggtgcc aaaacaaact caataataga ctaccacacc	240
	aacaaaaatg actcattgtt gccaccagag agaatgtata gcctattatg tctggcactt	300
	agggaatcga tagctttaag gtgaagtcac cactcaagt ggctaccata gggaaggag	360
55	gccttgcaag gcaagaagggt gcttgtgtgc cgttgtgata acaccttttc aacaataatg	420
	ttcataccta cattgttcgt tcgtcgttgg gtaaaaacat t	461

	<210>	71	
	<211>	361	
	<212>	ДНК	
5	<213>	Zea mays	
	<400>	71	
	tgaggatgaa	gtaggtgttg cagttgctgg agtacccaaa cctgacgtag ctggagacga	60
10	cgctcaagac	gatcgaggcc ttgctgccga tcgtctttgc tagggagaca cgacacttga	120
	atgagtgctt	cgtcgatacc gtcattgggtc gtgccttcct cttctagggt gacaactaag	180
	ctgaaagctt	caaagagttc aacatcgaca acatatgtgg caccatctgc gtcctcctac	240
15	agatatttgt	cgtgctcacg ttcgggtaccc aaatgcccgt gaaccgtggt caagataccc	300
	catctacacc	atgagcagag acaacacgca aaatgagatt cttttcgctt ttgatcaaac	360
20	a		361
	<210>	72	
	<211>	481	
25	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
	<400>	72	
	tttacaattg	gatgttggtg aaagctgaaa ttacgtagag gtgtcctagt aatggaattt	60
30	caaagtttgg	taaaaaacta ggagtcaaca tagtaaatga aaatatattat gttggaatat	120
	attatataca	tggacacagt gatccaaccg ctatgtagtg tggtttgaac tacacaacta	180
35	aagtagctaa	aagaatgcaa gatagggttg cgcaaaccgg cttggtggca ctttgttgggt	240
	ctccatgata	caagatatatac tttctgggta ctgcgaaaca ctttctccta caatcaactt	300
	gagatatcga	gggcaagtgg gccgttcaaa gatgtattaa tgttgatatt ggtgccagtc	360
40	gatctactga	tggtagcgat gatgaaagtg ttgacacctt tcgtcttcag gagcaacccc	420
	gttcgacaag	aaaatcgttg attctaaga tctcaacgac gtttaccctg actacaacac	480
45	a		481
	<210>	73	
	<211>	451	
50	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
	<400>	73	
	agtgatgaca	agttcagaag tgtgaggagg cgtaggaaaa atacttggtt cacttcaaga	60
55	acatatgatg	gcaagaggcg caactctaca gatatttaca acagacgcat gcatgtattc	120
	tacaatgaac	taactacgta tattagggtt ctccaataat gtcgacctca agatttcact	180

	acaatctttt cctagcgagg tcctccgggg gcgagatcca ggtccaacca agggctctct	240
	acgcaatcac ggacaatcca ccaccctacc gtggacgatc cggtgaccta ttgcggacag	300
5	accaatgacc tatcgtgaac cattcaacac ctcgccaagc cgaacctaag gttttgctca	360
	tcatgaggag accatagggc tcattgctat ttgaccctaa taagacttca tcatagaggt	420
10	ggaattcaag accatattgc aggtagtgtt a	451
	<210> 74	
	<211> 361	
	<212> ДНК	
15	<213> Zea mays	
	<400> 74	
	tcagaggaag ctgctgaaaa aggttaactt tatctctggg gctaagcttc aattcggcat	60
20	ctgcccattc ttcagtctta atgtcattgc tgccgagtac aacagtgact caccgggtgca	120
	tgcacaccaa ggatgtcatc actaccagca ccatcaacga ctacaatagt gaagagttag	180
	tcttctactc tacacgggag taccacacca accaaaatgg ctcatgttg ccaccaaaca	240
25	gaatgtatag cctattatgt ctggcactta gggactcgat agctttaagg gcaagttatg	300
	cactcaagtg actatcatag ggaagggagg ccttccaagg aaagaagggtg cttgttgtcg	360
30	g	361
	<210> 75	
	<211> 371	
35	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 75	
40	ggagtgaacc aaatgagctt atgttcctat atgactatta gctagaagtt agagcctaga	60
	tgatggctgc ttctgttggc gtgaaagctc gagtgtcctt aaatggctgt tgtattagct	120
	gatacgacat cgacccgatg caatagataa tattgtttac acgcgcgagt ccaaaattgt	180
45	tggctttgag tcggagcagt taacacgaga agtgtatatt atcacttctg agtgcaacct	240
	tttttttatt atttttccga gcttctgcct cttgcatatg ttgtagattc tcgtcgagaa	300
	gggagtagta gtattacctg atatctatgc taattcaggt ggtgtggtcg ttagctactt	360
50	taattgagtg a	371
	<210> 76	
55	<211> 191	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 76	

	catgagcagt gcttttcaac acatgaaggc catgtgcaaa tctttgtg	60
	tgccgtgaca ttggaattgc gggcttagaa aagcaagctc attagatttc tgaaaaaaca	120
5	ttaggagtta ttagattggt agcatttttt taagatttaa aattttatag aagtcacat	180
	tttcgtttat t	191
10	<210> 77 <211> 241 <212> ДНК <213> Zea mays	
15	<400> 77 tgcaggccgc caagcaaadc acggatgacg atgaactgtg tcttctcctg ccactgtcag	60
	ggcctcagcc ctatgaatgt cagatacctg tatgcggcta tcttctcctg ggcgaacctg	120
20	tctgcgtggt tcgcacgaga gaacaccgta tcatatcacc tgaagcagcg actcagcggg	180
	tgtcagggtg accgggggtt tctcgcggtt gaaagcgtgc tcgtggcaag ccatgctctt	240
	t	241
25		
	<210> 78 <211> 431 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 78 tctttggaac agatgaccag ctgcacggcg atgaatccca tacgacgacc gtgcatggtg	60
35	atgaagccga gacgacgacc gtgcatggtg atcaagccga gacgacgacc gtgcatgttg	120
	atgaagccga gacgacgacc gtgcatggtg atcaagccga gacgacgact gtgcatggtg	180
	atgaatccga gactacgacc gtgcatggtg atgaatccga gacgacgacc gtgcatggtg	240
40	atgaatcaca gacgacgaac acgcatgtca catcgccgtc ctctttgtat cacacagcgt	300
	cgccctcttc gctctactac tccccgagc atcaccgacc aataacattg accatcaacc	360
45	tcctccgtcg ccgcccgtt caccgtcctc ccctcacacc atagaactgc aaatgtccga	420
	gataccaaat a	431
50	<210> 79 <211> 471 <212> ДНК <213> Zea mays	
55	<400> 79 acttggtgct agaattttcg gaataggctt gtcggacat ctccttgcca agatcttcgg	60
	gacaggtgac cgattgcata gtggtgaatc ccagacgacg accacacatc tgatgagatg	120

