



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121457** (13) **C2**
(51) МПК (2020.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 6/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 10007	(72) Винахідник(и):	Фласінський Станіслав (US), Чжан Дзун (US), Чжао Сулін (US)
(22) Дата подання заявки:	12.03.2014	(73) Власник(и):	МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.06.2020	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/785,245	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011/025860 A1, 03.03.2011 US 2007/209085 A1, 06.09.2007 US 2007/130645 A1 07.06.2007 WO 2012/112411 A1, 23.08.2012 US 2012/210463 A1, 16.08.2012 WO 2007/049275 A2, 03.05.2007 WO 2012/158535 A1, 22.11.2012 J. S. Jeong et al., "Root-Specific Expression of OsNAC10 Improves Drought Tolerance and Grain Yield in Rice under Field Drought Conditions", Plant Physiology, 01.05.2010, vol. 153, no. 1, P. 185-197 Xu Y et al., "Characterization of a Rice Gene Family Encoding Root-Specific Proteins", Plant Molecular Biology, Springer, Dordrecht, NL, 01.01.1995, vol. 27, no. 2, P. 237 - 248 "PUFZZ09TD ZM_0.6_1.0_KB Zea mays genomic clone ZMMBTa0771B18, genomic survey sequence.", EMBL, 28.08.2003, Database accession no. CG049384 "OR_ABa0263C13.r OR_ABa Oryza ridleyi genomic clone OR_ABa0263C13 3', genomic survey sequence.", EMBL, 22.01.2006, Database accession no. DX337374 Xiong et al., "Concurrent mutations in six amino acids in beta-glucuronidase improve its thermostability", Protein Engineering, Design, and Selection, 08.06.2007, vol. 20, no. 7, P. 319 - 325 Elmayan et al., "Synthesis of a bifunctional metallothionein/beta-glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels", The Plant Journal, 1994, vol. 6, no. 3, P. 433 - 440 Vettore et al., "The libraries that made SUCEST", Genetics and Molecular Biology, 2001, vol. 24, no. 1- 4, P. 1-7
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14.03.2013		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.04.2016, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.06.2020, Бюл.№ 11		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/024511, 12.03.2014		

(54) РЕГУЛЯТОРНИЙ ЕЛЕМЕНТ РОСЛИН ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантної молекули ДНК, яка містить послідовність ДНК, що має промоторну активність, при цьому зазначена послідовність ДНК функціонально зв'язана з

UA 121457 C2

гетерологічною полінуклеотидною молекулою, яка транскрибується. Винахід також стосується клітини трансгенної рослини, трансгенної рослини або її частини, рослини-нащадка трансгенної рослини, трансгенної насінини, способу одержання товарного продукту та способу отримання трансгенної рослини.

ПОСИЛАННЯ ДО СПОРІДНЕНИХ ЗАЯВОК

[0001] Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США № 61/785245, поданої 14 березня 2013 року, яка включена в цю заявку у повному обсязі шляхом посилання.

5 ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0002] Список послідовностей, які містяться у файлі під назвою "MONS331WO.txt", розміром 54,4 Кб (виміряно в Microsoft Windows®), що був створений 12 березня 2014 року, подається при цьому в електронній формі і включений у цей документ шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 [0003] Цей винахід відноситься до галузі молекулярної біології рослин, генетичної інженерії рослин та молекул ДНК, придатних для модуляції експресії генів у рослинах.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

15 [0004] Регуляторні елементи являють собою генетичні елементи, які регулюють активність генів шляхом модуляції транскрипції функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Такі елементи включають промотори, лідери, енхансери, інтрони та 3' нетрансльовані області та можуть бути використані в галузі молекулярної біології рослин та генетичної інженерії рослин.

СУТЬ ВИНАХОДУ

20 [0005] У цьому винаході запропоновані нові регуляторні елементи для використання в рослинах та генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи. У цьому винаході також запропоновані трансгенні рослини, клітини рослин, частини рослин та насіння, які містять регуляторні елементи. В одному варіанті реалізації винаходу у винаході запропоновані регуляторні елементи, описані в цьому документі, функціонально пов'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується. У деяких варіантах реалізації винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, є гетерологічною відносно послідовності регуляторного елемента, запропонованого в цьому документі. У цьому документі також запропоновані способи одержання та застосування регуляторних елементів, описаних у цьому документі, включаючи генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи та трансгенні рослини, клітини рослин, частини рослин і насіння, які містять регуляторні елементи, функціонально пов'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується, гетерологічною відносно регуляторного елемента.

30 [0006] Таким чином, в одному аспекті у винаході запропонована рекомбінантна молекула ДНК, яка містить послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID №: 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. Під "гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується" мають на увазі молекулу ДНК, яка транскрибується, яка є гетерологічною відносно послідовності ДНК. У конкретних варіантах реалізації винаходу рекомбінантна молекула ДНК містить послідовність ДНК, що має щонайменше близько 85 відсотків, щонайменше близько 86 відсотків, щонайменше близько 87 відсотків, щонайменше близько 88 відсотків, щонайменше близько 89 відсотків, щонайменше близько 90 відсотків, щонайменше близько 91 відсотка, щонайменше близько 92 відсотків, щонайменше близько 93 відсотків, щонайменше близько 94 відсотків, щонайменше близько 95 відсотків, щонайменше близько 96 відсотків, щонайменше близько 97 відсотків, щонайменше близько 98 відсотків або щонайменше 99 відсотків ідентичності послідовності до послідовності будь-якої ДНК з SEQ ID №: 1-20. У конкретних варіантах реалізації винаходу гетерологічна молекула ДНК, яка транскрибується, містить ген, який представляє агрономічний інтерес, наприклад, ген, здатний надавати рослинам стійкість до гербіцидів або шкідників. У ще інших варіантах реалізації винаходу у винаході запропонована генетична конструкція, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, як запропоновано в цьому документі.

50 [0007] В іншому аспекті в цьому документі пропонуються трансгенні клітини рослин, які містять рекомбінантну молекулу ДНК, яка включає послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID №: 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. У деяких варіантах реалізації винаходу трансгенна клітина рослини являє собою клітину однодольної рослини. В інших варіантах реалізації винаходу трансгенна клітина рослини являє собою клітину дводольної рослини.

[0008] У ще іншому аспекті в цьому документі нижче наведено трансгенну рослину або її частину, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID № 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить
 5 будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. У конкретних варіантах реалізації винаходу трансгенна рослина являє собою рослину-нащадок будь-якого покоління відносно вихідної трансгенної рослини та містить молекулу рекомбінантної ДНК. Трансгенна насіннина,
 10 яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка породжує таку трансгенну рослину при вирощуванні, також пропонується у винаході.

[0009] В іншому аспекті у винаході запропонований спосіб отримання товарного продукту з трансгенної рослини, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Товарна продукція відповідно до цього винаходу містить кількість SEQ ID №: 1-20.
 15 Використовуваний в цьому документі термін "товарний продукт" відноситься до будь-якої композиції або продукту, який складається з матеріалу, отриманого з трансгенної рослини, частини рослини, рослинної клітини, або насіння, що містять рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Товарна продукція, включає, але не обмежується цим, оброблене насіння, зерна, частини рослин та борошно грубого помелу. Трансгенні рослини, які містять
 20 рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу, можуть бути використані для виготовлення будь-якого товарного продукту, як правило, отриманого з рослини. Товарний продукт відповідно до цього винаходу буде містити визначувану кількість ДНК, яке відповідає рекомбінантній молекулі ДНК відповідно до цього винаходу. Виявлення в зразку цієї однієї або більше рекомбінантних молекул ДНК може бути використане для визначення вмісту або
 25 джерела товарного продукту. Будь-який стандартний спосіб виявлення молекул ДНК може бути використаний, включаючи способи детекції, описані в цьому документі.

[00010] У ще одному аспекті у винаході запропоновано спосіб експресії молекули ДНК, яка транскрибується, наприклад, гена, який представляє агрономічний інтерес, у трансгенній
 30 рослині шляхом отримання трансгенної рослини, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу, і культивування рослини.

[00011] У цьому документі також запропоновано спосіб отримання трансгенної рослини шляхом трансформації рекомбінантною молекулою ДНК відповідно до цього винаходу для отримання трансформованої рослинної клітини та регенерації трансформованої клітини
 35 рослини для отримання трансгенної рослини.

[00012] Також цим винаходом запропоновано модифікований кодон кишкової палички (*E. coli*), що кодує послідовності β-глюкуронідази (GUS); причому модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності демонструє більш високу експресію в трансгенній рослині, ніж нативна GUS-кодуюча послідовність *E. coli*. В одному варіанті реалізації винаходу модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності може бути обраний з групи, що складається з SEQ ID №: 29 та 30.
 40 Трансгенна рослина може бути однодольною рослиною. В одному варіанті реалізації винаходу однодольна рослина може бути обрана з групи, яка включає кукурудзу (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum spp.*), просо, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), пальчасте просо (*Eleusine coracana*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), овес (*Avena sativa*), тритикале, жито (*Secale cereale*), росичку (*Digitaria*), цибулі (*Allium spp.*), ананас (*Ananas spp.*), газонну траву, цукрову тростину (*Saccharum spp.*), пальми (*Arecaceae*), бамбук (*Bambuseae*), банани (*Musaceae*), імбирні (*Zingiberaceae*), лілії (*Lilium*), нарциси (*Narcissus*), півники (*Iris*), амарилліси, орхідеї (*Orchidaceae*), канни, дзвіночки (*Hyacinthoides*) та тюльпани (*Tulipa*). Трансгенні рослини також
 45 можуть бути дводольними рослинами. В одному варіанті реалізації винаходу дводольні рослини обрані з групи, яка включає сою (*Glycine max*), дику сою (*Glycine soja*), бавовник (*Gossypium*), томати (*Solanum lycopersicum*), перець (*Piper*), гарбуз (*Cucurbita*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолю (*Phaseolus*), нут (*Cicer arietinum*), соняшник (*Helianthus annuus*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), кінву, гречку посівну (*Fagopyrum esculentum*), ріжкове дерево (*Ceratonia siliqua*), буряк (*Beta vulgaris*),
 50 шпинат (*Spinacia oleracea*) та огірок (*Cucumis sativus*).

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[00013] Фіг. 1a-1c ілюструють вирівнювання між нативною послідовністю (CR-Ec.uidA-1: 1: 4, SEQ ID №: 31), яка кодує β-глюкуронідазу (GUS) *E. coli*, та послідовністю модифікованих кодонів GUS-кодуючої послідовності *E. coli* (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1, SEQ ID №: 30). Однакові нуклеотиди
 60 при вирівнюванні вказані зірочкою.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[00014] SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 та 23 являють собою послідовності промотору.

5 [00015] SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 та 24 являють собою лідерні послідовності.

[00016] SEQ ID №: 25-28 являють собою праймери ампліфікації.

[00017] SEQ ID №: 29 та 30 являють собою модифіковані кодони GUS-кодуючої послідовності. SEQ ID №: 29 містить інтрон, що вирізається, а послідовність SEQ ID №: 30 являє собою непереривну кодуючу послідовність.

10 [00018] SEQ ID №: 31 являє собою нативну кодуючу послідовність β-глюкуронідази *Escherichia coli*.

[00019] SEQ ID №: 32 являє собою кодонів GUS-кодуючу послідовність GUS з інтроном, що вирізається, на підставі SEQ ID №: 31 нативною β-глюкуронідази *E. coli*.

15 [00020] SEQ ID №: 33, 39 та 40 являє собою послідовність 3'-нетрансльованої області (3'-НТО).

20 [00021] SEQ ID №: 34-37, 41 та 44 являють собою послідовності груп регуляторних експресійних елементів (EXP), які містять промоторну послідовність, функціонально пов'язану 5' кінцем з лідерною послідовністю, яка функціонально пов'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону, або у випадку SEQ ID № 44, промоторну послідовність, функціонально пов'язану 5' кінцем з лідерною послідовністю.

[00022] SEQ ID №: 38 являє собою послідовність інтрону.

[00023] SEQ ID №: 42 та 44 являють собою послідовності, що кодують білки люциферази, які отримані з *Photinus pyralis* и *Renilla reniformis*, відповідно.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

25 [00024] Цей винахід відноситься до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність у рослинах. Нуклеотидні послідовності цих молекул ДНК наводяться в SEQ ID №: 1-20. Ці молекули ДНК, наприклад, здатні впливати на експресію функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, у тканинах рослин і, отже, регулювати експресію функціонально пов'язаного трансгена в трансгенних рослинах. Цей винахід також відноситься до способів їх модифікації, створення і застосування. Цей винахід також відноситься до композицій, які включають трансгенні клітини рослин, рослини, частини рослин і насіння, що містять рекомбінантні молекули ДНК відповідно до цього винаходу, та до способів їхнього отримання і застосування.

30 [00025] Наступні визначення та способи пропонуються з метою кращого окреслення винаходу і спрямування до фахівців у цій галузі техніки при застосуванні винаходу. Якщо не вказано інше, терміни слід розуміти відповідно до загальноприйнятого використання фахівцями в цій галузі техніки.

Молекули ДНК

40 [00026] Використаний у цьому документі термін "ДНК" або "молекула ДНК" відноситься до дволанцюгової молекули ДНК клітинного або синтетичного походження, тобто до полімеру дезоксирибонуклеотидних основ. Використаний у цьому документі термін "ДНК послідовність" відноситься до нуклеотидної послідовності молекули ДНК. Номенклатура, використана в цьому документі, відповідає такій за документом 37 "Зведення федеральних нормативних актів Сполучених Штатів" § 1.822 і викладена у таблицях WIPO стандарту ST.25 (1998), додаток 2, таблиці 1 та 3.

45 [00027] Як використовується в цьому документі, "рекомбінантна молекула ДНК" являє собою молекулу ДНК, яка містить комбінацію молекул ДНК, які б не об'єдналися природним шляхом без втручання людини. Наприклад, рекомбінантна молекула ДНК може бути молекулою ДНК, яка складається щонайменше з двох гетерологічних по відношенню одна до одної молекул ДНК; молекулою ДНК, що містить послідовність ДНК, яка відхиляється від існуючих у природі послідовностей ДНК; або молекулою ДНК, яка була вбудована у ДНК клітини-хазяїна шляхом генетичної трансформації.

50 [00028] Як використовується в цьому документі, термін "ідентичність послідовностей" відноситься до ступеня, в якому дві оптимально вирівняні послідовності ДНК є ідентичними. Оптимальне вирівнювання послідовностей створюється шляхом вирівнювання двох послідовностей ДНК вручну, наприклад, референсної послідовності та іншої послідовності ДНК, для створення максимальної кількості відповідностей між нуклеотидами при вирівнюванні послідовностей із відповідними внутрішніми нуклеотидними вставками, делеціями або розривами. Використаний у цьому документі термін "референсна послідовність" відноситься до послідовності ДНК, яка наводиться в SEQ ID №: 1-20.

[00029] Використаний в цьому документі термін "відсоток ідентичності послідовностей" або "відсоток ідентичності", або "% ідентичності" являє собою частку ідентичності помножену на 100. "Частка ідентичності" для послідовності ДНК, оптимально вирівняної із початковою послідовністю, являє собою число відповідностей між нуклеотидами при оптимальному вирівнюванні поділене на загальне число нуклеотидів у референсній послідовності, наприклад, на загальне число нуклеотидів всієї повнорозмірної референсної послідовності. Таким чином, в одному варіанті реалізації винахід відноситься до молекули ДНК, яка містить послідовність ДНК, котра при оптимальному вирівнюванні з референсною послідовністю, представленою в цьому документі як SEQ ID №: 1-20, має щонайменше близько 85 відсотків ідентичності, щонайменше близько 86 відсотків ідентичності, щонайменше близько 87 відсотків ідентичності, щонайменше близько 88 відсотків ідентичності, щонайменше близько 89 відсотків ідентичності, щонайменше близько 90 відсотків ідентичності, щонайменше близько 91 відсотка ідентичності, щонайменше близько 92 відсотків ідентичності, щонайменше близько 93 відсотків ідентичності, щонайменше близько 94 відсотків ідентичності, щонайменше близько 95 відсотків ідентичності, щонайменше близько 96 відсотків ідентичності, щонайменше близько 97 відсотків ідентичності, щонайменше близько 98 відсотків ідентичності, щонайменше близько 99 відсотків ідентичності або щонайменше близько 100 відсотків ідентичності з референсною послідовністю.

Регуляторні елементи

[00030] Регуляторні елементи такі як промотори, лідери, енхансери, інтрони та області термінації транскрипції (або 3' НТО) відіграють суттєву роль у загальній експресії генів у живих клітинах. Термін "регуляторний елемент", який використовується в цьому документі, відноситься до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність. Термін "ген-регуляторна активність", який використовується в цьому документі, відноситься до здатності впливати на експресію функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, наприклад, шляхом впливу на транскрипцію та/або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Регуляторні елементи, такі як промотори, лідери, енхансери та інтрони, 3' НТО, які функціонують у рослинах, є, таким чином, корисними для модифікації фенотипів рослин за допомогою генетичної інженерії.

[00031] Використана в цьому документі "група регуляторних елементів експресії" або "EXP" послідовність може відноситися до групи функціонально пов'язаних регуляторних елементів, таких як енхансери, промотори, лідери та інтрони. Таким чином, група регуляторних елементів експресії може складатися, наприклад, із промотору, функціонально пов'язаного 5' кінцем з лидерною послідовністю, яка, у свою чергу, функціонально пов'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону.

[00032] Регуляторні елементи можуть бути охарактеризовані за своїм характером експресії генів, наприклад, за позитивним і/або негативним впливами, такими як конститутивна експресія або тимчасова, просторова, залежна від стадії розвитку, тканинна, залежна від оточення, фізіологічна, патологічна, клітинного циклу і/або хімічно чутлива експресія, і будь-яка з їхніх комбінацій, а також за кількісними або якісними показниками. Використаний в цьому документі термін "характер експресії гена" являє собою будь-яку особливість транскрипції функціонально пов'язаної молекули ДНК в молекулу РНК, яка транскрибується. Молекула РНК, яка транскрибується, може бути трансльована для отримання молекули білка або може утворити антисмислову або іншу регуляторну молекулу РНК, таку як дволанцюгова РНК (дцРНК), транспортна РНК (тРНК), рибосомальна РНК (рРНК), мікроРНК (мікроРНК) тощо.

[00033] Використаний в цьому документі термін "експресія білка" являє собою будь-яку особливість трансляції молекули РНК, яка транскрибується, в молекулу білка. Експресія білка може бути охарактеризована за своїми часовими, просторовими, належними до стадії розвитку або морфологічними якість, а також за кількісними або якісними показниками.

[00034] Промотор є корисним в якості регуляторного елемента для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Як використовується в цьому документі термін "промотор" відноситься в загальному розумінні до молекули ДНК, яка бере участь у розпізнаванні та зв'язуванні РНК-полімерази II та інших білків, таких як транс-діючі фактори транскрипції, для ініціації транскрипції. Промотор може походити з 5' нетрансльованої області (5' НТО) гена. В альтернативному варіанті промотори можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання молекулою ДНК. Промотори також можуть бути химерними. Химерні промотори отримують шляхом злиття двох або більше гетерологічних молекул ДНК. Промотори, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID № 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, включаючи їхні фрагменти або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу такі молекули ДНК та будь-які їхні варіанти або похідні, описані в цьому документі, далі визначаються як такі, що мають промоторну активність, тобто здатні діяти

як промотор у клітині хазяїна, такого як трансгенна рослина. У ще додаткових конкретних варіантах реалізації винаходу фрагмент може бути визначений як такий, що виявляє промоторну активність, яку має вихідна молекула промотору, з якої він був отриманий, або фрагмент може містити "мінімальний промотор", який забезпечує основний рівень транскрипції та включає ТАТА-бокс або еквівалентну послідовність ДНК для розпізнавання і зв'язування комплексу РНК-полімерази II з метою ініціації транскрипції.

[00035] В одному варіанті реалізації винаходу фрагменти забезпечені промоторною послідовністю, описаною в цьому документі. Фрагменти промоторів можуть включати промоторну активність, як описано вище, та можуть бути корисними окремо або в комбінації з іншими промоторами і фрагментами промоторів, наприклад, при створенні химерних промоторів. У конкретних варіантах реалізації винаходу пропонуються фрагменти промотору, що містять щонайменше близько 50, щонайменше близько 75, щонайменше близько 95, щонайменше близько 100, щонайменше близько 125, щонайменше близько 150, щонайменше близько 175, щонайменше близько 200, щонайменше близько 225, щонайменше близько 250, щонайменше близько 275, щонайменше близько 300, щонайменше близько 500, щонайменше близько 600, щонайменше близько 700, щонайменше близько 750, щонайменше близько 800, щонайменше близько 900, або щонайменше близько 1000 послідовних нуклеотидів або більше, молекули ДНК, яка має промоторну активність, описану в цьому документі. Способи отримання таких фрагментів із вихідної молекули промотору добре відомі у цій галузі техніки.

[00036] Композиції, отримані з будь-яких промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, такі як внутрішні або 5' делеції, наприклад, можуть бути отримані з використанням добре відомих у цій галузі техніки способів поліпшення або зміни експресії, включаючи видалення елементів, які мають позитивні чи негативні впливи на експресію; подвоєння елементів, які мають позитивні чи негативні впливи на експресію; та/або подвоєння або видалення елементів, які мають тканино- або клітино-специфічні впливи на експресію. Композиції, отримані з будь-яких промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, які містять 3' делеції, в яких елемент ТАТА-боксу або його еквівалентна послідовність ДНК та послідовність, яка знаходиться нижче, видалені, можуть бути використані, наприклад, для створення енансерних елементів. Додаткові делеції можуть бути внесені для видалення будь-яких елементів, які мають позитивні чи негативні, тканино-специфічні, клітино-специфічні або часо-специфічні (такі як, проте не обмежуючись цими, добові ритми) впливи на експресію. Будь-який із промоторів, представлений у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, і фрагменти або енансери, отримані з них, можуть бути використані для отримання композицій химерних регуляторних елементів, які містять будь-який із промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, і фрагменти або енансери, отримані з них, функціонально пов'язані з іншими енансерами та промоторами.

[00037] Відповідно до цього винаходу, промотор або фрагмент промотору можуть бути проаналізовані на наявність відомих промоторних елементів, тобто характеристик послідовності ДНК, таких як ТАТА-бокс та інших відомих мотивів сайтів зв'язування транскрипційних факторів. Ідентифікація таких відомих промоторних елементів може бути використана фахівцем у цій галузі техніки для розробки варіантів промотору, які мають схожий характер експресії, як і вихідний промотор.

[00038] Використаний у цьому документі термін "лідер" відноситься до молекули ДНК із 5' нетрансльованої області (5' НТО) гена і визначається в загальному розумінні як сегмент ДНК між сайтом ініціації транскрипції (СІТ) і початковим сайтом послідовності, яка кодує білок. В альтернативному варіанті лідери можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання елементам ДНК. Лідер може бути використаний як 5' регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Молекули лідерів можуть бути використані з гетерологічним промотором або з їхнім нативним промотором. Молекули промоторів відповідно до цього винаходу, таким чином, можуть бути функціонально пов'язаними з їхнім нативним лідером або можуть бути функціонально пов'язаними з гетерологічним лідером. Лідери, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 та 20, або їхні фрагменти, або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу такі послідовності ДНК можуть бути визначені як здатні діяти як лідер в клітині-хазяїні, включаючи, наприклад, трансгенну клітину рослини. В одному варіанті реалізації винаходу такі послідовності ДНК можуть бути розшифровані як такі, що включають лідерну активність.

[00039] Лідерні послідовності (5' НТО), представлені в SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть складатися з регуляторних елементів або можуть приймати вторинні структури, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. Лідерні

послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані, відповідно до винаходу, для створення химерних регуляторних елементів, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. На додаток, лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані для створення химерних лідерних послідовностей, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК.

[00040] Використаний у цьому документі термін "інтрон" відноситься до молекули ДНК, яка може бути виділена або ідентифікована з геномної копії гена і може бути визначена в загальному розумінні як область, яка вирізається під час процесингу інформаційної РНК (мРНК) до трансляції. В альтернативному варіанті інтрон може бути отриманий синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання елементом ДНК. Інтрон може містити енхансерні елементи, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаних генів. Інтрон може бути використаний як регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Генетична конструкція може містити інтрон, та інтрон може бути чи не бути гетерологічним відносно молекули ДНК, яка транскрибується. Приклади інтронів у цій галузі техніки включають інтрон актину рису та інтрон HSP70 кукурудзи.

[00041] У порівнянні з генетичними конструкціями без інтрону, включення деяких інтронів у генетичні конструкції призводить до збільшення накопичення мРНК і білка в рослинах. Цей ефект був названий як "інтрон-опосередковане підсилення" (IME) експресії генів (Mascarenhas et al., Plant Mol. Biol. 15:913-920, 1990). Інтрони, які стимулюють експресію в рослинах, були ідентифіковані в генах кукурудзи (наприклад, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* та *Ubi1*), в генах рису (наприклад, *tpi*) та в генах дводольних рослин, таких як петунія (наприклад, *rbcS*), картопля (наприклад, *st-ls1*) і *Arabidopsis thaliana* (наприклад, *ubq3* і *pat1*). Було показано, що делеції або мутації у межах сайтів сплайсингу інтрону знижують експресію генів, вказуючи на те, що сплайсинг може бути необхідний для IME. Однак сплайсинг сам по собі не потребується, оскільки IME було показано для дводольних рослин, за допомогою точкових мутацій в межах сайтів сплайсингу *pat1* гена з *A. thaliana*. Було показано, що багаторазове використання одного і того самого інтрону в одній рослині виявляє недоліки. У таких випадках необхідно мати колекцію основних елементів контролю для створення відповідних рекомбінантних елементів ДНК.

[00042] Використаний у цьому документі термін "3' молекула термінації транскрипції", "3' нетрансльована область" або "3' НТО" відноситься до молекули ДНК, яка використовується під час транскрипції із нетрансльованої області 3' частини молекули мРНК. 3' нетрансльована область молекули мРНК може бути отримана шляхом специфічного розщеплення і 3' поліаденилюванням, також відомим як полі(А)-хвіст. 3' НТО може бути функціонально пов'язана з молекулою ДНК, яка транскрибується, і розташовуватися нижче від неї, і може включати сигнал поліаденилювання та інші регуляторні сигнали, здатні впливати на транскрипцію, процесинг мРНК або експресію генів. Вважають, що полі(А)-хвост виконують функції стабілізації мРНК та ініціації трансляції. Приклади 3' молекул термінації транскрипції у цій галузі техніки являють собою 3' область нопалінсинтази, 3' область *hsp17* пшениці, 3' область малої субодиниці RuBisCO гороху, 3' область E6 бавовни і 3' НТО бусенника.

[00043] 3' НТО, як правило, знаходять корисне застосування для рекомбінантної експресії специфічних молекул ДНК. Слабка 3' НТО може генерувати наскрізне зчитування, що може вплинути на експресію молекули ДНК, розташованої у сусідніх експресійних касетах. Відповідний контроль для термінації транскрипції може запобігти наскрізному зчитуванню в послідовностях ДНК (наприклад, інших експресійних касет), локалізованих нижче, і може додатково забезпечити ефективне повторне використання РНК-полімерази, для поліпшення експресії генів. Ефективна термінація транскрипції (звільнення РНК-полімерази II із ДНК) є передумовою для наступної ініціації транскрипції і, таким чином, безпосередньо впливає на загальний рівень транскрипту. Після термінації транскрипції зріла мРНК звільняється з місця синтезу, і матриця транспортується в цитоплазму. Еукаріотичні мРНК накопичуються в формах полі(А) *in vivo*, що ускладнює виявлення сайтів термінації транскрипції загальноприйнятими способами. Однак передбачення функціональних та ефективних 3' НТО за допомогою біоінформатичних способів ускладнене, оскільки відсутні консервативні послідовності ДНК, які дозволяють легко передбачати ефективну 3' НТО.

[00044] Із практичної точки зору, як правило, корисно, щоб 3' НТО, використана в експресійній касеті, мала наступні характеристики. 3' НТО повинна бути здатною раціонально та ефективно завершувати транскрипцію ДНК та запобігати наскрізному зчитуванню транскрипту в будь-якій із сусідніх послідовностей ДНК, яка може міститися в іншій експресійній касеті, як і у випадку декількох експресійних касет, які належать одній трансферній ДНК (Т-ДНК), або сусідній

хромосомний ДНК, в яку Т-ДНК була вбудована. 3' НТО не повинна призводити до зниження транскрипційної активності наданої промотором, лідером, енхансерами та інтронами, які використовуються для контролювання експресії молекули ДНК. У біотехнології рослин 3' НТО часто використовується для затравки реакцій ампліфікації РНК, яка зворотно транскрибується, виділеної із трансформованих рослин, та використовується для: 1) оцінки транскрипційної активності або експресії експресійної касети, інтегрованої у хромосому рослини; 2) оцінки кількості копій вставок у ДНК рослини; та 3) оцінки зиготності отриманої насінини після розмноження. 3' НТО також використовується в реакціях ампліфікації ДНК, екстрагованої із трансформованих рослин, для визначення інтактності вбудованої касети.

[00045] Використаний у цьому документі термін "енхансер" або "енхансерний елемент" відноситься до цис-діючого регуляторного елемента, названого цис-елементом, який надає аспект загального характеру експресії, але, як правило, недостатній сам по собі для контролювання транскрипції функціонально пов'язаної послідовності ДНК. На відміну від промоторів, енхансерні елементи зазвичай не включають сайт ініціації транскрипції (СІТ) або ТАТА-бокс, або еквіваленту послідовності ДНК. Промотор або фрагмент промотору за природою може містити один або більше енхансерних елементів, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаної послідовності ДНК. Енхансерний елемент також може бути об'єднаний із промотором для отримання химерного промоторного цис-елемента, що додає аспект загальної модуляції експресії генів.

[00046] Вважають, що численні енхансерні елементи промотору зв'язують ДНК-зв'язуючі білки та/або впливають на топологію ДНК, створюючи локальні конформації, які вибірково дозволяють або обмежують доступ РНК-полімерази до ДНК-матриці або які полегшують вибірконе відкривання подвійної спіралі на ділянці ініціації транскрипції. Енхансерний елемент також може виконувати функцію зв'язування транскрипційних факторів, які регулюють транскрипцію. Деякі енхансерні елементи зв'язують більш ніж один фактор транскрипції, і транскрипційні фактори можуть взаємодіяти із різною афінністю із більш ніж одним доменом енхансеру. Енхансерні елементи можуть бути ідентифіковані за допомогою ряду методів, включаючи аналіз делецій, тобто видалення одного або більше нуклеотидів із 5' кінця або всередині промотору; аналіз ДНК-зв'язуючого білка, з використанням футпринтингу ДНКазі I, інтерференцію метилювання, аналізу зсуву електрофоретичної мобільності, in vivo геномний футпринтинг шляхом лігування-опосередкованої полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інших загальноприйнятих аналізів; або шляхом аналізу подібності послідовностей ДНК, використовуючи відомі мотиви цис-елементів або енхансерних елементів, як цільову послідовність або цільовий мотив, із загальноприйнятими способами порівняння послідовностей ДНК, таких як BLAST. Тонка структура домена енхансеру може бути додатково досліджена шляхом мутагенезу (або заміщення) одного або більше нуклеотидів або іншими загальноприйнятими способами, відомими у цій галузі техніки. Енхансерні елементи можуть бути отримані шляхом хімічного синтезу або шляхом виділення із регуляторних елементів, які включають такі елементи, і вони можуть бути синтезовані з додатковими фланкуючими нуклеотидами, які включають корисні сайти рестрикції для полегшення подальших маніпуляцій. Таким чином, розробка, створення і використання енхансерних елементів, у відповідності до способів, описаних у цьому документі, для модуляції експресії функціонально пов'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються за цим винаходом.

[00047] Використаний цьому документі термін "химерний" відноситься до окремої молекули ДНК, отриманої шляхом злиття першої молекули ДНК із другою молекулою ДНК, де ані перша, ані друга молекула ДНК зазвичай не будуть міститися у такій конфігурації, тобто не будуть об'єднані одна із одною. Химерна молекула ДНК, таким чином, являє собою нову молекулу ДНК, інакше кажучи, таку, яка не міститься зазвичай у природі. Використаний у цьому документі термін "химерний промотор" відноситься до промотору, який отримано за допомогою такого маніпулювання молекулами ДНК. Химерний промотор може об'єднувати два або більше фрагментів ДНК, наприклад, злиття промотору із енхансерним елементом. Таким чином, розробка, створення і використання химерних промоторів, у відповідності до способів, описаних у цьому документі, для модуляції експресії функціонально пов'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються відповідно до цього винаходу.

[00048] Використаний у цьому документі термін "варіант" відноситься до другої молекули ДНК, такої як регуляторний елемент, яка аналогічна за композицією, але не ідентична першій молекулі ДНК, і причому друга молекула ДНК все ще зберігає загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, наприклад, через більшу або меншу, або еквівалентну транскрипційну або трансляційну активність у порівнянні із першою молекулою ДНК. Варіант може бути укороченою або усіченою версією першої молекули ДНК та/або

зміненою версією послідовності ДНК першої молекули ДНК, такої як варіант із різними сайтами рестрикції та/або внутрішніми делеціями, замінами та/або вставками. "Варіанти" регуляторного елемента також охоплюють варіанти, які виникають у результаті мутацій, котрі відбуваються під час або в результаті трансформації клітин бактерій та рослин. У цьому винаході послідовність ДНК, наведена в SEQ ID №: 1-20, може бути використана для створення варіантів, які аналогічні за композицією, але не ідентичні послідовності ДНК вихідного регуляторного елемента, хоча все ще зберігають загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, як і вихідний регуляторний елемент. Отримання таких варіантів відповідно до цього винаходу знаходиться в межах звичайної кваліфікації у цій галузі техніки у висвітленому описі та здійснено в межах обсягу цього винаходу.

[00049] Химерні регуляторні елементи можуть бути розроблені для включення різних складових елементів, які можуть бути функціонально пов'язані різними способами, відомими в цій галузі техніки, такими як розщеплення ферментами рестрикції та лігування, клонування незалежне від лігування, модульне збирання продуктів ПЛР у процесі ампліфікації або прямий хімічний синтез регуляторного елемента, а також іншими способами, відомими в цій галузі техніки. Отримані різні химерні регуляторні елементи можуть складатися із тих самих або варіантів тих самих складових елементів, але відрізнятися за послідовністю ДНК, або послідовностей ДНК, які включають зв'язуючу послідовність ДНК, або послідовностей, які дозволяють складовим частинам бути функціонально пов'язаними. У винаході послідовність ДНК, що наводиться в SEQ ID №: 1-20, може забезпечити референсну послідовність регуляторного елемента, в якій складові елементи, які включають референсну послідовність, можуть бути з'єднані способами, відомими в цій галузі техніки, та можуть включати заміни, делеції та/або вставки одного або більше нуклеотидів або мутацій, які зазвичай зустрічаються при трансформації клітин бактерій та рослин.

[00050] Дієвість модифікацій, дублікацій або делецій, описаних у цьому документі, на бажані аспекти експресії конкретного трансгена може бути перевірена емпірично у стабільних і транз'єнтних тестах рослин, таких як ті, що описані в робочих прикладах у цьому документі, для підтвердження результатів, які можуть варіювати залежно від проведених змін і мети зміни вихідної молекули ДНК.

Генетичні конструкції

[00052] Використаний у цьому документі термін "генетична конструкція" означає будь-яку рекомбінантну молекулу ДНК, таку як плазміда, косміда, вірус, фаг або лінійну або кільцеву молекулу ДНК або РНК, отриману із будь-якого джерела, здатну до геномної інтеграції або автономної реплікації, яка включає молекулу ДНК, де щонайменше одна молекула ДНК пов'язана з іншою молекулою ДНК функціонально діючим способом, тобто функціонально пов'язані між собою. Використаний у цьому документі термін "вектор" означає будь-яку генетичну конструкцію, яка може бути використана з метою трансформації, тобто введення гетерологічної ДНК або РНК у клітину хазяїна. Генетична конструкція, як правило, включає одну або більше експресійних касет. Як використано в цьому документі "експресійна касета" відноситься до молекули ДНК, що містить щонайменше молекулу ДНК, яка транскрибується, функціонально пов'язану із одним або більше регуляторних елементів, як правило, щонайменше із промотором і 3' НТО.

[00052] Використаний у цьому документі термін "функціонально пов'язаний" відноситься до першої молекули ДНК, з'єднаної з другою молекулою ДНК, причому перша і друга молекули ДНК розташовані так, що перша молекула ДНК впливає на функцію другої молекули ДНК. Дві молекули ДНК можуть бути або не бути частиною єдиної неперервної молекули ДНК і можуть бути чи не бути суміжними. Наприклад, промотор є функціонально пов'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, якщо промотор модулює транскрипцію цільової молекули ДНК, яка транскрибується у клітині. Лідер, наприклад, є функціонально пов'язаним із послідовністю ДНК, коли він здатний впливати на транскрипцію або трансляцію послідовності ДНК.