	tacacaacgt cgtcgtcttt ttcattcattc taccgaacaa ctgaggagac gatgaccaca	180
	tccgatgaga tgtacacaac accgtcatct ttgtcatcat tgtacctaac acccgaggag	240
5	acgctgaaca atgatgccat ttcgataagc aactacgaca ctgatgatcc accttcgccg	300
	ccacctgtat cgttggtatc tgatgacgta gacatttctg aaccatcacc tccgccatct	360
	ccgccgccac atagagtgga tgagatggac aactctgagg catcctttgt cccacaccat	420
10	atagctccaa atgtttgagg taccaattac ctcaggcaat aatgaggagg a	471
	<210> 80	
15	<211> 298	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 80	
20	cgacaacaag cactttcttg ccttggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactcgagtg	60
	cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
	tctctggttg caacaattag ccattttggt tgggtgtggta ctctattatt gagttttttg	180
25	gcacgatact tctgtgtaga gtagaagaca aactcttcac cattgtagtc gttgatgggtg	240
	ctggtggtga tgaaatcctt gctgtgcatg caccggggaa tcactattgt attcggca	298
30	<210> 81	
	<211> 300	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
35	<400> 81	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
40	tctctggttg caacaatgag tcattttggt tgggtgtggta gtctattatt gagtttgttt	180
	tggcaccgta ctcccatgga gagtacaaga caaactcttc accgtttag tagttgatgg	240
45	tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactgtt gtactcggcg	300
	<210> 82	
	<211> 300	
50	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 82	
55	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
	tctctggttg caacaatgag tcattttggt tgggtgtggta gtctattatt gagtttgttt	180

	tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgtttag tagcttgatgg	240
	tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactgggtg agtcactgtt gtactcggcg	300
5	<210> 83 <211> 298 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 83 cgacaacgag cactttcttg ccttgggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactctagtg	60
	cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
15	tctctagtggt caacaattag ccattttggt tgggtgtggta ctctattatt gagttttttg	180
	gcacgggtact tccttgtaga gtagaagaca aactcttcac cattgtagtc gttgatgggg	240
20	ctggtgggtga tgaatcctt ggtgtggatg caccggggaa tcactattgt actcggcg	298
	<210> 84 <211> 297 <212> ДНК <213> Zea mays	
25	<400> 84 cgacaacgag cactttcttg ccttgggaagg cctcccttcc ctattgtagt cactcgagtg	60
30	cataacttgc ccttaaagct atcgattcac taagtgccag acaaaatagg ctatacattc	120
	tctctagtggt caacaattag ccattttggt tgggtgtggta ctctattatt gagttttttg	180
35	cacgggtactt cctttagtag tagaagacaa actcttcacc attgtagtcg ttgatggggc	240
	tagtgggtgat gaaatcctt gtgtggatgc accggggaat cactattgta ctcggcg	297
40	<210> 85 <211> 592 <212> ДНК <213> Zea mays	
45	<400> 85 gagaccagga ttgttccaac ttcatataga ccatagttag tgacagcatt aaagtttgag	60
	atgttgaatg ctaaaaaaca attagtcaca atattgttta gataaaaatt tgagatgtcg	120
50	gaggaagctg ctgaaaaagg ttaactttat ctatgggact aagcttcaat tcggcatccg	180
	cccattcttc agtcttaatg tcgttgccgc cgagtacaac agtgactcac cagtgcatgc	240
	acaccaagga tgtcgtcacc accaatacca tcaacgacta caacggtgaa gagtttgtct	300
55	tctactctcc atggggagtac ggtgccaaaa caaactcaat aatagactac cacaccaacc	360
	aaaatggctc attgttgcca ccagagagaa tgtatagcct attatgtctg gcacttaggg	420

	aatcgatagc ttttaaggtga agtcatccac tcaagtggct accataggga agggaggcct	480
	tgcaaggcaa gaaggtgctt gttgtccgtt gtgataacac cttttcaaca ataatgttca	540
5	tacctacatt gtttgttcgt cgttgggtaa aaacattgct atatctattt at	592
	<210> 86	
	<211> 338	
10	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 86	
15	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct attgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
	tctctggttg caacaatgag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttt	180
20	tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgtttag tagcttgatgg	240
	tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactgggtg agtcactgtt gtactcggcg	300
25	gcaacgacat taagactgaa gaatgggcgg atgccgaa	338
	<210> 87	
	<211> 300	
	<212> ДНК	
30	<213> Zea mays	
	<400> 87	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
35	gatgacttca ccttaaagct attgattccc taagtgccag acataatagg ctatacattc	120
	tctctggttg caacaatgag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttt	180
	tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgtttag tagcttgatgg	240
40	tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactgggtg agtcactgtt gtactcggcg	300
	<210> 88	
45	<211> 104	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
	<400> 88	
50	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acat	104
55	<210> 89	
	<211> 80	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	

	<400> 89	
	ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatgggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca	60
5	ctggtgagtc actgtttgtac	80
	<210> 90	
	<211> 184	
	<212> ДНК	
10	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Елемент синтетичної ДНК	
15	<400> 90	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acatctcttc accgtttag	120
20	tcgttgatgg tattgggtggg gacgacatcc ttggtgtgca tgcactgggtg agtcactgtt	180
	gtac	184
25	<210> 91	
	<211> 184	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> Елемент синтетичної ДНК	
	<400> 91	
	ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatgggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca	60
35	ctggtgagtc actgtttgtac ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc	120
	ctatggtagc cacttgagtg gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag	180
40	acat	184
	<210> 92	
	<211> 80	
45	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Елемент синтетичної ДНК	
50	<400> 92	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcagta ttggtggtga cgacatcctt ggtgtgcatg	60
	cactggtgag tcactgttgt	80
55		
	<210> 93	
	<211> 76	
	<212> ДНК	