[00053] Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть бути запропоновані в одному варіанті реалізації винаходу як генетичні конструкції, які складаються із двох граничних областей пухлиноіндукуючої плазміди (Ti), що мають області правої граничної ділянки (RB або AGRtu.RB) і лівої граничної ділянки (LB або AGRtu.LB) Ti -плазміди, ізольованої з *Agrobacterium tumefaciens*, яка містить Т-ДНК, яка разом із перенесенням молекул, що забезпечується клітинами *A. tumefaciens*, дозволяє інтеграцію Т-ДНК у геном клітини рослини (див., наприклад, патент США 6603061). Генетичні конструкції також можуть містити сегменти плазмідного каркасу ДНК, які забезпечують функцію реплікації та селекції на антибіотику в клітинах бактерій, наприклад, реплікації *Escherichia coli*, такий як ori322, реплікації для широкого спектру хазяїв, такий як oriV або oriRi, і кодуючу область селективного маркера, такого як Spec/Strp, який кодує

Tn7 аміноглікозид аденілтрансферазу (aadA), що надає стійкість до спектиномицину або стрептомицину, або селективний маркерний ген гентаміцину (Gm, Gent). Для трансформації рослин часто використовують бактеріальний штам хазяїна ABI, C58 або LBA4404 *A. tumefaciens*, проте інші штами, відомі фахівцям у галузі трансформації рослин, можуть функціонувати у цьому винаході.

[00054] У цій галузі техніки відомі способи для збірки та введення генетичних конструкцій у клітину у такий спосіб, що молекула ДНК, яка транскрибується, транскрибується у функціональну молекулу мРНК, яка транслюється та експресується у вигляді білка. Для здійснення винаходу на практиці загальноприйняті композиції та способи отримання і використання генетичних конструкцій та клітин хазяїна добре відомі фахівцям у цій галузі техніки. Типові вектори, використані для експресії нуклеїнових кислот у вищих рослинах, добре відомі у цій галузі техніки та включають вектори, отримані з Ti-плазмідів *Agrobacterium tumefaciens* та pCamVCN контрольного вектора для перенесення.

[00055] Різні регуляторні елементи можуть бути включені в генетичну конструкцію, включаючи будь-який з тих, що запропоновані у цьому документі. Будь-які такі регуляторні елементи можуть бути запропоновані в поєднанні з іншими регуляторними елементами. Такі комбінації можуть бути розроблені або модифіковані для отримання бажаних регуляторних функцій. В одному варіанті реалізації винаходу генетичні конструкції відповідно до цього винаходу містять щонайменше один регуляторний елемент, функціонально пов'язаний із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка функціонально пов'язана з 3' НТО.

[00056] Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть включати будь-який промотор або лідер, запропоновані в цьому документі або відомі у цій галузі техніки. Наприклад, промотор за винаходом може бути функціонально пов'язаний із гетерологічним нетрансльованим 5' лідером, таким як один з отриманих із гена білка теплового шоку. В альтернативному варіанті лідер за винаходом може бути функціонально пов'язаним із гетерологічним промотором, таким як 35S промоторний транскрипт вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*).

[00057] Експресійні касети також можуть включати кодуєчу послідовність транзитного пептиду, яка кодує пептид, корисний для внутрішньоклітинного спрямування функціонально пов'язаного білка, зокрема, до хлоропласту, лейкопласту або іншої пластидної органели, мітохондрії, пероксисоми, вакуолі або позаклітинного простору. Багато білків, локалізованих у хлоропластах, експресуються генами ядра як попередники і спрямовуються до хлоропласту за допомогою транзитного пептиду хлоропласту (ТПХ). Приклади таких білків, ізольованих із хлоропластів, включають, але не обмежуються цими, білки, асоційовані з малою субодиницею (МСО) рибулозо-1,5,-біфосфат карбоксилази, ферредоксин, ферредоксин оксидоредуктазу, білок I і білок II фотосенсибілізуючого комплексу, тіоредоксин F і енолпірувіл шикимат фосфатсинтазу (ЕПШФС). Транзитні пептиди хлоропластів описані, наприклад, в патенті США № 7193133. Було показано, що нехлоропластні білки можуть бути спрямовані до хлоропласту при експресії гетерологічного ТПХ, функціонально пов'язаного з трансгеном, який кодує нехлоропластні білки.

Молекула ДНК, яка транскрибується

[00058] Використаний у цьому документі термін "молекула ДНК, яка транскрибується" відноситься до будь-якої молекули ДНК, здатної транскрибуватися в молекулу РНК, включаючи, але не обмежуючись цим, ті, що мають послідовності, які кодують білок, і ті, що утворюють молекули РНК, які мають послідовності, корисні для супресії гена. Тип молекули ДНК може включати, але не обмежується цими, молекулу ДНК із тієї самої рослини, молекулу ДНК з іншої рослини, молекулу ДНК з іншого організму або синтетичну молекулу ДНК, таку як молекула ДНК, що містить антисмислову послідовність гена, або молекулу ДНК, що кодує штучну, синтетичну або іншим чином модифіковану версію трансгена. Типова молекула ДНК, яка транскрибується, для включення в генетичні конструкції за винаходом включає, наприклад, молекули ДНК або гени з іншого виду, ніж той, в який молекула ДНК вбудована, або гени, які походять з або присутні в тому самому виді, але які включені в клітини-реципієнти способами генетичної інженерії, а не класичними методами розмноження.

[00059] "Трансген" відноситься до молекули ДНК, яка транскрибується, гетерологічною для клітини-хазяїна щонайменше щодо її розташування в геномі клітини-хазяїна та/або молекули ДНК, яка транскрибується, яка штучно включена в геном клітини-хазяїна у цьому або у будь-якому із попередніх поколінь клітин.

[00060] Регуляторний елемент, такий як промотор відповідно до цього винаходу, може бути функціонально пов'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка гетерологічна відносно регуляторного елемента. Використаний у цьому документі термін "гетерологічний" відноситься до комбінації із двох або більше молекул ДНК, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у

природі. Наприклад, дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних видів і/або дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних генів, наприклад, різних генів одного і того самого виду, або ж одних і тих самих генів із різних видів. Регуляторний елемент є, таким чином, гетерологічним відносно функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, якщо така комбінація

зазвичай не зустрічається у природі, тобто молекула ДНК, яка транскрибується, зазвичай не буває функціонально пов'язаною із регуляторним елементом.

[00061] Молекула ДНК, яка транскрибується, у загальному розумінні може бути будь-якою молекулою ДНК, для якої бажана експресія транскрипту. Така експресія транскрипту може призводити до трансляції отриманої молекули мРНК і, відповідно, до експресії білка. В альтернативному варіанті, наприклад, молекула ДНК, яка транскрибується, може бути розроблена так, щоб у підсумку викликати зменшення експресії конкретного гена або білка. В одному варіанті реалізації цього винаходу це може бути досягнуто за допомогою молекули ДНК, яка транскрибується, орієнтованої в антисмислового напрямку. Фахівець у цій галузі техніки добре обізнаний із використанням такої антисмислової технології. Будь-який ген може негативно регулюватися у такий спосіб, і в одному варіанті реалізації винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, може бути розроблена для супресії конкретного гена шляхом експресії дцРНК, міРНК або мікроРНК молекули.

[00062] Таким чином, в одному варіанті реалізації цього винаходу представляється рекомбінантна молекула ДНК, яка містить регуляторний елемент за винаходом, такий як ті, що запропоновані в SEQ ID №: 1-20, функціонально пов'язаний з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується, для модулювання транскрипції молекули ДНК, яка транскрибується, на бажаному рівні або за бажаним характером, коли генетична конструкція інтегрована в геном клітини трансгенної рослини. В одному варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, містить область гена, яка кодує білок, а в іншому варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, містить антисмислову область гена.

Гени, які представляють агрономічний інтерес

[00063] Молекула ДНК, яка транскрибується, може бути геном, який представляє агрономічний інтерес. Використаний у цьому документі термін "ген, який представляє агрономічний інтерес" відноситься до молекули ДНК, яка транскрибується, котра при експресії у конкретній тканині рослин, клітині або типі клітини надає бажану характеристику. Продукт гена, який представляє агрономічний інтерес, може діяти всередині рослини для того, щоб впливати на морфологію рослини, фізіологію, ріст, розвиток, врожайність, композицію зерна, поживний профіль, стійкість до хвороб або шкідників та/або толерантність до факторів навколишнього середовища або хімічних факторів, або може діяти в якості пестицидного агента в раціоні шкідника, який харчується рослиною. В одному варіанті реалізації цього винаходу регуляторний елемент за винаходом включений у генетичну конструкцію таким чином, що регуляторний елемент функціонально пов'язаний з молекулою ДНК, яка транскрибується, котра є геном, який представляє агрономічний інтерес. У трансгенній рослині, яка містить таку генетичну конструкцію, експресія гена, який представляє агрономічний інтерес, може надати корисну агрономічну рису. Корисна агрономічна риса може включати, але не обмежується цими, наприклад, толерантність до гербіцидів, боротьбу з комахами, модифікування врожайності, стійкість до хвороб, стійкість до патогена, модифікування росту і розвитку рослини, модифікований вміст крохмалю, модифікований вміст олії, модифікований вміст жирних кислот, модифікований вміст білка, модифіковане дозрівання плодів, покращене харчування тварин і людини, виробництво біополімерів, стійкість до стресових факторів навколишнього середовища, фармацевтичні пептиди, поліпшені властивості для переробки, поліпшення смаку, корисне виробництво гібридного насіння, покращене виробництво волокна і бажане виробництво біопалива.

[00064] Приклади генів, які представляють агрономічний інтерес, відомих у цій галузі техніки, включають стійкість до гербіцидів (патенти США № 6803501, 6448476, 6248876, 6225114, 6107549, 5866775, 5804425, 5633435 та 5463175), підвищення врожайності (патенти США № USRE38446, 6716474, 6663906, 6476295, 6441277, 6423828, 6399330, 6372211, 6235971, 6222098 та 5716837), боротьба з комахами (патенти США № 6809078, 6713063, 6686452, 6657046, 6645497, 6642030, 6639054, 6620988, 6593293, 6555655, 6538109, 6537756, 6521442, 6501009, 6468523, 6326351, 6313378, 6284949, 6281016, 6248536, 6242241, 6221649, 6177615, 6156573, 6153814, 6110464, 6093695, 6063756, 6063597, 6023013, 5959091, 5942664, 5942658, 5880275, 5763245 та 5763241), стійкість до грибкових захворювань (патенти США № 6653280, 6573361, 6506962, 6316407, 6215048, 5516671, 5773696, 6121436, 6316407 та 6506962), стійкість до вірусів (патенти США № 6617496, 6608241, 6015940, 6013864, 5850023 та 5304730), стійкість до нематоди (патент США № 6228992), стійкість до бактеріальних захворювань (патент

США № 5516671), ріст і розвиток рослин (патенти США № 6723897 і 6518488), накопичення крохмалю (патенти США № 6538181, 6538179, 6538178, 5750876, 6476295), виробництво модифікованих олій (патенти США № 6444876, 6426447 та 6380462), підвищена продукція олій (патенти США № 6495739, 5608149, 6483008 та 6476295), модифікований вміст жирних кислот (патенти США № 6828475, 6822141, 6770465, 6706950, 6660849, 6596538, 6589767, 6537750, 6489461 та 6459018), підвищена продукція білків (патент США № 6380466), дозрівання плодів (патент США № 5512466), покращене харчування тварин і людини (патенти США № 6723837, 6653530, 6541259; 5985605 та 6171640), біополімери (патенти США № USRE37543, 6228623 та 5958745, і 6946588), стійкість до стресових факторів навколишнього середовища (патент США № 6072103), фармацевтичні пептиди і пептиди, які секретуються (патенти США № 6812379, 6774283, 6140075 та 6080560), поліпшені властивості для переробки (патент США № 6476295), поліпшена засвоюваність (патент США № 6531648), з низьким вмістом рафінози (патент США № 6166292), промислове виробництво ферменту (патент США № 5543576), покращений смак (патент США № 6011199), фіксація азоту (патент США № 5229114), виробництво гібридного насіння (патент США № 5689041), виробництво волокна (патенти США № 6576818, 6271443, 5981834 та 5869720) та виробництво біопалива (патент США № 5998700).

[00065] В альтернативному варіанті ген, який представляє агрономічний інтерес, може вплинути на вищезгадані характеристики рослини або фенотипи шляхом кодування молекули РНК, яка спричиняє спрямовану модуляцію експресії ендегенного гена, наприклад, через антисмислові (див., наприклад, патент США 5107065), інгібіторні РНК ("РНК-інтерференції", які включають модуляцію експресії генів за допомогою мікроРНК-, міРНК-, транс-діючих міРНК- та фазових малих РНК-опосередкованих механізмів, наприклад, як описано в опублікованих заявках США 2006/0200878 і 2008/0066206 та в заявці на патент США 11/974469), або косупресорно-опосередковані механізми. РНК також може бути каталітичною молекулою РНК (наприклад, рибозимом або рибосвітчем, див., наприклад, опубліковану заявку США 2006/0200878), розробленою для відщеплення бажаного ендегенного продукту мРНК. У цій галузі техніки відомі способи для розробки та введення генетичних конструкцій в клітину, таким чином, що молекула ДНК, яка транскрибується, транскрибується в молекулу здатну викликати супресію гена.

[00066] Експресія молекули ДНК, яка транскрибується, у клітині рослини також може бути використана для супресії шкідників рослин, які харчуються клітинами рослини, наприклад, композиції, виділені з твердокрилих комах-шкідників, і композиції, виділені з нематодних шкідників. Шкідники рослин включають, але не обмежуються цими, членистоногих шкідників, нематодних шкідників та грибкових або мікробних шкідників.

Селективні маркери

[00067] Селективні маркерні трансгени також можуть бути використані з регуляторними елементами відповідно до цього винаходу. Використаний у цьому документі термін "селективний маркерний трансген" відноситься до будь-якої молекули ДНК, яка транскрибується, чия експресія в трансгенній рослині, тканини або клітині, або відсутність таких, може піддаватись скринінгу або підраховуватись якимось чином. Селективні маркерні гени і пов'язані з ними методи відбору та скринінгу, призначені для використання винаходу на практиці, відомі у цій галузі техніки і включають, але не обмежуються цими, молекули ДНК, які транскрибуються, котрі кодують бета-глюкуронідазу (GUS), зелений флуоресцентний білок (GFP), білки, які надають стійкості до антибіотиків і білки, які надають стійкості до гербіцидів.

β-глюкуронідаза

[00068] Ген β-глюкуронідази (GUS), який виділено з *Escherichia coli* K-12, являє собою один з найбільш широко використовуваних генів для звітів з біотехнології рослин. Ген GUS *E. coli*, uidA, являє собою частину оперона GUS на бактеріальній хромосомі. Його індукують широким спектром β-D-глюкуронідів. Фермент GUS являє собою екзогідролазу, яка каталізує гідроліз β-D-глюкуронідів на D-глюкуронову кислоту та аглікон. *E. coli* живе в травному тракті хребетних, включаючи людину. Хребетні використовують шлях глюкуронування для детоксикації ксенобіотиків та ендегенних сполук, таких як відходи, стероїди, аліфатичні спирти, феноли, карбонові кислоти, цукор та інші різні метаболіти. Глюкуронування залучає до кон'югування з D-глюкуроною кислотою. Це відбувається головним чином у печінці, але також відбувається в інших тканинах та органах, таких як нирки, надниркові залози, шлунково-кишковий тракт. Глюкуронова кислота, може бути використана в *E. coli*, в якості основного джерела вуглецю та енергії. Отже, білок GUS *E. coli* являє собою засіб, за допомогою якого бактерії можуть руйнувати продукти шляхом глюкуронування в травному тракті хребетних з отриманням глюкуронової кислоти в якості джерела вуглецю та енергії. Аглікони, які також вивільняються

GUS ферментом, як правило, не розкладаються бактеріями, але використовується для трансферу D-глюкуронової кислоти (Gilissen et al., Transgenic Research, 7: 157-163, 1998).

[00069] Використання гена β -глюкуронідази *E. coli* в якості репортера було вперше описане Jefferson та ін. (Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 8447-8451, 1986) та надалі її застосовували в практично тому ж вигляді, в якому була вперше представлена. Ген GUS використовується для моніторингу експресії генів рослин та часто використовується для опису промоторів або інших експресійних елементів. Тим не менш, деякі рослинні промотори експресують на дуже низькому рівні, та можуть бути не визначеними з використанням аналізу на основі GUS. Ці промотори, які більш слабо експресують, можуть бути корисні для розвитку трансгенних культур з бажаними ознаками, такими як підвищення врожайності.

[00070] На початку розвитку трансгенних рослин сільськогосподарських культур найбажанішими були промотори, які забезпечували високу конститутивну експресію. Такі конститутивні промотори, які були отримані з геномів вірусів рослин, таких як вірус мозаїки цвітної капуста і вірус мозаїки ранника, були використані для контролю трансгенів, на які покладено толерантність до гербіцидів або стійкість до комах. У галузі біотехнології рослин за своєю складністю збільшується розробка нових трансгенних рис, які вимагають більш специфічних патернів експресії або більш низьких рівнів експресії. Надлишкова експресія в невідповідних рослинних тканинах може призвести до небажаних ефектів у трансформованій рослині. Наприклад, зміщена експресія (експресія гена в аномальному місці в організмі) генів ферментів в рослинах може призвести до зменшення бажаного кінцевого продукту через недостачу попередника в точці розгалуження метаболічного шляху (Iwase et al., Plant Biotech. 26: 29-38, 2009).

[00071] Так як транскрипційні фактори (TFs), в нормі, виступають в якості основних регуляторів клітинних процесів, вони, як очікується, будуть відмінно підходити для модифікації складних ознак культурних рослин, та TF-технологія, ймовірно, будуть помітною частиною наступного покоління ефективних біотехнологічних культур. TF-технології часто вимагають оптимізації, як зниження небажаних побічних ефектів, таких як затримка росту, так і підвищення бажаних ознак до рівня, при якому вони мають комерційну цінність. Оптимізація часто досягається зміною експресії трансгена TF. Тканеспецифічні, етап-специфічні, або індуковані промотори, а не звичайні конститутивні промотори, можуть бути використані для обмеження експресії трансгена у відповідних тканинах або за умов навколишнього середовища (Century et al., Plant Physiology, 147: 20-29, 2008).

[00072] Частково через ці зміни, існує необхідність у більш чутливому аналізі характеру експресії елементів для ідентифікації елементів експресії, які забезпечують необхідний рівень і характер експресії. Даний винахід пропонує поліпшення модифікованого кодону GUS-кодуючої послідовності, функціонально пов'язаної з промотором, які експресують краще, ніж нативна GUS-кодуюча послідовність *E. coli*, яка зазвичай використовується в цій галузі техніки. Покращений модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності може бути використаний для забезпечення більшої чутливості якісного та кількісного аналізу та дозволяє характеризувати промотори та інші елементи експресії, яка неможлива з нативною GUS-кодуючою послідовністю *E. coli*. Покращений модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності може бути використаний для характеристики елементів експресії в однодольних та дводольних рослинах. Однодольні рослини, які використовували в практичній реалізації цього винаходу, включають, але не обмежуються ними, кукурудзу (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum* spp.), просо, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), пальчасте просо (*Eleusine coracana*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), овес (*Avena sativa*), тритикале, жито (*Secale cereale*), росичку (*Digitaria*), цибулю (*Allium* spp.), ананас (*Ananas* spp.), газонну траву, цукрову тростину (*Saccharum* spp.), пальми (*Arecaceae*), бамбук (*Bambuseae*), банани (*Musaceae*), імбирні (*Zingiberaceae*), лілії (*Lilium*), нарциси (*Narcissus*), півники (*Iris*), амарилліси, орхідеї (*Orchidaceae*), канни, дзвіночки (*Hyacinthoides*) та тюльпани (*Tulipa*). Дводольні рослини, які використовували в практичній реалізації цього винаходу, включають, але не обмежуються ними, сою (*Glycine max*), дику сою (*Glycine soja*), бавовник (*Gossypium*), томати (*Solanum lycopersicum*), перець (*Piper*), гарбуз (*Cucurbita*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолю (*Phaseolus*), нут (*Cicer arietinum*), соняшник (*Helianthus annuus*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), кінву, гречку посівну (*Fagopyrum esculentum*), ріжкове дерево (*Ceratonia siliqua*), буряк (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*) та огірок (*Cucumis sativus*).

Трансформація клітин

[00073] Винахід також спрямовується до способу отримання трансформованих клітин та рослин, які містять один або більше регуляторних елементів, функціонально пов'язаних з молекулою ДНК, яка транскрибується.

5 [00074] Термін "трансформація" відноситься до введення молекули ДНК до реципієнтного хазяїна. Використаний у цьому документі термін "хазяїн" відноситься до бактерій, грибів або рослин, включаючи будь-які клітини, тканини, органи, або до нащадків бактерій, грибів або рослин. Тканини та клітини рослин, які представляють особливий інтерес, включають протопласти, калюс, корені, бульби, насіння, стебла, листя, паростки, зав'язі та пилок.

10 [00075] Використаний у цьому документі термін "трансформований" відноситься до клітини, тканини, органу або організму, в який молекула чужорідної ДНК, така як генетична конструкція, була введена. Введена молекула ДНК може бути інтегрована в геномну ДНК клітини, тканини, органу або організму реципієнта таким чином, що введена молекула ДНК успадковується надалі у нащадків. "Трансгенна" або "трансформована" клітина або організм також може включати нащадків клітини або організму і нащадків, отриманих в результаті програми розмноження з використанням такого трансгенного організму як батьківської форми при схрещуванні, та проявляє змінений фенотип як результат присутності чужорідних молекул ДНК. Введена молекула ДНК також може бути тимчасово введеною в клітину-реципієнт таким чином, що введена молекула ДНК не успадковується надалі у нащадків. Термін "трансгенний" відноситься до бактерії, гриба або рослини, які містять одну або більше гетерологічних молекул ДНК.

20 [00076] Існує багато способів, добре відомих фахівцям у цій галузі техніки, для введення молекули ДНК у клітини рослин. Процес, як правило, включає етапи вибору відповідної клітини-хазяїна, трансформації клітини-хазяїна вектором та отримання трансформованої клітини-хазяїна. Методи та матеріали для трансформації клітин рослин через введення рослинної генетичної конструкції у геном рослин, у реалізації винаходу на практиці, можуть включати будь-який із відомих і показаних способів. Відповідні способи включають, але не обмежуються цими, бактеріальну інфекцію (наприклад, *Agrobacterium*), бінарні БШХ вектори, пряме перенесення ДНК (наприклад, ПЕГ-опосередковану трансформацію, поглинання ДНК, опосередковане висушуванням/інгібуванням, електропорацію, перемішування із волокнами карбіду кремнію та прискорення частинок, вкритих ДНК) із числа інших.

30 [00077] Клітини-хазяїни можуть являти собою будь-яку клітину або організм, наприклад, клітину рослини, клітину водорості, водорості, клітину гриба, гриби, бактеріальну клітину чи клітинку комах. У конкретних варіантах реалізації цього винаходу клітини-хазяїни та трансформовані клітини можуть включати клітини культурних рослин.

35 [00078] Трансгенна рослина згодом може бути регенована із клітини трансгенної рослини відповідно до цього винаходу. Із використанням загальноприйнятих методів розмноження або самозапилення можна отримати насіння із цієї трансгенної рослини. Таке насіння та отримана в результаті рослини-нащадок, вирощена із такого насіння, будуть містити рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу і, отже, будуть трансгенними.

40 [00079] Трансгенні рослини відповідно до цього винаходу можуть бути самозапилені, для надання насіння гомозиготних трансгенних рослин за винаходом (гомозиготних за рекомбінантною молекулою ДНК), або схрещені з нетрансгенними рослинами або іншими трансгенними рослинами, для надання насіння гомозиготних трансгенних рослин за винаходом (гомозиготних за рекомбінантною молекулою ДНК). Як гомозиготні, так і гетерозиготні трансгенні рослини згадуються в цьому документі як "рослини-нащадки". Рослини нащадки являють собою трансгенні рослини, які походять від вихідної трансгенної рослини і містять рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Насіння, отримане з використанням трансгенної рослини відповідно до цього винаходу, може бути зібране і використане для вирощування поколінь трансгенних рослин, тобто рослин-нащадків відповідно до цього винаходу, які включають генетичну конструкцію цього винаходу та експресію гена, який представляє агрономічний інтерес. Описи способів розмноження, які зазвичай використовуються для різних культур, можуть бути знайдені в одному із декількох книжкових посилань, див., наприклад, Allard, Principles of Plant Breeding, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, Principles of Crop Improvement, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, Plant breeding Perspectives, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2nd Edition, Monograph, 16: 249 (1987); Fehr, Principles of Variety Development, Theory and Technique, (Vol. 1) і Crop Species Soybean (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

50 [00080] Трансформовані рослини можуть бути проаналізовані на наявність цільового гена або генів і за рівнем експресії та/або профілем, наданим регуляторними елементами за винаходом. Фахівцям у цій галузі техніки відомі численні способи, доступні для аналізу

трансформованих рослин. Наприклад, методи аналізу рослин включають, але не обмежуються цими, Саузерн блот або нозерн блот, підходи на основі ПЛР, біохімічні аналізи, способи фенотипічного скринінгу, польові апробації та імунодіагностичні аналізи. Експресія молекули ДНК, яка транскрибується, може бути виміряна з використанням реагентів TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) та за способами, описаним виробником, і за кількістю циклів ПЛР, визначеною з використанням TaqMan® Testing Matrix. В альтернативному варіанті реагенти Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) та способи, описані виробником, можуть бути використані для оцінки експресії трансгена.

[00081] Винахід також відноситься до частин рослини відповідно до цього винаходу. Частини рослин включають, але не обмежуються цими, листя, стебла, корені, бульби, насіння, ендосперм, сім'ябруньку та пилоск. Частини рослин відповідно до цього винаходу можуть бути життєздатними, нежиттєздатними, здатними та/або не здатними до регенерації. У винаході також включені та запропоновані трансформовані клітини рослини, що містять молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Трансформовані клітини або клітини трансгенної рослини за винаходом включають клітини здатні та/або не здатні до регенерації.

[00082] Винахід може бути більш легко зрозумілим через посилання на наступні приклади, які запропоновані в якості ілюстрації і не призначаються для обмеження винаходу, якщо це не встановлено. Фахівцям у цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, що способи, описані в наступних прикладах, являють собою способи, виявлені авторами винаходу, для нормального функціонування при застосуванні винаходу. Однак фахівцям у цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, у висвітленні цього опису, що численні зміни можуть бути зроблені в конкретних описаних варіантах реалізації винаходу, і, як і раніше, вийде схожий або аналогічний результат без відступу від сутності та обсягу винаходу, тому все, що має значення, розміщується далі або показується у доданих графічних матеріалах і повинно інтерпретуватися в ілюстративному, а не обмежуючому розумінні.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Ідентифікація та клонування регуляторних елементів

[00083] Нові RCc3 промотори та лідери були ідентифіковані та клоновані з геномної ДНК однодольних видів: сльозника (*Coix lacryma-jobi*), пальчатки кров'яної (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.), міскантусу китайського (*Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*), тріпсакума дводомного (*Tripsacum dactyloides*) та цукрової тростини (*Saccharum officinarum*). Білок RCc3 належить надродині проламінів, яка отримала свою назву від спирторозчинного проліну та багатого на глютамін білка зернових. Надродина проламінів (також називається інгібітором протеази/білка-переносника ліпідів/збереження насіння родини 2S альбуміну; Pfam ID: PF00234) являє собою одне з найпоширеніших надродин білків в геномі рослини. Членами надродини проламінів ряснують фрукти, горіхи, насіння та овочі у різноманітних рослин. Вони, як відомо, виявляють різноманітні функції: зберігання та захист насіння, зв'язування або передача ліпідів, та інгібування ферментів. Білки-переносники ліпідів (LTPs) належать до надродини проламінів та експресуються в різних рослинних тканинах. Білок рису RCc3 являє собою LTP, що експресується в коренях рису, хоча і не всі білки LTP корінь-специфічні.

[00084] Праймери ампліфікації ДНК (які представлені у SEQ ID №: 25-28) були розроблені з використанням кодуючих послідовностей двадцяти чотирьох (24) LTP білків з *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* та *Brachypodium distachyon*. Праймери ампліфікації були використані з Genome Walker™ (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), бібліотеками, побудованими для клонування 5' області відповідній послідовності геномної ДНК.

[00085] Біоінформативний аналіз проводили для виявлення регуляторних елементів у межах ампліфікованої ДНК. Використовуючи результати цього аналізу, регуляторні елементи були визначені в межах послідовностей ДНК та праймерів, розроблених для ампліфікації регуляторних елементів. Відповідну молекулу ДНК для кожного регуляторного елемента ампліфікували з використанням стандартних умов полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із праймерами, що містять унікальні сайти рестрикції, і геномної ДНК, виділеної з *C. lacryma-jobi*, *D. sanguinalis* (L.) Scop., *M. sinensis* f. *gracillimus*, *T. dactyloides* та *S. officinarum*. Отримані фрагменти ДНК були ліговані в вектори та секвеновані.

[00086] Послідовності ДНК, ідентифікованих промоторів та лідерів RCc3 наведені в таблиці 1. Промоторні послідовності запропоновані в цьому документі в якості SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19. Лідерні послідовності запропоновані в цьому документі як SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 та 20.

Таблиця 1

Промоторні та лідерні послідовності RCc3, ізольовані з різних видів трав

Опис послідовності	SEQ ID №:	Рід/вид
P-Cl.RCc3:3	1	Coix lacryma-jobi
L-Cl.RCc3:2	2	Coix lacryma-jobi
P-Ds.RCc3_1:1	3	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_1:1	4	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_2:1	5	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_2:1	6	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_3:1	7	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_3:1	8	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-MISgr.RCc3_1:1	9	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3_1:1	10	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-MISgr.RCc3-2:2	11	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3-2:1	12	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-Td.RCc3_1:1	13	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_1:1	14	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_2:1	15	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_2:1	16	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_3:1	17	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_3:1	18	Tripsacum dactyloides
P-So.RCc3:2	19	Saccharum officinarum
L-So.RCc3:2	20	Saccharum officinarum

Приклад 2

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS в трансгенній кукурудзі

5 [00087] Рослини кукурудзи були трансформовані із застосуванням векторів, спеціальних бінарних плазмідних конструкцій, що містять промотор RCc3, функціонально пов'язаний з його нативною лідерною послідовністю RCc3, яка керує експресією трансгенної (GUS) β-глюкуронідази. Отримані трансформовані рослини аналізували на GUS-експресію білка.

10 [00088] Вектори, які використовували в цих експериментах, були сконструйовані з використанням способів клонування, які добре відомі у цій галузі техніки. Отримані вектори, що містять праву граничну область із *A. tumefaciens*; першу експресійну касету для аналізу промоторної/лідерної послідовності RCc3, функціонально пов'язаної з кодоном модифікованої GUS-кодуючої послідовності, яка містить смисловий інтрон GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:3 (SEQ ID №:29), котра функціонально пов'язана з 5' кінцем 3' НТО із гена S- аденозілметіонін синтетики 1

15 проса італійського (T-SETit.Ams1-1: 1: 1, SEQ ID №: 159); другу експресійну касету, використану для відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкості к гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) та ліву граничну область із *A. tumefaciens*. Отримані плазмідні були використані для трансформації рослин кукурудзи з використанням методів, відомих в цій галузі техніки. Експресія GUS, обумовлена новими промоторами та лідерами RCc3, була зрівняна з експресією, керованої гомологами промоторів та лідерів RCc3 проса італійського та рису. У

20 таблиці 2 наведені позначення плазмід, промоторні та лідерні послідовності RCc3,i SEQ ID №.

Таблиця 2

Бінарні плазмиди для трансформації рослин
та RCc3-асоційовані промоторні/лідерні послідовності

Плазмідна кострукція	Опис послідовності промотора	SEQ ID №:	Опис послідовності лідера	SEQ ID №:
pMON264146	P-CI.RCc3:3	1	L-CI.RCc3:2	2
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	L-Ds.RCc3_1:1	4
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	L-Ds.RCc3_2:1	6
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	L-Ds.RCc3_3:1	8
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	L-MISgr.RCc3_1:1	10
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	L-MISgr.RCc3-2:1	12
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	L-Td.RCc3_1:1	14
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	L-Td.RCc3_2:1	16
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	L-Td.RCc3_3:1	18
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	L-So.RCc3:2	20
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10	21	L-SETit.Rcc3-1:1:2	22
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24	23	L-Os.Rcc3-1:1:2	24

[00090] Рослини були трансформовані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, відомих в цій області техніки та описаних в публікації заявки на патент США 2009/0138985.

[00090] Гістохімічний аналіз GUS був використаний для якісного аналізу експресії трансформованих рослин. Ділянки цілісної тканини інкубували з GUS забарвлюючим розчином X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-індоліл-бета-глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали та перевіряли візуально за синім забарвленням. GUS активність якісно визначали шляхом прямої візуальної перевірки або перевірки під мікроскопом, використовуючи вибрані органи і тканини рослини. R₀ рослини були перевірені щодо експресії у коренях і листках, а також у пиляку, маточкових стовпчиках та насінні, що розвивається, та зав'язі через 21 день після запилення (21 ДПЗ).

[00091] Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил-β-D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях pH, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить pH для кількісного вимірювання флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 365 нм, випромінювання - 445 нм з використанням Fluogomax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Micromax Reader, з встановленою шириною щілини: 2 нм - на збудження і 3 нм - на випромінювання. Середні значення експресії були надані в пмоль/мкг 4-MU білка/год.

[00092] Середнє значення експресії R₀ GUS для кожної трансформації було записано, та середній рівень експресії та стандартну помилку визначали на підставі вимірів зразків, отриманих з декількох подій трансформації.

Приклад 3

Енхансери, які походять від регуляторних елементів.

[00093] Енхансери походять із промоторних елементів, запропонованих у цьому винаході, таких, які представлені в SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19. Ці енхансерні елементи можуть містити один або більше цис регуляторних елементів, які у разі, коли вони функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором, можуть підвищувати або модулювати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, або забезпечувати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, в

конкретному типі клітин або органі рослини, або у конкретній часовій точці у розвитку або циркадному ритмі. Енхансери створюють шляхом видалення ТАТА-боксу або функціонально подібних елементів та будь-якої послідовності ДНК, яка знаходиться нижче, із промоторів, що дозволяє ініціювати транскрипцію з промоторів, описаних у цьому документі, як описано вище, в

5 тому числі їхніх фрагментів, з яких видалені ТАТА-бокс або функціонально подібні елементи та послідовність ДНК, яка знаходиться нижче від ТАТА-боксу.

[00094] Енхансерні елементи можуть бути отримані з промоторних елементів, описаних у цьому документі, і клоновані з використанням способів, відомих у цій галузі техніки, таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом

10 або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором. Енхансерні елементи також можуть бути клоновані таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом, отриманим з організму іншого роду, або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, отриманими з організмів іншого роду

15 організму того самого роду, які функціонально пов'язані з промотором, отриманим з організму того самого або іншого роду, в результаті чого утворюється химерний регуляторний елемент. Експресійний вектор з геном GUS для трансформації рослин створений із використанням способів, відомих у цій галузі техніки, подібно генетичним конструкціям, описаним у попередніх прикладах, в яких кінцеві рослинні експресійні вектори містять праву граничну область з *A. tumefaciens*;

20 першу експресійну касету для тестування регуляторного або химерного регуляторного елемента, яка містить регуляторний або химерний регуляторний елемент, функціонально пов'язаний з інтроном, отриманим із білка теплового шоку HSP70 з *Z. mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID №: 38) або з будь-яким з інтронів, представлених у цьому документі, або з будь-яким іншим інтроном, функціонально пов'язаним із кодуючою послідовністю GUS, яка або

25 має інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 32) або не має інтрону (CR-Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat), SEQ ID №: 31), котра функціонально пов'язана з 3' НТО нопалінсинтази з *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID №: 39) або з 3' НТО із гена білка перенесення ліпідів рису (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID №: 40), другу касету для селекції трансгена, використану для відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкість до гербіциду гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) або, в альтернативному варіанті, до антибіотика канаміцину (під контролем промотору актину 1 рису) і ліву граничну область з *A. tumefaciens*. Отримані плазмідні використовують для трансформації рослин кукурудзи або інших рослин цього роду за допомогою способів, описаних раніше, або інших способів, які відомі у цій галузі техніки. В альтернативному варіанті клітини протопластів, отримані з кукурудзи або інших

35 рослин роду, трансформують за допомогою способів, відомих у цій галузі техніки, для проведення аналізу транзйентної експресії

[00095] Експресія гена GUS під контролем регуляторного елемента, який містить один або більше енхансерів, оцінюється при випробуваннях рослин зі стабільною трансформацією або із транзйентною експресією для визначення впливу енхансерного елемента на експресію трансгена. Модифікації одного або більше енхансерних елементів або дуплікація одного або

40 більше енхансерних елементів здійснюється на основі емпіричних досліджень та кінцевої регуляції експресії генів, яка спостерігається при використанні композиції кожного регуляторного елемента. Зміна відносних позицій одного або більше енхансерів у кінцевому регуляторному або химерному регуляторному елементі може впливати на транскрипційну активність або специфічність регуляторного або химерного регуляторного елемента і визначається емпірично,

45 для визначення найкращих енхансерів для бажаного профілю експресії трансгена в межах рослини кукурудзи або рослини іншого роду.