	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Елемент синтетичної ДНК	
5	<400> 93	
	tacaacagtg actcaccagt gcatgctctg gcacttaggg aatcgatagc tttaccatag	60
10	ggaagggagg ccttgc	76
	<210> 94	
	<211> 81	
	<212> ДНК	
15	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Елемент синтетичної ДНК	
20	<400> 94	
	ggасаасааg caccttcttg ccttgcatac aacagtгact caccagtгca tgctctggca	60
	cttagggaat cgatagcttt a	81
25	<210> 95	
	<211> 1368	
	<212> ДНК	
	<213> Agrobacterium sp. штам CP4	
30	<400> 95	
	atgcttcatg gagcttcatc taggccagct actgccagga agtctagcgg gctcagtggc	60
	accgtgcgca tccctggcga taaaagtatt tcacacagga gcttcatggt cggaggactt	120
35	gctagtggag agacgagaat cactggtttg cttgagggcg aagatgttat caacaccggt	180
	aaggcgatgc aagcaatggg tgccagaatc cgaaaagagg gcgatacgtg gatcatcgac	240
40	ggtgttggtgta acggaggatt gctcgctccc gaagcgccac ttgactttgg gaacgcagct	300
	acgggggtgcc gtcttactat gggactggta ggcgtgtatg actttgactc taccttcatc	360
	ggtgacgcga gcctcactaa gagaccaatg ggacgagtgc tgaatcccct gagggagatg	420
45	ggtgtccagg tgaaatctga ggatggtgat cgtcttccgg ttactctgcg aggccccaag	480
	acccccacgc caatcacgta cagggttccg atggcgtcag cacaggtcaa gtcagcggtg	540
50	ctcctggcgg gcctcaacac acctggaatc acaaccgtga ttgaacccat catgactaga	600
	gaccacacgg agaagatggt gcagggtttc ggcgctaатc taacggtcga aaccgacgcc	660
	gacggcgtga ggacaatccg cttggagggc agaggtaaac tgactggcca agtcatcgat	720
55	gtgcctggag atccctcgtc cacagcgttt cccctcgtag ctgcgttgct cgtccctgga	780
	tctgatgtga cgatcctgaa tgtcctcatg aatccaacta gaaccggcct catcctcaca	840

	ttgcaggaga tgggtgctga catcgaggtt atcaatccta ggttggcagg tggagaggat	900
	gtggccgatc tgcgcgtgcg ttctagtaca ctcaaaggcg tgaccgtccc tgaggatcgc	960
5	gctccatcca tgatcgacga gtacccatt ctgccgttg ctgctgcgtt tgccgagggc	1020
	gcaactgtaa tgaacggcct tgaggagttg agggttaagg agagtgcag gctgtccgcg	1080
10	gtggcgaatg gcctgaagct aaacggcgtg gactgacgac aaggtgaaac gtcccttgta	1140
	gtccgtggtc gccagacgg gaaggggttg gggaatgctt cgggagctgc tgtggcgacg	1200
	caccttgatc atagaatcgc catgtcatct ctggtgatgg gacttgtctc cgagaatccg	1260
15	gtgaccgttg acgatgctac catgatcgcc acctcctttc ctgagttcat ggacctcatg	1320
	gcaggcttgg gggccaagat cgagctgtct gatactaagg ccgcttga	1368
20	<210> 96 <211> 300 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Елемент синтетичної ДНК	
	<400> 96 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
30	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acataatagg ctatacatc	120
	tctctgggtg caacaatgag tcattttggt tgggtgtggt gtctattatt gagtttgttt	180
35	tggcaccgta ctcccatgga gagtacaaga caaactcttc accgtttagc tcgttgatgg	240
	tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactgtt gtactcggcg	300
40	<210> 97 <211> 104 <212> ДНК <213> Zea mays	
45	<400> 97 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg	60
	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acat	104
50	<210> 98 <211> 80 <212> ДНК <213> Zea mays	
55	<400> 98 ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatggtatt ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca	60
	ctggtgagtc actgttgtac	80

5	<210>	99	
	<211>	184	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
10	<220>		
	<223>	Елемент синтетичної ДНК	
	<400>	99	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg		60
15	gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag acatctcttc accgtttag		120
	tcgttgatgg tattgggtgg gacgacatcc ttgggtgtgca tgcactgggtg agtcactgtt		180
	gtac		184
20	<210>	100	
	<211>	184	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
25	<220>		
	<223>	Елемент синтетичної ДНК	
	<400>	100	
	ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatgggtatt ggtgggtgacg acatccttgg tgtgcatgca		60
30	ctggtgagtc actgttgtac ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc		120
	ctatggtagc cacttgagtg gatgacttca ccttaaagct atcgattccc taagtgccag		180
	acat		184
40	<210>	101	
	<211>	80	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
45	<220>		
	<223>	Елемент синтетичної ДНК	
	<400>	101	
	ggacaacaag caccttcttg ccttgcagta ttgggtgtga cgacatcctt ggtgtgcatg		60
50	cactggtgag tcaactgttgt		80
55	<210>	102	
	<211>	251	
	<212>	ДНК	
	<213>	Zea mays	
	<400>	102	
	gaggaaaccg aaaccacatc acatccatac agtggcgaaa gacacagtag ggctaagtat		60

	tgcggtttg gtagttgtca tatctaaact tttgatagtc ttatatgtta gagtactcgt	120
	tagggttttg attgtctcct gtgtatttac cctctcgac ttattgtaat gggcctggcc	180
5	caactatcga gtgtatcaaa caacgccgcc caaccccact caagggttag ggtttccac	240
	attatatctt c	251
10	<210> 103 <211> 121 <212> ДНК <213> Zea mays	
15	<400> 103 gtagggctaa gtattgcggc tttgtaggtt gtcatatcta aacttttgat agtcttatat	60
	gtagagtac tcgttagggt tttgattgtc tcctgtgtat ttaccctctc gcacttattg	120
20	t	121
	<210> 104 <211> 216 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	
25	<220> <223> Елемент синтетичної ДНК	
30	<400> 104 acacgtggac aacaagcacc ttcttgccct gcagtattgg tggtagacgac atccttggtg	60
	tgcatgcact ggtgagtcac tgttgtagtag ggctaagtat tgcggctttg gtagttgtca	120
35	tatctaaact tttgatagtc ttatatgtta gagtactcgt tagggttttg attgtctcct	180
	gtgtatttac cctctcgac ttattgtcct gcagga	216
40	<210> 105 <211> 25 <212> ДНК <213> Zea mays	
45	<400> 105 accaagccg caatacttag cccta	25
50	<210> 106 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
55	<400> 106 accaagccg caatacttag ccct	24

	<210> 107	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
5	<400> 107	
	accaaagccg caatacttag ccct	24
10	<210> 108	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
15	<400> 108	
	caaagccgca atacttagcc ct	22
20	<210> 109	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
25	<400> 109	
	caaagccgca atacttagcc ct	22
30	<210> 110	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
35	<400> 110	
	accaaagccg caatacttag ccc	23
40	<210> 111	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
45	<400> 111	
	ggctaagtat tgcggctttg gtag	24
50	<210> 112	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	
55	<400> 112	
	gacaactacc aaagccgcaa tact	24
55	<210> 113	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Zea mays	

	<400> 113 gatatgacaa ctaccaaagc cgc	23
5	<210> 114 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 114 tagatatgac aactacaaaa gccg	24
15	<210> 115 <211> 21 <212> ДНК <213> Zea mays	
20	<400> 115 gatatgacaa ctaccaaagc c	21
25	<210> 116 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 116 atcaaaaagtt tagatatgac aact	24
35	<210> 117 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 117 ttgtcatatc taaacttttg atag	24
45	<210> 118 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
50	<400> 118 acgagtactc taacatatataa gact	24
55	<210> 119 <211> 21 <212> ДНК <213> Zea mays	
55	<400> 119 agtactctaa catataagac t	21
	<210> 120	

	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
5	<400> 120		
	gtcttatatg ttagagtact cggt		24
	<210> 121		
10	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 121		
15	tctttatatgt tagagtactc gtta		24
	<210> 122		
	<211> 24		
20	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 122		
25	atcaaaaaccc taacgagtac tcta		24
	<210> 123		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
30	<213> Zea mays		
	<400> 123		
	agacaatcaa aaccctaacg agta		24
35	<210> 124		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
40	<400> 124		
	gagacaatca aaaccctaac gagt		24
45	<210> 125		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
50	<400> 125		
	caggagacaa tcaaaaaccct aacg		24
	<210> 126		
55	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 126		

	acaggagaca atcaaaaccc taac	24
5	<210> 127 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
10	<400> 127 cacaggagac aatcaaaacc ctaa	24
15	<210> 128 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
20	<400> 128 acacaggaga caatcaaaac ccta	24
25	<210> 129 <211> 24 <212> ДНК <213> Zea mays	
30	<400> 129 acacaggaga caatcaaaac ccta	24
35	<210> 130 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
40	<400> 130 cacaggagac aatcaaaacc cta	23
45	<210> 131 <211> 21 <212> ДНК <213> Zea mays	
50	<400> 131 caggagacaa tcaaaaccct a	21
55	<210> 132 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
	<400> 132 acacaggaga caatcaaaac cct	23
	<210> 133 <211> 24	

	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 133		
5	gggttttgat tgtctcctgt gtat		24
	<210> 134		
	<211> 22		
10	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 134		
15	acacaggaga caatcaaaac cc		22
	<210> 135		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
20	<213> Zea mays		
	<400> 135		
	aatacacagg agacaatcaa aacc		24
25			
	<210> 136		
	<211> 18		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
30			
	<400> 136		
	tgattgtctc ctgtgtat		18
35			
	<210> 137		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
40			
	<400> 137		
	gattgtctcc tgtgtattta ccct		24
45			
	<210> 138		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 138		
50	gagagggtaa atacacagga gaca		24
	<210> 139		
	<211> 24		
55	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 139		
	tctcctgtgt atttaccctc tcgc		24

	<210> 140		
	<211> 23		
5	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 140		
10	cgagagggtgta aatacacagg aga		23
	<210> 141		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
15	<213> Zea mays		
	<400> 141		
	cgagagggtgta aatacacagg aga		23
20			
	<210> 142		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
25			
	<400> 142		
	tctcctgtgtg atttaccctc tcg		23
30			
	<210> 143		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
35			
	<400> 143		
	ctcctgtgta tttaccctct cgca		24
40			
	<210> 144		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 144		
45	cgagagggtgta aatacacagg a		21
50			
	<210> 145		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Zea mays		
	<400> 145		
55	tacaataagt gcgagagggt aaat		24
	<210> 146		
	<211> 24		
	<212> ДНК		

	<213> Zea mays	
5	<400> 146 tacaataagt gcgagagggt aaat	24
10	<210> 147 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
15	<400> 147 acaataagtg cgagagggt aat	23
20	<210> 148 <211> 23 <212> ДНК <213> Zea mays	
25	<400> 148 tacaataagt gcgagagggt aaa	23
30	<210> 149 <211> 22 <212> ДНК <213> Zea mays	
35	<400> 149 acaataagtg cgagagggt aa	22
40	<210> 150 <211> 21 <212> РНК <213> Штучна послідовність	
45	<220> <223> Елемент синтетичної РНК	
50	<400> 150 асагугасис ассагугсаи g	21
55	<210> 151 <211> 24 <212> РНК <213> Штучна послідовність	
	<220> <223> Елемент синтетичної РНК	
	<400> 151 сааггсаага аггугсиуги угис	24

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Конструкція рекомбінантної ДНК, яка включає кодуючу білок CP4-EPSPS послідовність, функціонально зв'язану з послідовністю ДНК, що включає специфічний для чоловічої тканини елемент мі-РНК (чтс-міРНК), де вказаний елемент чтс-міРНК є гетерологічним відносно вказаної кодуючої білок CP4-EPSPS послідовності, і де
 - а) елемент чтс-міРНК містить щонайменше одну чтс-міРНК послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149; або
 - б) елемент чтс-міРНК вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104; або
 - в) елемент чтс-міРНК вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104, де введені 1-3 помилки спарювання; або
 - г) елемент чтс-міРНК містить щонайменше 18 суміжних нуклеотидів елемента чтс-міРНК, вибраного з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104, де експресія білка CP4-EPSPS, що кодується CP4-EPSPS кодуючою послідовністю, пригнічена в чоловічих репродуктивних тканинах трансгенної рослини, яка експресує вказану конструкцію рекомбінантної ДНК.
2. Конструкція рекомбінантної ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказаний елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149.
3. Конструкція рекомбінантної ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказаний чтс-міРНК елемент вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104.
4. Конструкція рекомбінантної ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказаний елемент чтс-міРНК вибраний із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104, де введені 1-3 помилки спарювання.
5. Конструкція рекомбінантної ДНК за п. 1, де вказаний елемент чтс-міРНК містить щонайменше 18 суміжних нуклеотидів елемента чтс-міРНК, вибраного з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104.
6. Спосіб одержання конструкції рекомбінантної ДНК, який включає функціональне зв'язування елемента чтс-міРНК з кодуючою білок CP4-EPSPS послідовністю, де вказаний елемент чтс-міРНК є гетерологічним відносно вказаної кодуючої білок CP4-EPSPS послідовності, і де
 - а) елемент чтс-міРНК містить щонайменше одну чтс-міРНК послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149; або
 - б) елемент чтс-міРНК вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104; або
 - в) елемент чтс-міРНК вибраний з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104, де введені 1-3 помилки спарювання; або
 - г) елемент чтс-міРНК містить щонайменше 18 суміжних нуклеотидів елемента чтс-міРНК, вибраного з групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104, де експресія білка CP4-EPSPS, що кодується CP4-EPSPS кодуючою послідовністю, пригнічена в чоловічих репродуктивних тканинах трансгенної рослини, яка експресує вказану конструкцію рекомбінантної ДНК.
7. Трансгенна рослина кукурудзи, яка має у своєму геномі конструкцію рекомбінантної ДНК за п. 1.
8. Насіння, потомство або частина трансгенної рослини кукурудзи за п. 7, де насіння, потомство або частина рослини містить конструкцію рекомбінантної ДНК.
9. Спосіб вибіркової супресії експресії рекомбінантного білка в чоловічій репродуктивній тканині трансгенної рослини кукурудзи, який включає експресію у вказаній трансгенній рослині кукурудзи конструкції рекомбінантної ДНК за п. 1.
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що вказана чоловіча репродуктивна тканина є волоттю рослини кукурудзи.
11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що вказаний елемент чтс-міРНК включає щонайменше три послідовності чтс-міРНК.
12. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що вказаний елемент чтс-міРНК включає щонайменше одну послідовність чтс-міРНК, вибрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 1-56 і 105-149.
13. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що вказаний елемент чтс-міРНК вибирають із групи, яка складається з SEQ ID NO: 57-94 і 96-104.
14. Спосіб індукування чоловічої стерильності в трансгенній рослині кукурудзи, який включає застосування ефективної кількості гліфосату до трансгенної рослини кукурудзи, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК за п. 1, при цьому вказане застосування гліфосату

проводиться під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини вказаної трансгенної рослини кукурудзи, індуючи тим самим чоловічу стерильність у вказаній трансгенній рослині кукурудзи.