Приклад 4

Підвищення аналітичної чутливості при використанні кодон-модифікованої β -глюкоронідази (GUS)

50

[00096] Промотори рослин часто експресують на рівнях, які нижче нормального рівня виявлення багатьох кількісних аналізів, але їх характеристики експресії можуть бути дуже цінними для експресії певних трансгенів. Раніше в біотехнології рослин промотори, які давали високу конститутивну експресію були бажаними та їх використовували для регуляції

55 транскрипції молекул ДНК, які відповідали за конкретну ознаку, що вимагає високу конститутивну експресію, таку як стійкість до гербіцидів або стійкість до комах. Ці висококонститутивні промотори часто створюють з геномів вірусів рослин, а не геномів рослин, наприклад, промотори 35S, отримані з вірусу мозаїки цвітної капусти та вірусу мозаїки ранника. Примітно, що в деяких випадках, висока конститутивна експресія генів певних молекул ДНК, які

60 транскрибуються, може призвести до негативних наслідків, таких як сайленсінг трансгенів off-

phenotypes або yield drag. Наприклад, високий рівень експресії гена GUS в трансгенних рослинах цукрової тростини в яких використовуються два різних промотора убівітину, отримані з цукрової тростини, а також з кукурудзи, призводить до посттранскрипційного сайленсінга гена GUS (Wei et al., J. Plant Physiol. 160: 1241-1251, 2003).

5 [00097] Крім того, останнім часом необхідні промотори, які демонструють конкретні патерни експресії або підвищують експресію в конкретних тканинах рослини. Наприклад, ектопічна експресія генів ферментів в рослинах може призвести до зниження бажаного кінцевого продукту через недостачу попередника в точці розгалуження метаболічного шляху (Iwase et al., Plant Biotech. 26:29-38, 2009). У цих випадках бажано використовувати промотор, який експресує функціонально пов'язану молекулу ДНК, яка транскрибує, в правильних типах тканин або клітин, або в певному вікні розвитку. Промотори, отримані з геномів рослин, часто демонструють експресію в конкретних клітинах, тканинах або на необхідному етапі. Через більш низькі рівні експресії цих рослинних промоторів, аналізи експресії часто вимагають використання енхансерів, для підвищення рівня експресії, щоб забезпечити виявлення в кількісному аналізі. 10 Тим не менше, використання таких енхансером часто змінює загальний характер експресії.

15 [00098] Підвищення експресії гена-репортера, який використовують в аналізі, усуває необхідність у посиленні промотора рослинного походження та, таким чином, забезпечує більш точну оцінку характеру експресії, наданої промотором. Цей приклад демонструє використання модифікованого кодону GUS-кодуючої послідовності, з метою поліпшення кількісної чутливості аналізу при дослідженні декількох різних EXP, що складаються з промоторної послідовності, функціонально пов'язаної 5' кінцем з лідерною послідовністю, функціонально пов'язаної 5' кінцем з послідовністю інтрона.

20 [00099] Рослини кукурудзи були трансформовані зі застосуванням рослинних векторів, що містять послідовності EXP, які контролюють експресію трансгена нативної β -глюкоронідази (GUS) *Escherichia coli*, так і кодон-модифікованим трансгеном β -глюкуронідази (GUS.nno), та отримані рослини були проаналізовані на експресію GUS білка. Кодуючі EXP та GUS послідовності клонували в бінарні плазмідні конструкції зі застосуванням способів, відомих в цій галузі техніки.

25 [000100] Отримані експресійні рослинні конструкції містять праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну касету для аналізу чутливості двох послідовностей, що кодують GUS, що складаються з EXP, функціонально пов'язаної з будь-якою нативною послідовністю *E. coli*, що кодує GUS (CR-Ec.uidA-1: 1: 4 (GUS.nat), SEQ ID №: 31) або кодон-модифікованої послідовності, що кодує GUS (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1 (GUS.nno), SEQ ID № 30), функціонально пов'язану 5' кінцем з 3' НТО гена білка-переносника ліпідів рису (T-Os.LTP-1: 1: 1, SEQ ID №: 35 40); друга трансгенна експресійна касета, яку використовували для відбору трансформованих рослинних клітин, які проявляють стійкість до гліфосату (яка керується промотором актину рису 1); та ліва гранична ділянку від *A. tumefaciens*. Фіг. 1A-1C ілюструють вирівнювання між нативною послідовністю, що кодує GUS (CR-Ec.uidA-1: 1: 4), та кодон-модифікованою послідовністю, що кодує GUS (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1). Ідентичні нуклеотиди у вирівнюванні відзначені зірочкою. Кодон-модифікована послідовність, що кодує GUS, на 77,9 % ідентична нативній послідовності, що кодує GUS, та була розроблена для кращої експресії в рослині.

45 [000101] Три (3) різні класи EXP були використані, при цьому кожен проявляв специфічний патерн експресії. EXP EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK: 1: 1 (SEQ ID №: 34) та EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK: 1: 2 (SEQ ID №: 35) проявляли профіль експресії в листках кукурудзи та були по суті ідентичні, за винятком вставки в п'ять нуклеотидів 5' CCGGA-3' в позиції 1408-1412 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK: 1: 2. Послідовність EXP EXP-CaMV.35S-ENH+Os.Rcc3+Zm.DnaK: 1: 5 (SEQ ID №: 36) забезпечує підвищений профіль експресії в коренях кукурудзи. Послідовність EXP EXP-Zm.UbqM1: 1: 2 (SEQ ID №: 37) забезпечує висококонститутивний профіль експресії у кукурудзи. Отримані плазмідні конструкції були використані для трансформації рослин кукурудзи зі застосуванням способів, відомих в цій галузі техніки. У таблиці 3 наведені позначення плазмідних конструктів і відповідні послідовності EXP та GUS. 50

Таблиця 3

Плазмідні конструкції, послідовності EXP та патерни експресії, які використовували для порівняння нативних GUS та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей

Плазмідна конструкція	Опис EXP	Патерн експресії	SEQ ID №:	GUS	SEQ ID №:
pMON122599	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2	Лист	35	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122595	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1	Лист	34	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144050	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Посилений в корені	36	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122597	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Посилений в корені	36	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144051	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Конститутивний	37	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122598	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Конститутивний	37	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30

[000102] У деяких випадках рослини були трансформовані за допомогою агробактеріальних способів трансформації, відомих у цій області техніки та в публікації заявки на патент США 2009/0138985.

[000103] Гістохімічний аналіз GUS був використаний для якісного аналізу експресії трансформованих рослин. Ділянки цілісної тканини інкубували з GUS забарвлюючим розчином X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-індоліл-бета-глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали та перевіряли візуально за синім забарвленням. GUS активність якісно визначалася шляхом прямої візуальної перевірки або перевірки під мікроскопом, використовуючи вибрані органи та тканини рослини. R₀ рослини були перевірені щодо експресії у коренях і листках, а також у пиляку, приймочки та насінні, що розвивається, та зав'язі через 21 день після запилення (21 ДПЗ).

[000104] Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил-β-D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях pH, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить pH для кількісного вимірювання флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 365 нм, випромінювання - 445 нм з використанням Fluogomax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Micromax Reader, з встановленою шириною щілини: 2 нм - на збудження і 3 нм - на випромінювання.

[000105] Середня експресія GUS в R₀, яку спостерігали для кожної трансформації, представлена нижче в таблицях 4, 5 та 6.

Таблиця 4

Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з профілем експресії в листках

Тканина	pMON122599 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122595 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	798	1807
V7 Лист	230	1863
VT Лист	508	2097
V4 Корінь	0	0
V7 Корінь	0	0
VT Корінь	14	0
Пильник	95	1056
Маточка	154	1590
21ДПЗ Зародок	24	31
21 ДПЗ Ендосперм	18	61

Таблиця 5

Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з посиленою експресією в коріннях

Тканина	pMON144050 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122597 EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	0	50
V7 Лист	0	51
VT Лист	0	82
V4 Корінь	26	486
V7 Корінь	16	257
VT Корінь	18	343
Пильник	19	67
Маточка	0	12
21ДПЗ Зародок	14	125
21 ДПЗ Ендосперм	17	45

Таблиця 6

Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з конститутивним рівнем експресії

Тканина	pMON144051 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122598 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	988	3327
V7 Лист	963	2771
VT Лист	1777	3787
V4 Корінь	693	2149
V7 Корінь	402	1443
VT Корінь	776	3170
Пильник	2247	3190
Маточка	975	3324
21ДПЗ Зародок	511	894
21 ДПЗ Ендосперм	791	2298

[000106] Як видно з таблиць 4, 5 та 6, існує можливість підвищити чутливість кількісного аналізу з використанням кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності в порівнянні з нативною кодуючою послідовністю GUS. Деякі зміни між популяціями GUS.nno та GUS.nat слід очікувати, оскільки експресія може залежати від вставки ділянок Т-ДНК; однак загальна тенденція чутливості показує набагато більше чутливості, при використанні GUS.nno. GUS, яка контролюється EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK: 1: 1 (SEQ ID №: 34) та EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK: 1: 2 (SEQ ID №: 35), продемонстрували в 2,26-8,1 рази більшу чутливість із застосуванням GUS.nno, ніж у випадку з GUS.nat. Аналогічним чином, забезпечується посилена експресія в корені EXP-CaMV.35S-Enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK: 1:5 (SEQ ID №: 36) в 16,06-19,06 рази за допомогою GUS.nno, ніж GUS.nat, завдяки чому кодон-модифікована GUS-кодируюча послідовність ідеально підходить для скринінгу кореневих промоторів, особливо тих, які експресують на низькому рівні, та можуть демонструвати рівень GUS на рівні або нижче фонових рівнів при використанні нативної GUS послідовності, кодуючої 8.1 кратно більшу чутливість за допомогою GUS.nno. Висококонститутивний профіль експресії, який забезпечується EXP-Zm.UbqM1: 1: 2 (SEQ ID №: 37), продемонстрував у 1,42-4,09 рази вищий рівень з використанням GUS.nno, у порівнянні з GUS.nat.

[000107] Якісна GUS-реакція була більш чутлива і краще спостерігалася при використанні кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності. Як правило, якісні реакції фарбування менш чутливі, ніж кількісні аналізи. Використання кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності забезпечує кращі та більш однорідні мікроскопічні перевірки забарвлених тканин. Наприклад, в тканинах коренів, де GUS керується EXP-CaMV.35S-Enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK: 1: 5 (SEQ ID №: 36), гістохімічне фарбування тканин, які трансформовані кодон-модифікованою GUS-кодуючою послідовністю, був більш вираженим та видимим у всіх зразках V7 кореня: корі, епідермісі, ендодермі, корневих волосках і кінчиках бічних коренів. На противагу цьому, GUS фарбування якісно не спостерігалася у відповідних V7 тканинах кореня, коли нативною GUS-кодуючою послідовністю керували за допомогою EXP-CaMV.35S-Enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK: 1: 5. Покращена кодон-модифікована GUS-кодируюча послідовність (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1, SEQ ID №: 30), забезпечує більшу чутливість аналізу та являю собою особливо цінну при вимірюванні експресії промоторів, які експресують на низькому рівні.

Приклад 5

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS в протопластах коріння та листків кукурудзи

[000108] Протопласти листків та коріння кукурудзи були трансформовані за допомогою векторів, що містять RCc3 промотор, функціонально пов'язаний з нативним лідером RCc3, який контролює експресію трансгена β -глюкуронідази (GUS), і в результаті трансформовані протопласти були проаналізовані на експресію білка GUS. RCc3 промоторні та лідерні послідовності були клоновані в бінарні плазмідні конструкції з використанням способів, відомих в цій області техніки та описаних раніше в Прикладі 2.

[000109] Також було побудовано дві плазмиди для використання при ко-трансформації та нормуванні даних, з використанням способів, відомих в цій галузі техніки. Кожна плазміда містила специфічну послідовність, що кодує люциферази, під контролем конститутивної послідовності EXP. Рослинний вектор pMON19437 містить експресійну касету з конститутивним промотором, функціонально пов'язаним з 5' інтроном, (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK: 1: 1, SEQ ID №: 41), функціонально пов'язаним з 5' кодуючою послідовністю люциферази світляка (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE: 1: 3, SEQ ID №: 42), функціонально пов'язаної з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39). Рослинний вектор pMON63934 містить експресійну касету з конститутивною послідовністю EXP (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID №: 44), функціонально пов'язаною з 5' кодуючою послідовністю люциферази реніли морської (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0: 0: 1, SEQ ID NO: 43), функціонально пов'язаною з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39).

[000110] Протопласти листків та коренів кукурудзи були трансформовані з використанням способу трансформації на основі ПЕГ, який добре відомий у цій галузі техніки. Клітини протопластів трансформували плазмідними ДНК pMON19437 та pMON63934 та плазмидами, представленими в таблиці 7, та інкубували протягом ночі у повній темряві. Надалі вимірювання як GUS, так і люциферази проводили шляхом внесення аліквот лізованих препаратів клітин, трансформованих як описано раніше, у два різних планшети із дрібними лунками. Один планшет використовували для вимірювання GUS, а другий планшет використовували для виконання подвійного аналізу люциферази з використанням системи подвійного аналізу репортеру люциферази (Promega Corp., Madison, WI; див., Наприклад, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02).

[000111] Чотири трансформації були виконані для кожного EXP або промотора + лідера + послідовності інтрона. Були визначені середні значення експресії для кожної послідовності EXP або промотора + лідера + послідовності інтрона з декількох зразків кожного експерименту з трансформації. Вимірювання зразків були проведені з використанням чотирьох повторностей для кожної трансформації генетичної конструкції (плазмиди) з послідовністю EXP або промотором + лідером + послідовністю інтрона. Фонова експресія GUS була визначена з використанням негативного контролю плазмідної конструкції, в якій був відсутній трансген GUS. Середні рівні експресії GUS та люциферази наведені в таблицях 7 (лист) і 8 (корінь). У цих таблицях значення люциферази світляків (наприклад, експресія pMON19437) наведені в стовпчику "FLUC", а значення люциферази реніли морської (наприклад, експресія pMON63934) наведені в стовпчику "RLUC." Також в таблицях 7 і 8 представлені середні показники GUS / FLUC і GUS / RLUC, які представляють собою міру відносної різниці показників сили експресії в аналізі протопластів.

Таблиця 7

Середні показники GUS, FLUC та RLUC,
отримані з трансформованих протопластів листа кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середня RLUC	Середня GUS /FLUC	Середня GUS/RLUC
pMON26 4146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	532806 4,75	105434	253107,5	50,73	21,15
pMON26 4148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149,5	5,23	2,28
pMON26 4088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	288355 5,75	129947,5	309268,5	22,33	9,45
pMON26 4107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	109378 5	124864,7 5	306178,75	8,70	3,55
pMON26 4186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	261383 9,75	128887,2 5	301412,75	20,45	8,83
pMON26 4187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	237070 6,25	149383,5	370443,75	15,95	6,53
pMON26 4049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	750658 5,75	150939,2 5	368035,5	50,15	20,88
pMON26 4050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	444725 4,25	155356,2 5	364604,5	28,78	12,40
pMON26 4147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	110011 8,75	153451	316691,5	7,13	3,48
pMON26 4166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	306204 5	143684,5	332394,5	21,55	9,45
pMON26 4108	P-SETit.Rcc3-1:1:10 L-SETit.Rcc3-1:1:2	21 22	147483	129834,2 5	300917,25	1,15	0,50
pMON26 4206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	184905, 25	171440,7 5	386387,25	1,08	0,50

Таблиця 8

Середні показники GUS, FLUC та RLUC, отримані
з трансформованих протопластів кореня кукурудзи

Плазмід- на кон- струк- ція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середн я RLUC	Середня GUS/FLUC	Серед ня GUS/R LUC
pMON26 4146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	185142, 3	18310	34502,5	10,18	5,43
pMON26 4148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	16306,5	17008	31233	0,98	0,53
pMON26 4088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	101603, 8	19201,25	43298	5,23	2,33
pMON26 4107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	29196	14483,5	34700,7 5	2,03	0,88
pMON26 4186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	87232	18411,75	44755,7 5	4,80	1,95
pMON26 4187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	510761, 5	19093,75	41948,5	26,98	12,30
pMON26 4049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	884517, 8	23881,75	55790	37,23	16,18
pMON26 4050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	91634,5	18385	43509,5	5,03	2,18
pMON26 4147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	50257,2 5	18716,75	34489	2,65	1,45
pMON26 4166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	508345, 3	22335,25	51655,7 5	22,98	10,13
pMON26 4108	P-SETit.Rcc3- 1:1:10 L-SETit.Rcc3- 1:1:2	21 22	8123	17750,75	37872,2 5	0,45	0,23
pMON26 4206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	336095, 3	17709,5	40179,5	19,65	8,63

[000112] Як показано в таблиці 7, все гомологи RCc3 промотора продемонстрували здатність контролювати експресію трансгена в протопластах листя кукурудзи. Деякі з гомологів RCc3 промотора контролюють експресію краще, ніж інші в цьому тесті, на підставі показників GUS / FLUC і GUS / RLUC. Надалі, як показано в таблиці 8 вище, всі гомологи RCc3 промотора продемонстрували здатність контролювати експресію трансгена в протопластах кореня кукурудзи в різному ступені.

Приклад 6

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS у трансгенній кукурудзі.

[000113] Рослини кукурудзи були трансформовані векторами, які містять RCc3 промотор, функціонально пов'язаний з його нативним RCc3 лідером, який контролює експресію трансгена β-глюкуронідази (GUS). Отримані трансформовані рослини були проаналізовані експресією GUS білка.

[000114] RCc3 промоторні та лідерні послідовності були клоновані в бінарні плазмідні конструкції з використанням способів, відомих в цій області техніки та таких, як описано раніше в Прикладі 2. Отримані бінарні плазмідні конструкції: pMON264146, pMON264148, pMON264088, pMON264107, pMON264186, pMON264187, pMON264049, pMON264050, pMON264147 та pMON264166. Рослини кукурудзи були стабільно трансформовані pMON264108 та pMON264206. Якісний та кількісний аналіз експресії GUS проводили, як описано в Прикладі 2.

Рослини аналізували на V4, V7 та VT стадіях розвитку. На R₁ і R₃ показаний відбір проб. Таблиця 9 показує середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи.

5

Таблиця 9

Середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SE Q ID №:	V4 лист	V4 корінь	V7 лист	V7 корінь	VT лист	VT корінь	VT квітка / пильники	R1 качани /маточкові вчипки	R3 21Д ПЗ зародок	R3 21Д ПЗ ендосперм
pMON2 64146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	25, 15	61 ,3 1	20,7 1	42,6 4	35, 96	95,1 9	298	125 ,12	21, 97	186, 52
pMON2 64148	P- Ds.RCc3_1:1 L- Ds.RCc3_1:1	3 4	48, 34	36 ,8 1	42,4 9	125, 25	69, 76	55,4 4	277,9 3	58	67, 08	115, 71
pMON2 64088	P- Ds.RCc3_2:1 L- Ds.RCc3_2:1	5 6	28, 31	51 ,1 8	59,2	149, 2	70, 93	158, 32	214,4 7	120 ,72	141 ,85	164, 68
pMON2 64107	P- Ds.RCc3_3:1 L- Ds.RCc3_3:1	7 8	67, 1	32 7, 44	85,0 2	365, 51	16 1,6 5	202, 17	787,2 5	103 ,63		
pMON2 64186	P- MISgr.RCc3_1:1 L- MISgr.RCc3_1:1	9 10	38, 66	40 ,2 5	39,7	139, 98	10 5,2 4	308, 24	406,3 8	239 ,35	118 ,54	196, 48
pMON2 64187	P- MISgr.RCc3-2:2 L- MISgr.RCc3-2:1	11 12	25, 9	19 3, 25	42,1 3	291, 5	48, 02	549, 37	87,89	41, 83		
pMON2 64049	P- Td.RCc3_1:1 L- Td.RCc3_1:1	13 14	28 3,8 6	23 8, 31								
pMON2 64050	P- Td.RCc3_2:1 L- Td.RCc3_2:1	15 16	51, 82	65 3, 38								

Таблиця 9

pMON2 64147	P- Td.RCc3_3:1 L- Td.RCc3_3:1	17 18	42, 49	55, 87	41,4 9	197, 51	11 7,7 7	282, 63	1182, 96	938 ,3	815 ,36	1240 ,92
pMON2 64166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	34, 11	21 5, 86	125, 91	855, 23	79, 33	237, 25	347,9 9	177 ,13		

[000115] Як показано в таблиці 9, всі гомологи RCc3 промотора контролювали експресію трансгена GUS в стабільно трансформованих рослинах кукурудзи. Крім того, кожен промотор мав унікальний характер експресії. Наприклад, експресію VT квітка/пильник відрізняли серед гомологів RCc3 промотора. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17), була найбільш високою для всіх спостережуваних промоторів, тоді як експресія, яку контролювали P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) була найнижчою, відносно експресії R1 качанів/маточкових стовпчиків, P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17) показала найвищий рівень експресії в цих тканинах і P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) показала найнижчий рівень експресії. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17), збільшена в тканинах, які розвиваються пізніше. Рівень експресії збільшувався в корені від стадії V4 до стадії VT та навіть перевищив VT квітки/пильника, R1 качанів/маточкових стовпчиків та R3 21ДПЗ зародка та ендосперму. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1, була найвищою серед гомологів RCc3 промотора в VT квітки/пильника, R1 качанів/маточкових стовпчиків та R3 21ДПЗ зародка та ендосперму.

[000116] Відносно експресії в листі та корені, деякі з гомологів RCc3 промотора продемонстрували більш високу експресію в корені по відношенню до експресії в листі. Таблиця 10 показує співвідношення експресії в корені до експресії в листі для всіх проаналізованих промоторів RCc3.

Таблиця 10

Показники співвідношення експресії корінь/
лист для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середнє корінь/лист		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	2,44	2,06	2,65
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	0,76	2,95	0,79
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	1,81	2,52	2,23
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	4,88	4,30	1,25
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	1,04	3,53	2,93
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	7,46	6,92	11,44
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	0,84		
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	12,61		
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1,31	4,76	2,40

Таблиця 10

Показники співвідношення експресії корінь/
лист для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середнє корінь/лист		
			V4	V7	VT
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	6,33	6,79	2,99

[000117] Як показано в Таблиці 10, кожен гомолог RCc3 промотора продемонстрував різні коефіцієнти експресії кореня до листа та різний її характер від V4 стадії до стадії VT. Наприклад, P-CI.RCc3: 3 (SEQ ID №: 1) підтримує аналогічне співвідношення експресії від V4 стадії до стадії VT з невеликим зниженням, яке відбувається на стадії V7. Як показано в таблиці 9, експресія в корені злегка знизилася від V4 до V7, а потім збільшилася на етапі VT. Промотор P-Ds.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 7) продемонстрував зміну співвідношення експресії від стадії до стадії V4 VT з більш високою експресією в корені по відношенню до листа в стадіях V4 і V7, а потім зсув, який наблизив експресію в листі по відношенню до кореня на стадії VT (1,25). Як показано в таблиці 9, цей промотор демонструє збільшення експресії в листі від стадії V4 до VT, тоді як експресія в корені знижується від стадії V7 до VT. Промотор P-So.RCc3: 2 (SEQ ID №: 19) підтримує співвідношення експресії в корені до експресії в листі на рівні 6,33 на стадії V4 та на рівні 6,79 на стадії V7, але потім знижує до значення 2,99 на стадії VT. Разом з тим, експресія з цим промотором збільшилася в 3,69 і 3,96 рази в листі та корені, відповідно, від стадії V4 до V7, а потім знизилася до 2,33 і 1,10 по відношенню до V4 на стадії VT.

[000118] Примітно, що не всі промотори мали вищий коефіцієнт співвідношення кореня до листа. Наприклад, промотори P-Ds.RCc3_1: 1 (SEQ ID №: 3) і P-Td.RCc3_1: 1 (SEQ ID №: 13) мали співвідношення кореня до листа нижче одного на стадії V4. Разом з тим, експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_1: 1, була 6,6 рази більше, ніж P-Ds.RCc3_1: 1 в корені на стадії V4. Найвище співвідношення кореня та листа на етапі V4 було досягнуто за допомогою P-Td.RCc3_2: 1 (SEQ ID №: 15). Співвідношення експресії кореня та листа з промотором P-Ds.RCc3_1: 1 збільшилася з V4 (0,76) до V7 (2,95), а потім повернулося до співвідношенню, аналогічному на V4 (0,79).

[000119] Промотор P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) продемонстрував збільшення експресії як в листі, так і в корені зі стадії V4 до стадії VT, включно. Цей промотор мав співвідношення кореня до листа вище 6,9 протягом усіх трьох стадій, але співвідношення змінилося з 7,46 на стадії V4 до 6,92 на стадії V7, а потім збільшилася до 11,44 на стадії VT. Експресія, яку контролювали P-MISgr.RCc3-2: 2, збільшилася в листі та корені від стадії V4 до стадії VT.

[000120] Кожен з гомологів RCc3 промотора продемонстрував патерни експресії в стабільно трансформованій кукурудзі, які не можуть бути передбачені в силу того, що отримані з гомологічних генів, особливо при використанні для трансформації гетерологічних видів, таких як кукурудза. Більшість промоторів продемонстрували більш високу експресію в корені по відношенню до листа в деяких точках або на стадіях V4, V7 або VT, або на всіх етапах аналізу. Слід зазначити, що величина експресії широко відрізнялася між промоторами. Унікальні властивості експресії кожного з гомологів RCc3 промотора роблять деякі з них більш відповідним для певних типів експресії молекули ДНК, яка транскрибується. Наприклад, експресія молекули ДНК, яка транскрибується, може мати вирішальне значення для засвоєння поживних речовин у ґрунті та яка найкраще експресується в більш пізній стадії розвитку, коли рослина збирається почати розмноження та виробництво насіння, може отримати найбільшу вигоду з таким промотором, як P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11), який збільшує експресію в корені на стадії VT.

[000121] Із ілюстрацій та опису принципів винаходу фахівцям у цій галузі техніки буде очевидно, що форма та деталі цього винаходу можуть бути модифіковані без відступу від цих принципів. Ми заявляємо усі модифікації, які знаходяться в межах сутності та обсягу формули винаходу. Усі публікації та опубліковані патентні документи, цитовані в цьому документі, включені шляхом посилання так, як би кожна окрема публікація або заявка на патент конкретно та індивідуально вказувалась як включена шляхом посилання.

<110> Monsanto Technology LLC

<120> РЕГУЛЯТОРНІ ЕЛЕМЕНТИ РОСЛИН ТА ЇХНЄ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> MONS:331WO

<150> 61/785245

<151> 2013-03-14

<160> 44

<210> 1

<211> 1500

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 1

gttgacgtcg gaagtgatcc gaatcaaca ccaacagggc tagaacgcc ggagagcgag 60

gttcagttc aacctgctga gacagcagg accctggcta aaccgacgaa aaccgatcta 120

gagaccggtt tagatgatc tagggtttc ggctcctgtg ttgataactc tagaactcct 180

cccggaaga ccgtagggg agaagcacgt agagggtgtc ctaggaccag caaggccgcc 240

tagaacgccg tcaagtctcg tcgggagacg cgccgaacag caaggtagaa ggaaaaaggg 300

gtaaaaggg agtagattga tttgatcga ttagggcgg atgcctcaat cggccatgat 360

cctctcatat atatagagg ggctggtctt atcccaatag gaaacatctc cggatacgat 420

ctccaagctt cctatccgga ctctatcaac atatagaatt caatccggac gtgacaaggt 480

aacctgatt tcgccgatcc ttggatcgac cagatcggtc taatgggctt tatcagccca 540

tactgatcaa caaatcgccc ttacaagaga aggatccaca tacttagcgt cggactcagc 600

aatcatcaca accataaggg ctccaaccag ggccacctgg tcggacataa catgagtgat 660

cggaaacca aatgatcag gccattcaa cttagaacat ctgatctctc aaaagacaaa 720

ttcgacctta atattacagg ccgaatactt cttctaaatt catctttatc tgtgacactt 780

ttgagtgtca acagtatgct tttcttgca aatattccct tttttattc taccattag 840

ttactttggc cttccattt cattgtatgt aaaagtggat actaaagcta acgcaacaag 900

aacaaaaata aatagatccg gggtatgacg tccccacgga tattttacta aaatatcttc 960

tcacgatgc tagaaaatcc tcgggccta tccatatagg gtggtatcac atccatatac 1020

ttatagtagg acagatgagg agatttttt accctcaatt ctaaaattca tcactttaat 1080

taaaggaatt taactcagga ccagagcggg gtcgcgagag ccatatatgt aaccaaata 1140

cctattagtt tagggcagca gcaaataaac cattattcct ttgtcccctt attcgtctc 1200

cagctagcta aaagctgtac atatgattaa tcatcgacat cgtgcatgca attgcagga 1260

aagtgaagg agcagccagg tgtatacacg tctgtagggt tcgcgtcaca tcgatcacat 1320

ggatatgcat gcatccaaaa cacacgtacg tacacttgcg ggtgcatgcc ttatgaaatg 1380

gaatactaca cgcgtgtcca caagttaagc acgcacaggc acacacacag agagacacag 1440

ttgctcgtc aatgcaattg gctggtctat aaataccacc gaagagaacc atcctaaaga 1500

<210> 2

<211> 86

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 2

acacaccggt agcgattcga tccttcagaa gagctactgc tagctagcta gagctatcat 60

ctgatcggtg gcagcaatat aattca 86

<210> 3

<211> 594

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 3

accaacaagc atcatgacaa tggcagcaaa gcattcgtca gagacgacca acaagcatca 60

cgacactggc ggcaaagcat atcaaaacaa tgtaatgaga tacaatattg ttcataaag 120

aagcctacct gcatgatcct ttctaacaaa ctcaaaatga taagggccat gctctgttcg 180

gtgacaacct tcaaggcatc tactttgccg gaatttagct ttgtattac cagcttgta 240

ttagttctta ctatccagtc tcgaacaact tgggcgccct ttgtctcacc atacctctac 300

atactgccct cccgatcaaa cacaacattc ttcaacccaa tcccttgcca ttgcgcatg 360

ttacaagggtg caaaacagcc agcccatatt gcaagttact aaactaaact atggtccaaa 420

tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatc tgaaacaagt ccagatcacc 480

cattctatca cagtcacatg cattcgcgtt cacggaaacc gtaacacac caccaactag 540

tcagcattgc accaatcttc ctccctataa atgcagcaac aatcgagcga cacc 594

<210> 4
 <211> 88
 <212> ДНК
 <213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 4

aacaccacga accatcacag gcacttatag caacaatcaa gttatttctg ccttgtgcac 60

tcgtggtcga gtagtaatac atagcaaa 88

<210> 5
 <211> 1500
 <212> ДНК
 <213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 5

ttgccggcct gtgtgatgtt gcgccccac caaccttga tttgcctgc tgccttgca 60

gccaacgggt gtagtccac cctcttcaaa cgtcgcaccg aagttctgtc gactcccaga 120

gaaaatattg tatgtaacat atactattac tactacagct gaacacgtaa caatatgatc 180

ttatttgtgt atgccgaaag caccgtgcta aagaccacct atgccctgg ttgggatcga 240

ggccttgctg ctacgccgtt tgcacagac gtgtgcgtgc atgcatgac tggcatgtga 300

gttgtgggtc ataaataatg tctaacaata ttaaggtaat tcctagtatg cgttgggatc 360

atttttgat gttggatctt gcggcaggtc tcacccatgc atgacggatt gagaacaagg 420

gagactggac cagcatgtaa aagataatga tgaaggcgag ccatgttgac ggtgtaccgg 480

gacaggcaga cgcggggccaa catcgaagag ggagatagcg tgcgtgctaa tgtttttgtg 540

gctcgcattg tcaatgactc atacagattt cggtagcttg ctaaaatcat tcagcttgctc 600

ggcaagcatg ggccaaacaa tctagcaaca atccatgttt gccatgatg caataggaag 660

taatagaatc cacttagctt ctatgtctca cctggatcct ccttttattt atatgcata 720

attttgggt agtggaggca cacatcttta tgttcatgg ataatatitt gttatatgta 780

tatctgtcca aataaataac gtacgtgtcc ttcaatctta gactccagtt agattgatca 840

atgtagtggc ctccatatt ccttttgtgt ttgtgtgcc atgtctcaag catgcatgtg 900

gaatgaaaag ctggaagctt ggcataaatt gcctaaggag ccataccata aattaaacca 960

tttctgata tggccacaat tttttaaca agctatgcca tagtcattca tgtgccacgg 1020

ttgttgaatc gcctcaatta cgtgtggaac atgatgggtg tttaacaac acttgggtgat 1080

ttctattctg gcctactctt gcatctagga tcgtgtgtt agccatgtgc acatatttag 1140

ctagctagta gcaaaggcat gaggagttg ctgatgggtt tacaataacc agcataagta 1200

ttcattaatt tgaagtgaag cacgtcatg aacatatgag aaaacttaca ttataattg 1260

cttggtcaga tgaaaaccta gctgattcct tggcgacgac aacatccctc ctgttccat 1320

actttctaa taattatttt tctcccaaaa agtccatgc gctagcatca atgaagaaat 1380

ataagaaaaa tctcatatc cacatagtaa atagagcatt atgcgggtcca ttaggaatc 1440

acctggggag cacctgcttg ctcaatcaca ctataatac cacccataca ctgcttcaag 1500

<210> 6

<211> 104

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 6

agaaccatca cagacatacg ctacacgcac cctgtacgaa caaccaacct agctagctac 60

ctactgaaaa cacacataag ctgctaggc agcatatcat agca

104

<210> 7

<211> 1407

<212> ДНК

<213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 7

atctcaaga tgcgtaatc gatttcttga gtcaaatatt ttgtttcat attatttagg 60

gagttttca tatggacaat acataaaaat atatatgcag tgcaagttat tttgtttac 120

ttattcaatt tatcgttca atccctaaa caaaatttta cctaaacta tttatttgg 180

tccaatctac accctaatta tatttctctt tttattctc tgtgtctgag ttaaatttg 240

acttcaaatt ttatgaatag atgcaaaaca tgatgcttta tgctaaaaat tttactaag 300

aaattttctt tgttatgttc ataggtcaag aatattta atgaaattga tettacatat 360

ataaaactgt acaaaaagta atcatgaaaa aaattaatat attgttcta acatagagca 420

ttatgtataa gtcaactgac aaaatttgaa attaaaactc agcttgcattg tgaagaaaca 480

aaaaagaga aatctaatta ggggtagatt ggaccaaata aaatagtta agggggggta 540

aaatgagcca aattttgttc aaggggttaa gtggatcaag taaatagatg aggggggtaa 600

aatggacttt ttcaacaat taacctcatc tatagaagg taggtgcac tcagttcgaa 660

aaataagatg catttgatc ttgaaaaac aatttccct cacacccca aatggaaatt 720

gtcgtacta ctgagataac taatgaaagt agactcttat tgtgatgat caaaaggtct 780

ctgtgattgg aatttctcc acactatctt cacaacatcg taatgagata taatattgtt 840

ccaccagaaa gcttacctgc atggtcattt ctaataacca actcaaaaaa tggtaaata 900

catgctcttt tagtgaataa cttaaggaa cctagcttgc caaaatttat cttgtcatt 960

aacaactcag ttcaacat ccagctcaa acaactcac tttttttt gcgggtaaaa 1020

caacttact ttacatgttg ccaaatgaa cacaacagtc acgtccatt gaggtacct 1080

gcaacttggg catcctttgt ctgtacctc tacatatttt tgtccctgat caacacaaca 1140

ttctaaacc catttcttg gcatttgccc atgttacaag gcgcaaaaca accaaccat 1200

atggcaattt actaaactaa actatgctga tccaatgcag caatcttgat cgctagtact 1260

gtccagcatt acatctgaaa caagtcaga tcacctctc catcacagtc acatgcatcc 1320

atggtcacgg gaaccgtaa cacacaccac caactaatcg gcattgctcc aatcctccta 1380

taaatacagc aacgatcagg cgagaca

1407

<210> 8

<211> 90

<212> ДНК

<213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 8

ataccaatc acacacagt ttagcactta gcaaccgagg tatttctgcg agctttgtgc 60

ccttcctgtg gtcgagtaat tagtagcaaa

90

<210> 9

<211> 583

<212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 9

tctgctagat gcaacgagct ggaagccagg cctgggacaa ctcgttgatg ggcgtggggt 60

tcacaaaca gagattagct tatccattt tatgtatg tgccatgat gcatatgtt 120

tggaataatg gtgactcgtg aggaagcccg tgcacatgtt ttggaatgat ttctgccacc 180

gatcgagaa ttcaaaataa ggcgagcaca tcagtgttc gttaaataa taaacggtag 240

attgaaataa tgattccagc tagcactata tattgtatt ctacgttaat aattttatat 300

attgcataag ggctcctcta attcatgcat cactagtagc tagcacgttg agtgatttg 360

gcattgttc tcaacttgc tccctgtat cctgatgat ctctcctca taactggcac 420

atcccaggac aaccaggcaa cgctcaaac acacatgcgt tctgattat ccacgtgca 480

tgatgcaga agccaatcac taaagcatca cttccacac catcgttcag ctataaaaac 540

cctgccaaac tgcgtgagag gaccatccca aagcacaaga gca 583

<210> 10

<211> 61

<212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 10

cgaagtgcag cactaaagca ccacttctg ctacaccgt tctagtaata atccatcacc 60

a

61

<210> 11
 <211> 1500
 <212> ДНК
 <213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 11