15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що вказане застосування гліфосату запобігає щонайменше осипанню пилку або випинанню пиляка.

5 16. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що вказаний розвиток чоловічої репродуктивної тканини є стадією, вибраною із групи, яка складається зі стадії розвитку рослини кукурудзи V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 і V14.

17. Спосіб одержання гібридного насіння, що включає:

10 а) застосування ефективної кількості гліфосату до трансгенної рослини кукурудзи, що включає конструкцію рекомбінантної ДНК за п. 1, при цьому вказане застосування гліфосату проводиться під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини вказаної трансгенної рослини кукурудзи, індуючи тим самим чоловічу стерильність у вказаній трансгенній рослині кукурудзи;

б) запліднення вказаної трансгенної рослини кукурудзи пилком другої рослини кукурудзи; і
в) збирання гібридного насіння від вказаної трансгенної рослини кукурудзи.

15 18. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що вказаний гліфосат застосовують під час вказаного розвитку в ефективній дозі від приблизно 0,14 кілограма кислоти в еквіваленті на гектар до приблизно 8,967 кілограма кислоти в еквіваленті на гектар.

19. Гібридне насіння, зібране від трансгенної рослини кукурудзи із чоловічою стерильністю, яке було запліднене пилком іншої рослини кукурудзи, при цьому вказана трансгенна рослина

20 кукурудзи із чоловічою стерильністю включає конструкцію рекомбінантної ДНК за п. 1 і індювана як така, що набула чоловічої стерильності шляхом застосування ефективної кількості гліфосату під час розвитку чоловічої репродуктивної тканини вказаної трансгенної рослини кукурудзи.

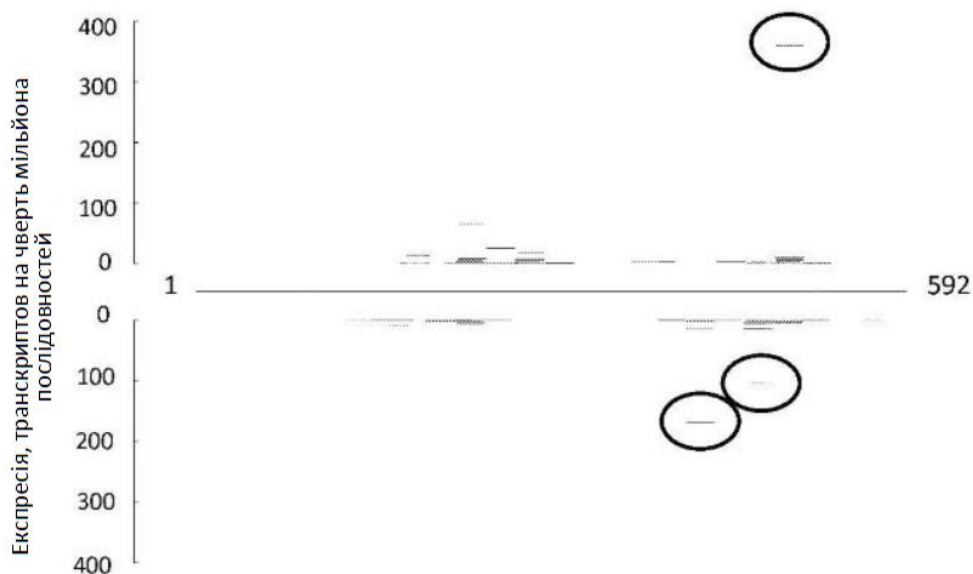
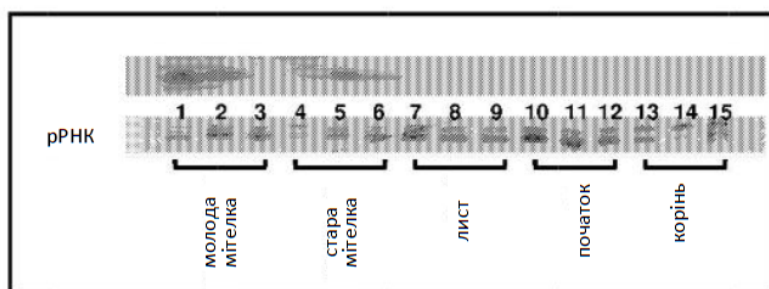


Fig. 1



№ зразка	назва НМ зразка
1	91DUA6 молова мітелка
2	01DKD2 молова мітелка
3	LH244 молова мітелка
4	91DUA6 стара мітелка
5	01DKD2 стара мітелка
6	LH244 стара мітелка
7	91DUA6 Leaf
8	01DKD2 лист
9	LH244 лист
10	91DUA6 початок
11	01DKD2 початок
12	LH244 початок
13	91DUA6 корінь
14	01DKD2 корінь
15	LH244 корінь