ttgtgagaca aaaacactgt tgcggctggg aataagccgg ctgataagtt caagcgaaca 60

ggctgtactt tagtgcttct attgaacca ttggttctca ctctggctat gcattgttgc 120

atttcactc tggettataa tttttcttg cctagtaata gttttgaaa taatgggagc 180

aaccacttca gttataatat aatgtttgta tgtataatg ggagcaatca ctctggttaa 240

ttgtgcctg ttataccat gcaggctgca ttatattaat tgcttagtgc cttctgttt 300

gtatgtgact atgagatttt tgtgacctct acaggaagtg aagggaagag gattcctgct 360

ggtttcaaca gacatagcaa gcaaagggtt tgcttctctg attgtgtatc tagatcacag 420

tagtgtgaat gtgcaccaag caaaacttaa attaggtgct ctatccatgt acattaagcc 480

tagctgtatc aaaaaaatt cgggtgtatc tgcgtaatat tggatgtata tataagattc 540

tggcattgga atttatattt ttttttgg tttaattcat taccacagac gcgtgttggt 600

cgtgcgcgtc tgcataagg tgcgtcaca gacgcgtttt gactatacgc gtctgtgata 660

gggttactac agacgcgtct ttactccacc agtctgtctt ataacctaat cgcagacgcg 720

tgtttgcata acgcagacgc ttattggtta cacgcgtctg tagaagaaac ttattacaga 780

cacgttatta agcgcgtctg tgatgtgtct taacacgcgt ctgtaatgtg gatttattac 840

atagtgatcg gcccatatga acgaatgatc gatctaggcc caaagttagt gtatgaaatg 900

ttcatttacg ttcaatgcg gtttctcaa aaaaaacgtt ccaatgctaa acaaaaacat 960

aggaattata tagttttgct gtggcttagt aacttcgtcc aatcgtgcta gtttaatttg 1020

tatatacctg taccatgcta ttectctggc ctgggtctt gcgcacccat tattaatgac 1080

cacgccacgc cagcattca ttctaatca ccagttgctt gacatccaat gtctctcca 1140

ctactgcgc acaccgtctg atactccaag atcccaagct aagataaac ccagtgatca 1200

tatatataaa aacaacgcc agtgcgagcc tggccatttg cggagccaac cgaagccgtg 1260

cacaaaatat tcgataccgt atcagggaac acactagtta tacgaggtag gcaataatcc 1320

atgtttcaaa aaaaacaggt aggcaataat ccagatcgga ctcttcctaa ccgggttcac 1380

atgcataat gaatatgatg gccgggttca catgaacgct agatatctg cctagtagtg 1440

caccgatttc ttaatccga ggctggacta taagtacccc tggtaacacc gtgatcaaag 1500

<210> 12

<211> 98

<212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 12

catcgcaaac aagctgctaa tcacttctca agagctctct aactacatta attagctaga 60

gtgatccgcg aggtagctgg ctgtgatcg agcaatac 98

<210> 13

<211> 740

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 13

aaatggatga aacaacttgg accaatcaga gatggccacg tcagctcccg atcgtcgtaa 60

ccgaccaaac ccgatcgata acggtttagg ctccaatata ccgtcggtac cacccggteg 120

ctatcatctg ccccggtccc aacgtattg gtatcgtecg cccctatata ggtecgtagc 180

ccagtcacac gtcggggcca atcgccctt gctgcgtccg ctctgtcggg taccgatcgc 240

caaaaacgcc acgtcaacgg cactgcggta ccgaccgccg ctggcaccgg ccttagcggg 300

ccacacgacc gatcgctgtt gtacggacgt agaggatgaat catgcgattg aatttctgt 360

agaggaaagt tatcatctta ttatctcaa cctccttcc tacggctgga tccgacgaaa 420

atttacctg gacgggtcca gtaacaattg caggtctcac tcacgtgcta aatccagcaa 480

tcaaacacga aggaatatac gtgatctggc cagaacatgc aagagaataa tacagtagtg 540

ttagagtacg aaacctacac gattcaacga attaatcaat gggttcacgt tcacgggtat 600

gctcgcgcac gtccaaaac caacgacatt ttataagcg gcatgatcca gacgggccag 660

ctcgagcacc acatggcgtg gctccatctc gcacccccca tcaccgtat aaataccatt 720

ggccatgcac acccgactc 740

<210> 14

<211> 91
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 14

ccacacagca caagcagcag cagcagcagc agctcgatcg aactagctta gctactacgt 60

gcgcgtgcaa caagcagctc gatcgatcgc c 91

<210> 15
 <211> 903
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 15

actataatt tcatagagac cattctccc tccataccat ttaaaaaatt caaacaaaaa 60

atatctataa gtggccctag gttaagaaaa gtgccagtgg aaatgcatct ttattgacgg 120

ttttcttgta tctattgcca gtaaaaatca tatatttaca ttggcgattc ttgaagcat 180

accgtcatga caaatctgat ttctattgac agaatgctta agagaatcgc tattggtcat 240

ttagttgcag catttaattg gtatgttagt ctatgaaata ggggaagtga attttgtatt 300

gagagatatt gtttcattct tagttttacg acacctttga tgatgtagca gcgctggaaa 360

gagtggtatg aaattcctat tgagaatagc cttacaggtc aacagcatatc ttttaaaatt 420

aaaccagaga tataccaaac ttcagtttct acgatataat atttttctac ctcataagtt 480

ataatcagtg gtacctcctt tttttatat ccctttatta aggacggtag agaacgtcct 540

ctactcgtat gttgtacacc accggtaacg caattaagta aaacatgcat gtcaagtagt 600

aaagtataaa gttggcaact caccagatgg caggagtcct gacctatcac cggttagcta 660

tagctcttgt tacgtgaatt cagcatgatt gctcaacttg cttctgtatt tccacatggg 720

ggagaattgt catatctccc cctaacaact ggcgcgtcca gagacaacca tgcaatgacc 780

aaaccgatcg aatcacacat gctttgcagc attcatgtac caatgctgcc aagcacgaaa 840

gcatctccct ctccgctcca tccatcgtca gctataaaaa ccatgccaag caccctgtga 900

aaa

903

<210> 16

<211> 69

<212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 16

gcatcccaaa gcacacaaga gcacgcagtg cagcactcaa gcacttctg ctactgcac 60

accgtacca 69

<210> 17

<211> 1500

<212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 17

aaaaggcact ttctcaaga aacagagtta gagatcaaac caaagtgcta gaaacattgt 60

aataggtatg tgcaacatat ttaaagggtc aaacctcaca gttttaccct ttctcaaaa 120

gttgcacttc ctggcctcgt ttaagcttat ttggacttag aatcttcaaa ttgtgctcga 180

ttgaaccttt actcatatac ttagcaaaca agttagtcca agatgttggt ttggacattc 240

aatcaccaaa acttatggaa atggettaat tgcccatctc cctttcatgg tacaatttgt 300

ttcacagatt taagcagaag ctatatcaaa cacggcgctt ctacaacagc ttatcagttt 360

agttgcttct cagaatgaaa ggtaataaac ataagctgct ttctactaga tccttagata 420

agttgctttt ttaacaagca gctctgcca gcagggccat agtgccatgt ttaggctgg 480

tcgcttccc gagccatag aaggtcgtcg gtccatgtgg ctgaaattaa agttgatagg 540

cccacggaa caaatggtca attagaggcc caaaattgt gagtcaaatt ttcattaca 600

ctccacgct agtaaagca aacatatata gtacctatat atcgattttt ttttctggt 660

gtcttagaaa ctctgcca taatcatgct agttaattt gtatactgc acaaagctat 720

tcctctggcc ttggtcttt gcgctccat gctgtttat ggaatgattgc agccacgcca 780

cgcattcatt ctcaatcacc atttgcctga catctaatt cctctgcacc acttgcgcac 840

gtacacacc gtctgatacg ccaggatccc aagctaaaat aacaccaat gatcatgtga 900

aaacaagtga cagtgcgagc cagcccatgc agcgatcttg gccatttgcg gagccaaccg 960

aagccgtgca caaaatattc gataccgtat aaggggaaac actagtata cgaggtaggc 1020

aaatataatc ctcttctaa ccggcggccg ggtcacatg catatatgat ggccgccagc 1080

cgggttcaca tgatgaacgc tatggtgcct agtgcacgat ttattaatct cccgaggctg 1140

tactataaat acatcggttaa tactgtgatc aaagcatcgc aaagaagatc tctaagactg 1200

tctccagcaa cgtcctctat atctatcctc tatatctgtc ctttacagtc tctctaaaa 1260

gattccatcc tctatctctc cttcctctcc aacaacggcc tctaaatcac gtctctata 1320

cgcaaatacc tatattagag acatttttaa tttttaatt ttgtacata cgtatttgc 1380

atacttcaa atgtattgta cataatttag ttttgctaaa ccggttggtt aaagtattca 1440

aatggataga ggagaggaga gagaaactct atatatagag gatccagcag cgtcctctaa 1500

<210> 18

<211> 172

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 18

atttagagga ccgtttagag gacgctgctg gagggagtag aggacgacag cgttctctaa 60

aatttagagt acaggatact ttagaggacc tgctggagge agtctaacaa ctgcatttgg 120

ctagagagag tgatcgcgag gtagctagct ggcttggat cgatcgagca aa 172

<210> 19
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Saccharum officinarum

<400> 19

caaattaaag ttgataggcc catcggaaga aatgatcaat gtaaggccca aaatttgtgt 60

ctgaaatggt cgtttacatt ttcaagctaa ataaaaacat aggaattata tagttttgct 120

ggtggettag aaacttcgtc caaatatta aaaaaaaga aaagaaactt cgtccaaaat 180

ggtgcttagt ttaatttgta tacctgcacc atgtattcc tctggccttg ttctttgcg 240

catctatcca tgcctatgga tgatgcagc cagccacgc aattcattct taatcccat 300

ttgcttgaca tccaatgtcc tctacaccac cacttgcgca ccctacacac cggccatttg 360

atagccaag atccaagct gaaataacac ccaatgatca tatgaaaaca agcgtgagtg 420

cgagcctgcc catgcagcga tcttgccat ttgcggagcc aaccgaagcc cgtgcacaaa 480

atattcgaga ccgtataagg gaaaacacta gttatacgca atgtccacaa taatccagat 540

cgactcttcc taaccgggtt cacatgaacg ctgttgtgcc tagtgcaccg atttctaaa 600

tcccaaggct cgactataaa taccctggt attgcaccg tgatc 645

<210> 20

<211> 86

<212> ДНК

<213> Saccharum officinarum

<400> 20

aaagcatgc aaacaagcta aagagctctc taactacatt gattagagt atctgcgcta 60

gaaggaggct agcttgat cgagca 86

<210> 21

<211> 1563

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 21

agaccagca acctaccgag ggggtaccg aggtagtgtt ttgtgtggg gctcgtcga 60

gatcaggaac ttgaaggta actcgaacac acgattaga caagtcggg ctgcttatgc 120

cgcataatac cccatgcat gtgtgtggt tggattgtat tgattgatca gatattgga 180

gggggccctg cctcgcccta tattgcccatt tggcggaggc agggctacag gtcggttgtt 240

gtacaagagt actagtcggt ttgaccagc gagtcctact ctaattgcta caagtagttt 300

cctaaccctt gactagtcct tgccgccac gtagaccacg acgtcttgca cctagtctct 360

gtgtttgata catcttggtg tacagtcga tattgtagga ctatccaagc ttcccagtag 420

gcccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttatt 480

tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagttaagc tcgtaacca ccaatatttg 540

gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gtcgtaacc caccaatatt tcgtggcata 600

gagatctctt aggcaataaa tttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660

caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgataca tgtgcatgtc 720

cgaacaaata ttatgggta ccgaaagggt taatttttg tagtatttat gagggggagg 780

ggggcggtga cgaaaaaaat aacttagcta agcgtaattg gcttaaaaac atacaatgtt 840

gttccagcat caagcctacg tgatcatttc aaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900

ttccttttag tgcaaaaactt aaggacacct accttgcaaa acttagcttt gttaccaga 960

atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020

tcattcatga tttctttaa taagtatga gcaatatggt tcgggtgtct ttcttctcat 1080

acctctattg tctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tggcgcaagg gggctcaagc 1140

ccccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200

tatttctaa tgctacctcc gccactgtg atcaacacaa cattctaaa accatttct 1260

tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320

aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380

cttgatcgct agtactgtcc ggcattatat ctgaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440

acagtcacat gcattcatgg tcacgggaac cgtagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500

caacactctt cctctataa atgcagcgag cgggggacac cataaaccat cacaggcact 1560

tag 1563

<210> 22

<211> 67

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 22

cgatcaagtt aattttgttt ctgctttgtg cgcctgtgtt ccagtaatta ctttccgtgt 60

agcaaaa

67

<210> 23

<211> 1528

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<400> 23

ggaagctaac tagtcacggc gaatacatga cgacatcggc ctacaacgca caacttcttg 60

gcataaaagc ttcaatttca atgcccttat ctggaagccc taggcgccgc gcaaatgtaa 120

aacattegct tcgcttggtt tgttatccaa aatagagtat ggacctcga cagattggca 180

acccgtgggt aatcgaaaat ggctccatct gcccctttgt cgaaggaatc aggaaacggc 240

cctcacctcc tggcggagtg tagatatgtg aaagaatcta ggcgacactt gcagactgga 300

caacatgtga acaataaga ccaacgttat ggcaacaagc ctcgacgcta cteaagtgtt 360

gggaggccac cgcatttcc aacgaagcgc caaagaaagc cttgcagact ctaatgctat 420
 tagtcgccta ggatatttgg aatgaaagga accgcagagt tttcagcac caagagcttc 480
 cggcggctag tctgatagcc aaaattaagg aggatgccaa aacatgggtc ttggcgggcg 540
 cgaaacacct tgataggtgg cttacctttt aacatgttcg ggccaaagc cttgagacgg 600
 taaagtttc tatttgcgt tgcgcata caattttatt cctctattca atgaaattgg 660
 tggctcactg gttcattaaa aaaaaaagaa tctagcctgt tcgggaagaa gaggattita 720
 ttcgtgagag agagagagag agagagagag agaggagag agaaggagga ggaggatttt 780
 caggcttcgc attgcccaac ctctgttct gttggcccaa gaagaatccc aggcgcccac 840
 gggctggcag ttaccacgg acctacctag cctaccttag ctatctaagc gggccgacct 900
 agtagctacg tgcctagtgt agattaaagt tggcgggcca gcaggaagcc acgtgcaat 960
 ggcattctcc cctgtccttc gcgtacgtga aaacaaaccc aggttaagctt agaattctct 1020
 tgcccgttgg actgggacac ccaccaatcc caccatgccc cgatattctt ccggtctcgg 1080
 ttcatgtgat gtcctctctt gtgtgatcac ggagcaagca ttcttaaagc gcaaaagaaa 1140
 atcaccaact tgcacagca gtcacgtgc accgcgcgaa gcgacgccc ataggccaag 1200

atcgcgagat aaaataacaa ccaatgatca taaggaaaca agcccgcgat gtgtcgtgtg 1260

cagcaatctt ggtcatttgc gggatcgagt gcttcacggc taaccaata ttcggccgat 1320

gatttaacac attatcagcg tagatgtacg tacgatttgt taattaatct acgagccttg 1380

ctagggcagg tgttctgccg gccaatccag atcgccctcg tatgcacgct cacatgatgg 1440

cagggcaggg ttcacatgag ctctaacggt cgattaatta atcccggggc tcgactataa 1500

atacctccct aatcccatga tcaaaacc 1528

<210> 24

<211> 99

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<400> 24

atctcaagca gcctaatacat ctccagctga tcaagagctc ttaattagct agctagtgat 60

tagctgcgct tgtgatcgat cgatctggg tacgtagca 99

<210> 25

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

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_1.

 <400> 25

cagcacgttg gcgcacacgc ccagctt 27

<210> 26
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_1.

 <400> 26

gcacaccgcs gcctcsaggt cgacgag 27

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

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_2.

 <400> 27

aggttgatgc cgagsatgtt gsccttg

27

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

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_2.