Fig.2

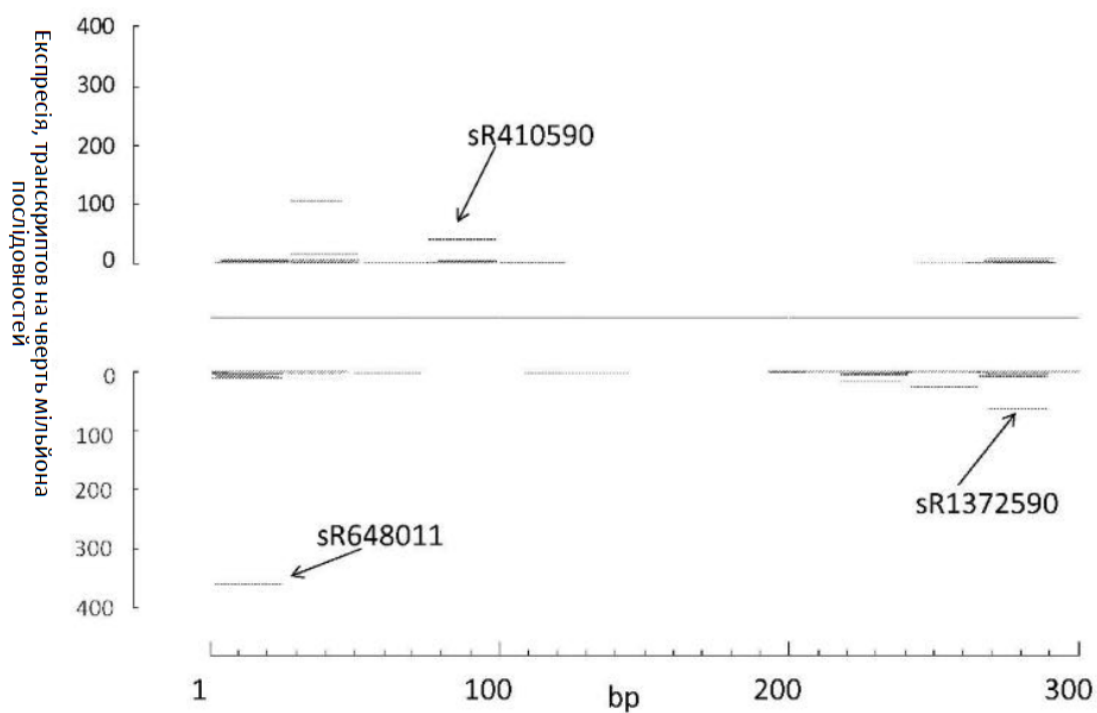
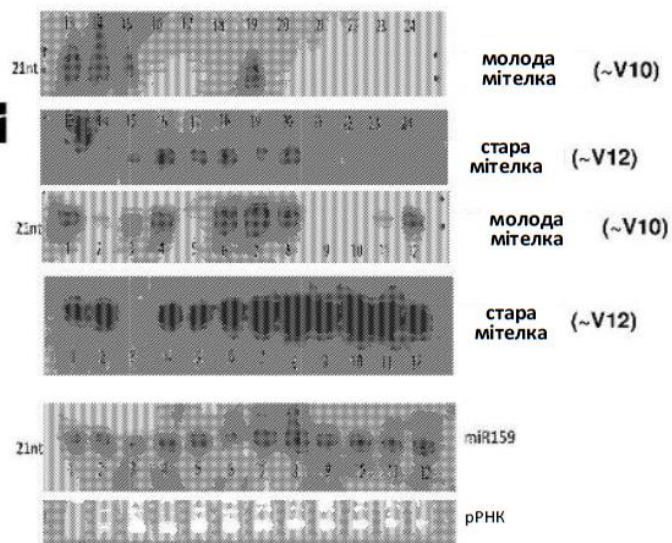
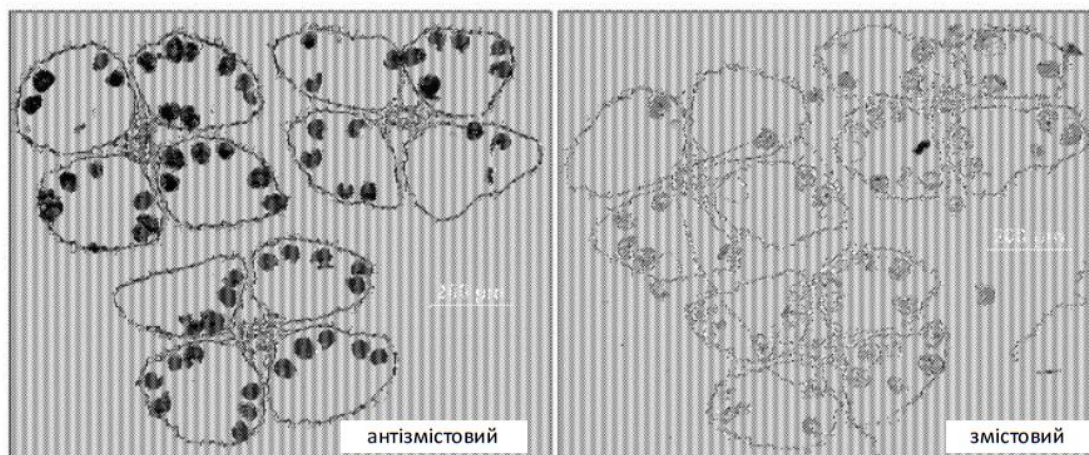


Fig.3

ряд	інбрид
1	C3SUD402
2	HIQA202
3	BEBE788
4	BIQA207
5	DIDA404
6	5DA92
7	DIDA406
8	80DJD5
9	JEDO115
10	FIDA240
11	BIQA347
12	HOQA203
13	91DUA6
14	BIDA345
15	01DKD2
16	DIDA403
17	64DJD1
18	DIQA423
19	BIQA208
20	LH244
21	BIQA208 - лист
22	LH244- лист
23	BIQA208 -поча ток
24	LH244 -поча ток

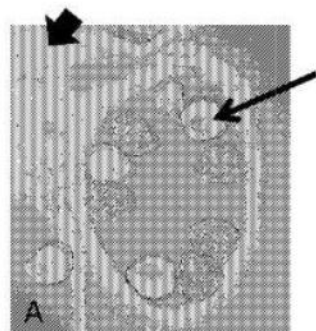


Фіг.4



Фіг.5

конструкція 4



конструкція 3

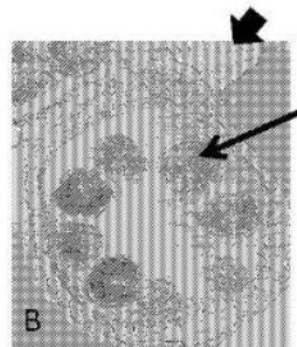


Fig.6

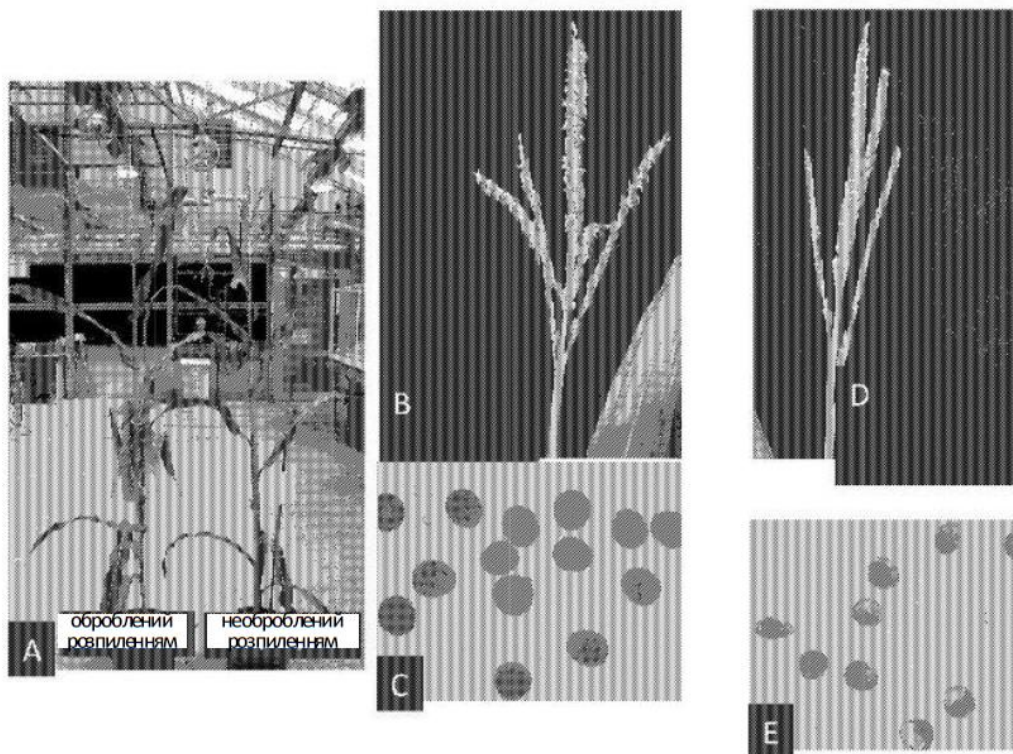
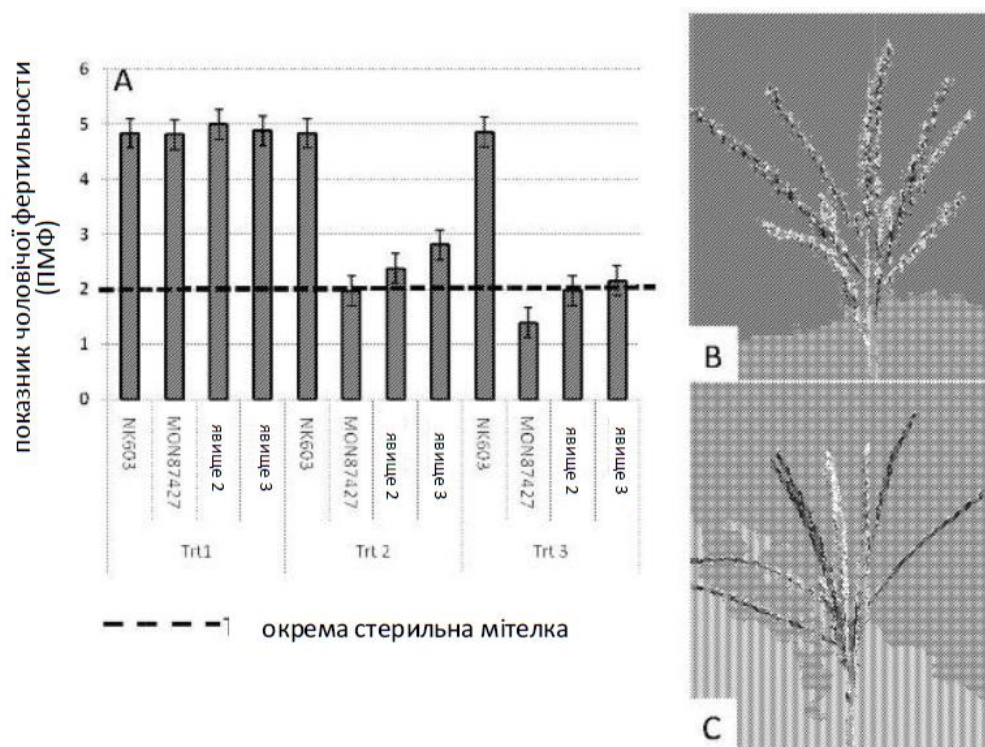
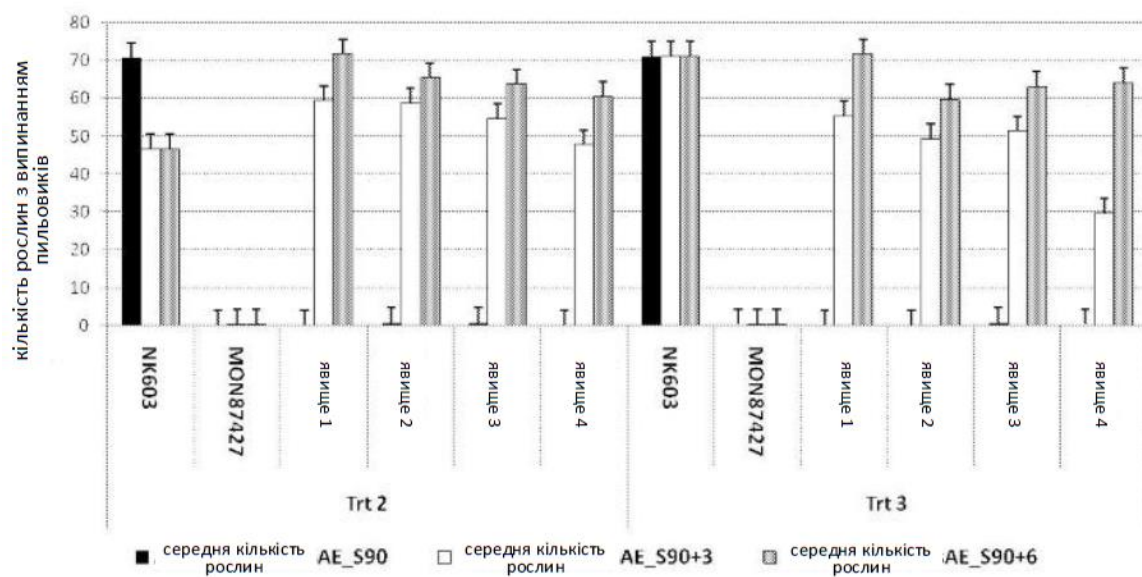


Fig.7



Фіг.8



Фіг.9

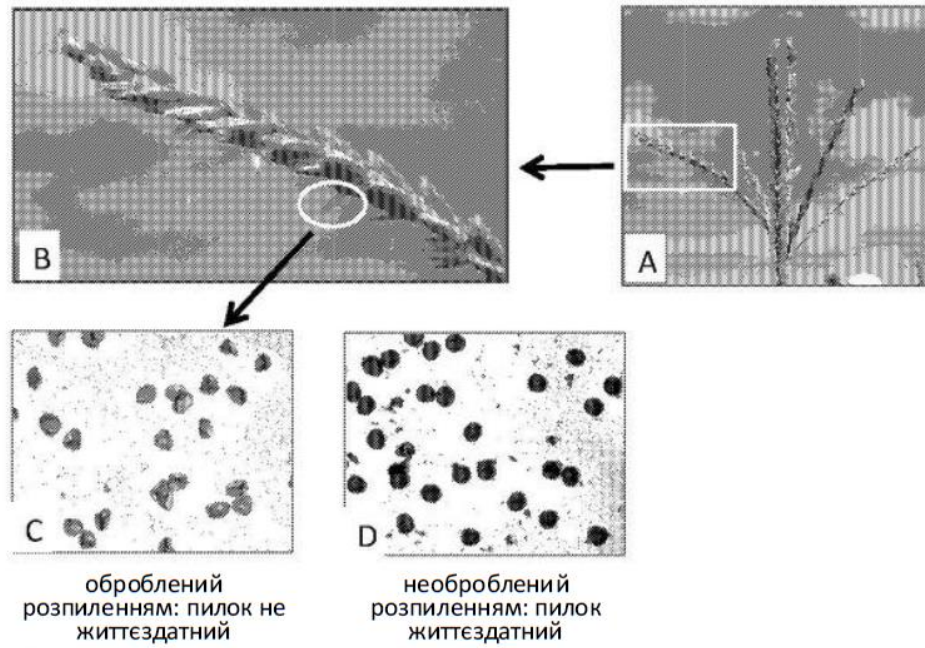


Fig.10

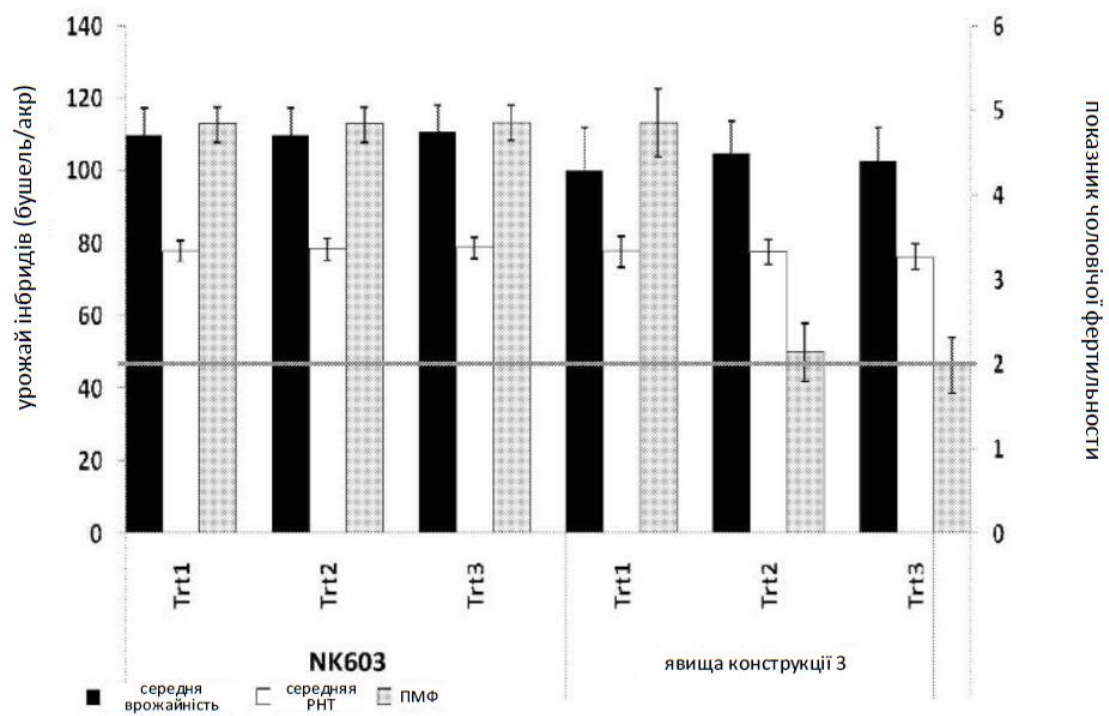


Fig.11

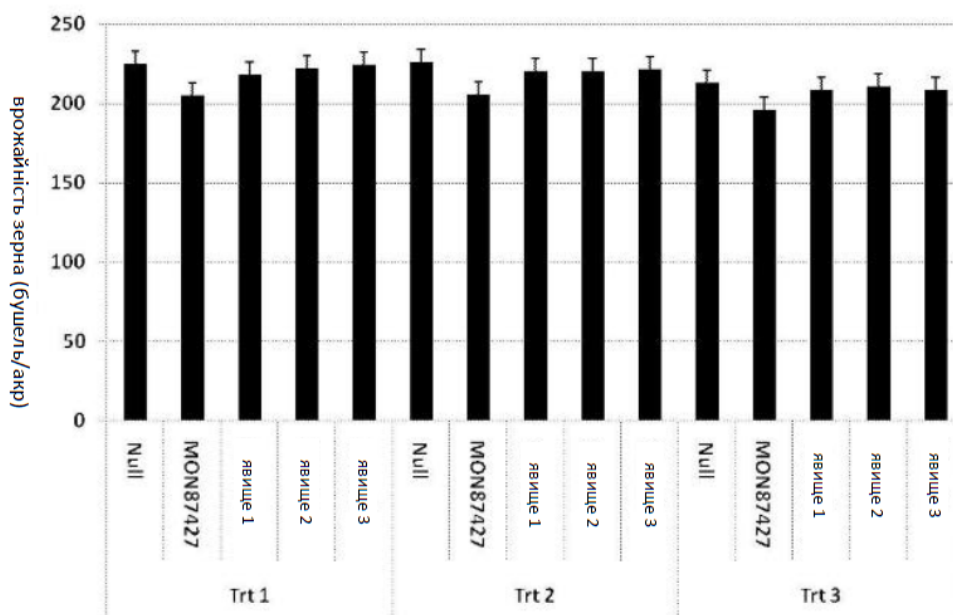


Fig.12

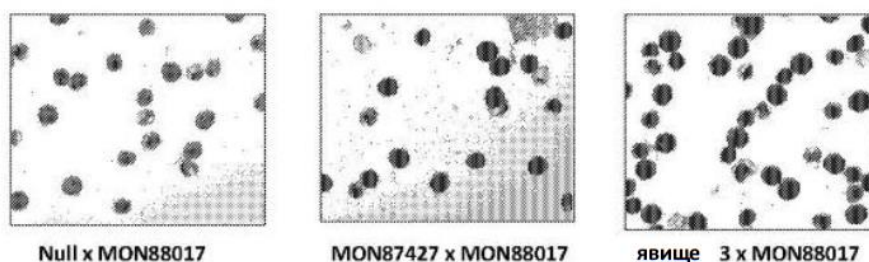


Fig.13

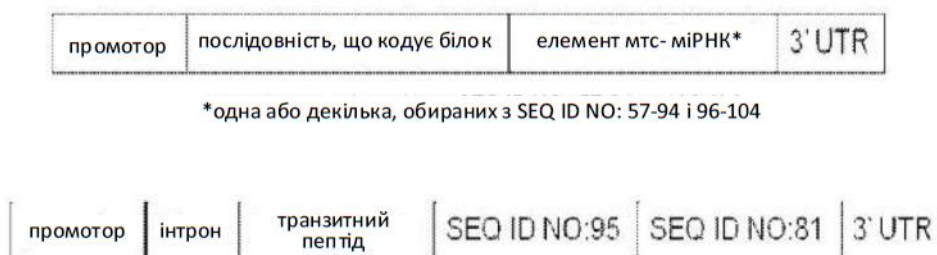


Fig.14

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601