<400> 28

cttgccgcag trgttgagga kgaggctg 28

<210> 29

<211> 2001

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2001)

<223> Кодон-модифікована послідовність GUS з інтроном, який вирізається

<400> 29

atggtgaggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60

tttcctctg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120

gagtctaggg ccacgccgt gcccggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180

cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcacccgaa gggctgggcg 240

ggccagcgca tcgtgctccg cttcgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300

aatcaggagg taagtttctg ctctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 360

gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 420

gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 480

aaatttggtg atgtgcaggt gatggagcac cagggcgggt acaccccggt cgaggccgac 540

gtgacgccgt acgtgatcgc cgggaagtcc gtccgcatca ccgtctcgt gaacaatgag 600

ctgaactggc agaccatccc gcctggcatg gtcacacccg acgagaacgg caagaagaag 660

cagtcctact tccacgactt ctcaactac gctggcatcc accgtccgt gatgctctac 720

accactccca acacctgggt ggacgacatc accgtggta cccacgtggc ccaggactgc 780

aaccacgcct ccgtggactg gcaagtcgt gccaacggcg acgtcagcgt cgagctgcgc 840

gacgccgacc agcaagtcgt tgccaccggc cagggcacca gcggcaccct ccaagtcgtc 900

aaccctcacc tctggcagcc tggcgagggc tacctctacg agctgtcgt caccgccaag 960

agccagactg agtgcgacat ctaccctctc cgcgtcggca tcaggagcgt cgctgtcaag 1020

ggcgagcagt tctcatcaa ccacaagcct ttctactca ctggtttcgg ccgccacgag 1080

gacgtgacc tgaggggcaa gggtttcgac aacgtctga tggccacga ccacgtctg 1140

atggactgga tcggtgcca cagctacagg accagtcact acccgtagc tgaggagatg 1200

ctggactggg ctgacgagca cggatcgtc gtgatcgacg agactgctgc ggtcggttc 1260

aacctgtctc tgggcattgg ttctgaggct gggaacaagc cgaaggagct gtactctgag 1320

gaagctgtca acggcgagac tcagcaagct catctccagg cgattaagga gctgattgcc 1380

agggacaaga accatccgtc tctcgtgatg tggctattg cgaatgagcc ggacaccaga 1440

ccgcaagggg cgcgtgaata ctccgcgccg ctggcggagg cgactcgaa actggacca 1500

acccgtccaa tcacgtgcgt caatgtcatg ttctcgacg cccatagga tacgatctcg 1560

gacctgttcg atgttctttg tctcaatcgg tactatgggt ggtatgtca gagcggggat 1620

cttgagacgg cggagaaggt tcttgagaag gaactcctgg cgtggcaaga gaagctccat 1680

cagccgatca ttatcacgga gtacggggtt gacacacttg cgggccttca cagtatgtac 1740

acagatatgt ggtcggagga ataccagtgt gcatggttg atatgtacca tcgtgtcttc 1800

gaccgggttt cagcgggtgt cggcgaacaa gtctggaact tcgagactt cgccacgagc 1860

caagggatac tcgggtagg agggacaag aagggaatct tcacacggga tcggaagccc 1920

aagtcaagcag ccttctgtt gcagaagcga tggacaggaa tgaacttcgg agaaaagcca 1980

cagcaaggcg gaaagcagtg a

2001

<210> 30

<211> 1812

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1812)

<223> Кодон-модифікована послідовність GUS.

<400> 30

atggtgaggc ccgtgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60

ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgcctccag 120

gagtctaggg ccategccgt gcccgggtcc ttcaacgacc agttcgccga cggcgacatc 180

cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccga gggtgggcg 240

ggccagcgca tcgtgctccg ctfcgacgcc gtgacccact acggcaaggt ctgggtgaac 300

aatcaggagg tgatggagca ccaggcggt tacacccgt tcgaggccga cgtgacgccg 360

tacgtgatcg ccgggaagtc cgtccgcac accgtctgcg tgaacaatga gctgaactgg 420

cagaccatcc cgcctggcat ggatcatcacc gacgagaacg gcaagaagaa gcagtcctac 480

ttccagcact tcttcaacta cgttggcatc caccgtcccg tgatgctcta caccactccc 540

aacacctggg tggacgacat caccgtggc acccacgtgg cccaggactg caaccacgcc 600

tccgtggact ggcaagtcgt tgccaacggc gacgtcagcg tcgagctgcg cgacgccgac 660

cagcaagtcg ttgccaccgg ccagggcacc agcggcacc tccaagtcgt caacctcac 720

ctctggcagc ctggcgaggg ctacctctac gagctgtgcg tcaccgcaa gagccagact 780

gagtgcgaca tctacctct ccgctcggc atcaggagcg tcgctgtcaa gggcgagcag 840

ttctcatca accacaagcc ttctacttc actggtttcg gccgccacga ggacgtgac 900

ctgaggggca agggtttcga caacgtcctg atgtccacg accacgtct gatggactgg 960

atcggtgcca acagctacag gaccagtcac taccgtacg ctgaggagat gctggactgg 1020

gctgacgagc acggtatcgt cgtgatcgac gagactgctg cggtcggtt caacctgtct 1080

ctgggcattg gtttcgaggc tgggaacaag ccgaaggagc tgtactctga ggaagctgtc 1140

aacggcgaga ctacgaagc tcactccag gcgattaagg agctgattgc cagggacaag 1200

aaccatccgt ctgtcgtgat gtggtctatt gcgaatgagc cggacaccag accgcaaggg 1260

gcgctgaat acttcgcgc gctggcggag gcgactcga aactggaccc aaccgtcca 1320

atcacgtgcg tcaatgcat gttctgcgac gcccatcagg atacgatctc ggacctgttc 1380

gatgttttt gtctcaatcg gtactatggg tggatgttc agagcgggga tcttgagacg 1440

gcggagaagg ttcttgagaa ggaactctg gcgtggcaag agaagctcca tcagccgatc 1500

attatcacgg agtacgggtg tgacacactt gcgggccttc acagtatgta cacagatatg 1560

tggcggagg aataccagtg tgcattgttg gatatgtacc atcgtgtctt cgaccgggtt 1620

tcagcgggtg tcggcgaaca agtctggaac ttcgcagact tcgccacgag ccaaggata 1680

ctgcgggtag gaggaacaa gaagggaatc ttcacacggg atcggaagcc caagtcagca 1740

gccttctgt tgcagaagcg atggacagga atgaacttcg gagaaaagcc acagcaaggc 1800

ggaaagcagt ga

1812

<210> 31

<211> 1812

<212> ДНК

<213> Escherichia coli

<400> 31

atggtcgctc ctgtagaaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60

ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacia 120

gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgac agttcgccga tgcagatatt 180

cgttaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240

ggccagcgta tcgtgctgcg tticgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300

aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacggcat ttgaagccga tgcacgccc 360

tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420

cagactatcc cggcgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480

ttccatgatt totttaacta tgccggaatc catcgacgcg taatgctcta caccacgccg 540

aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcc 600

tctgttgact ggcagggtgt ggccaatggt gatgtcagcg ttgaactgcg tgatcgggat 660

caacagggtgg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtgt gaatccgcac 720

ctctggcaac cgggtgaagg ttatcttat gaactgtgcg tcacagccaa aagccagaca 780

gagtgtgata tctaccgcgt tcgcgtcggc atccggtcag tggcagtga ggcggaacag 840

ttcctgatta accacaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac 900

ttgcgtggca aaggattcga taactgtctg atgggtcacg accacgcatt aatggactgg 960

attggggcca actcctaccg tacctcgcat tacccttacg ctgaagagat gctcgactgg 1020

gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgctg ctgtcggctt taacctctct 1080

ttaggcattg gtttcaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140

aacggggaaa ctacgcaagc gcacttacag gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200

aaccacccaa gcgtggtgat gtggagtatt gccaacgaac cggatacccg tccgcaaggt 1260

gcacgggaat atttcgcgcc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccc gacgcgtccg 1320

atcacctcgc tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctcttt 1380

gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga ttggaaacg 1440

gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500

atcatcaccg aatacggcgt ggatacggtt gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560

tggagtgaag agtatcagtg tgcattggctg gatattgtat accgcgtctt tgatcgcgtc 1620

agcgccgtcg tcggtgaaca ggtatggaat ttgcccgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680

ttgcgcgttg gcggttaaca gaaagggatc ttactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740

gcttttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcaggga 1800

ggcaaacat ga

1812

<210> 32

<211> 2001

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2001)

<223> Химерна кодуюча послідовність, яка складається з нативної GUS-код послідовності E. coli з інтроном, який вирізається.

<400> 32

atgggccgct ctgtagaaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60

ttcagctctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120

gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgac agtcgccga tgcagatatt 180

cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240

ggccagcgta tcgtgctgcg ttctgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300

aatcaggaag tgatggagca tcaggcggc tatacccat tgaagccga tgcacgccg 360

tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag ttctgcttc taccttgat atatataa 420

taattatcat taattagtag taatataata ttcaaatat tttttcaa ataaaagaat 480

gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatatttaa tttataact 540

ttctaataa tgacaaaaat ttgtgatgt gcaggtatca ccgtttgtg gaacaacgaa 600

ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660

cagtcctact tccatgattt cttaactat gccggaatcc atcgacgct aatgctctac 720

accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtggtga cgcattgctg gcaagactgt 780

aaccacgcgt ctgttgactg gcaggtggtg gccaatggtg atgtcagct tgaactgcgt 840

gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggtg 900

aatccgcacc tctggcaacc gggatgaaggt tatctctatg aactgtgcgt cacagccaaa 960

agccagacag agtgtgatat ctaccgcgtt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020

ggcgaacagt tcctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 1080

gatgcggact tgcgtggcaa aggattgat aacgtgctga tgggtcacga ccacgcatta 1140

atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctgcatt accttacgc tgaagagatg 1200

ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgcggttt 1260

aaactctctt taggcattgg ttctgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320

gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380

cgtgacaaaa accacccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440

ccgcaaggtg cacgggaata ttctgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg 1500

acgcgtccga tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacaccga taccatcagc 1560

gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aageggcgat 1620

ttggaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1680

cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1740

accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt 1800

gatcgcgtea gcgccgtcgt cggtaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860

caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tactcgcga ccgcaaaccg 1920

aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaactcgg tgaaaaaccg 1980

cagcagggag gcaaacaatg a

2001

<210> 33

<211> 435

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 33

ggcgcccttt gagaagaagc ttttggctcg ctgcgcttat catgtttgt ggcttctgtg 60

ttgtgattct tgatctgcc cttgctatca tttgtattgt actgtcctaa taagtgttac 120

ttgtgagggt attactgtgt ctggtattt acctagagga ggaattattg tctgctattt 180

ctggttttgc tgtttatgta atggtgaacc aaagaatgaa gctgcaggct actttgagaa 240

ggaaggggac ctgctgcttt ctatcttgc atgcgtgatt acttgaacag tectgatgat 300

ctattaatgt tctttgtca gtcaagtgt ttggtgtagc tccaacaggc agtgtttatg 360

ttgtgaag cagcaatggc cgactgtatg tttttgtga agctgcaacc tgcttgct 420

aactgaacat gcaga 435

<210> 34

<211> 2219

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2219)

<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії
(EXP).

<400> 34

attatggcca attatttacc ggctgtgtcc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaat 60

ttggtaggca atgggtttga gttaggccaa taaatgtgca ggtttacatt tggttgccat 120

gttagtcat aacttcatac acttccattt ttgtacgtcg gcgatgttc aaccagaaca 180

gattatgttt ccttgggact gttaaattct tcacgctcc atcccaatga acttgcaaga 240

gattcgtgtt agcaacaaaa attgctctgt ccttcccaaa aagcattgcc tctggatctt 300

ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttcttat gttctgctgt gggtcgttgg 360

ttctgtcac ccttaaaact ctctgtttgg taccagata aatacaaatt cgctgtgtgg 420

gtagaaaaac cgcctacgaa cactggttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480

agccttattt ttctctcgt tttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540

tatgatctta taaatttgta catgctcaa tattttctaa aaactgaat aacagtatgt 600

aaaacctagg ttgatgttc aaatgaactt attaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660

gcgaatggca tattattttg ttgcatttat tctaaacacc taaaatgga attgaaaac 720

gggctctaag ttgagagaa gtttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780

tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcca 840

tgtacatgta tcgctggttt gttatttcac ctcatcttcg ctatgtatct actactattg 900

cgctaattctc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960

cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgttgaatct aactatttgt aaatattgat 1020

atattttca gaaatgttgg atttagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080

gatttaattgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaa atcttggcca 1140

agtgttactc cgtcgcggcc acacgccaca agtcctcccg gccctcgtc gcccttate 1200

ccatcgtacc cgccacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctcccg 1260

gcggccacct cgcgcggttt agattccct gggccccct cgcggtaccg tcacatattt 1320

ttggcgctc ttctctcgc cccctctct cccgaaccgc agataccacc gagtcggcag 1380

ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccg gaccgaccgt ctctggtacg cgtcactec 1440

gccctctgcc ttgttactg ccaagtctt ctgaatgctc tcttgtgtg tgattgctga 1500

gagtggttta gctggatcta gaattacact ctgaaatcgt gttctgcctg tgctgattac 1560

ttgccgtcct ttgtagcagc aaaatatagg gacatggtag tacgaaacga agatagaacc 1620

tacacagcaa tacgagaaat gtgtaattg gtgcttagcg gtatttattt aagcacatgt 1680

tgggtgtata gggcacttgg attcagaagt ttgctgttaa tttaggcaca ggcttcatac 1740

tacatgggtc aatagtatag ggattcatat tataggcgat actataataa ttgttcgtc 1800

tgcagagctt attattgcc aaaattagat attcctattc tgttttgtt tgtgtgctgt 1860

taaattgta acgcctgaag gaataaatat aaatgacgaa atttgatgt ttatctctgc 1920

tcctttattg tgaccataag tcaagatcag atgcacttgt tttaaattt gttgtctgaa 1980

gaaataagta ctgacagtat ttgatgcat tgatctgctt gttgttgta aaaaaattta 2040

aaaataaaga gtttctttt ttgtgtctc cttacctct gatggtatct agtatctacc 2100

aactgacact atattgttc tctttacata cgtatcttgc tcgatgcctt ctccttagtg 2160

ttgaccagtg ttactcacat agtctttgct catttcattg taatgcagat accaagcgg 2219

<210> 35

<211> 2224

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2224)

<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії
(EXP).

<400> 35

attatggcca attatttacc gccctgggcc tggcaggatg agttagtag tgacctaatt 60

ttggtaggca atgggtttga gtaggcca taaatgtgca ggttacatt tggttgcat 120

gttagttcat aacttcatac acttcattt ttgtacgtcg gcgatgttc aaccagaaca 180

gattatgttt cctggggact gtaaatttct tcatcgctcc atcccaatga acttgaaga 240

gattcgtgtt agcaacaaaa attgctctgt ccttcccaaa aagcattgcc tctggatctt 300

ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttctat gtctgctgt gggcgttgg 360

ttctgtcac cctaaactt ctctgtttgg taccagata aatacaaat cggctggtgg 420

gtagaaaaac cgcctacgaa cactggttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480

aggettattt ttctctcgt ttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540

tatgatctta taaattgta catgettcaa tattttctaa aaactgaat aacagtatgt 600

aaaacctagg ttgatgttc aaatgaactt atttaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660

gcgaatggca tattattttg ttgcatttat tctaaacacc taaaatgga atttgaaaac 720

gggctctaag ttgagagaa gtttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780

tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcca 840

tgtacatgta tcgctgggtt gttatttcac ctcattttcg ctatgtatct actactattg 900

cgctaacttc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960

cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgttgaatct aactatttgt aaatattgat 1020

atatttttca gaaatgttgg attagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080

gatttaatgg gcttaaaagt tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttgacca 1140

agtgttactc cgctcgggcc acacgccaca agtctctccg gccctcgtc gcccttate 1200

ccatcgtaac cgccacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctccccg 1260

gcggccacct cgcgcgggtt agatttcct gggccccct cgcggtaccg tcacatattt 1320

ttggcgctc ttctctgcg cccctctct cccgaaccgc agataccacc gagtcggcag 1380

ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccc gaccggaccg accgtcttcg gtacgcgtc 1440

actccgccct ctgcctttgt tactgccacg ttctctgaa tgctctcttg tgtggtgatt 1500

gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa atcgtgttct gcctgtgctg 1560

attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat ggtagtacga aacgaagata 1620

gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct tagcgggtatt tatttaagca 1680

catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgct gtttaattag gcacaggctt 1740

catactacat gggtaaatg tatagggatt catattatag gcgatactat aataattgt 1800

tcgtctgcag agcttattat ttgcaaaaat tagatattcc tattctgttt ttgtttgtgt 1860

gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg acgaaatttt gatgtttatc 1920

tctgtcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca ctgttttaa atattgtgt 1980

ctgaagaaat aagtactgac agtatattga tgcattgatc tgcttggttg ttgtaacaaa 2040

atttaaaat aaagagtttc cttttgttg ctctccttac ctctgatgg tatctagtat 2100

ctaccaactg acactatatt gctctcttt acatacgtat ctgtctgat gcctctccc 2160

tagtggtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt cattgtaatg cagataccaa 2220

gcgg

2224

<210>	36
<211>	2966
<212>	ДНК
<213>	Штучна послідовність
<220>	
<221>	misc_feature
<222>	(1)..(2966)
<223>	Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії. (EXP).
<400>	36

ggtcgattg agactttca acaaaggga atatccgga acctcctcg attcattgc 60

ccagctatct gtcacttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120

catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180

gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgtccaac cagctttca 240

aagcaagtgg attgatgtga tggtcgatt gagactttc acaaagggt aatatccga 300

aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360

gaagggtggt cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420

tctgccgaca tgggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480

gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atcggaagct aactagtcac 540

ggcgaataca tgacgacatc ggcctacaac gcacaacttc ttggcataaa agcttcaatt 600

tcaatgcccc tatctggaag ccctaggcgc gcgcgcaatg taaaacattc gcttcgcttg 660

gcttggtatc caaaatagag tatggacctc cgacagattg gcaacccgtg ggtaatcgaa 720

aatggctcca tctgcccctt tctcgaagga atcaggaaac ggccttcacc tctggcgga 780

gtgtagatat gtgaaagaat ctaggcgaca cttgcagact ggacaacatg tgaacaata 840

agaccaacgt tatggcaaca agcctcgacg ctactcaagt ggtgggaggc caccgcatgt 900

tccaacgaag cgccaaagaa agccttgagc actctaagc tattagtcgc ctaggatatt 960

tggaaatgaaa ggaaccgcag agtttttcag caccaagagc ttccggtggc tagtctgata 1020

gccaaaatta aggaggatgc caaaacatgg gtcttggcgg gcgcgaaaca cttgatagg 1080

tggcttacct ttaacatgt tcgggccaaa ggccttgaga cggtaaagt ttctatttgc 1140

gcttgcgcgt gtacaatttt attcctctat tcaatgaaat tgggtgctca ctggttcatt 1200

aaaaaaaaa gaatctagcc tgttcgggaa gaagaggatt ttattcgtga gagagagaga 1260

gagagagaga gagagagggga gagagaagga ggaggaggat ttcaggctt cgcattgccc 1320

aacctctgct tctgttgccc caagaagaat cccaggcgcc catgggctgg cagtttacca 1380

cggacctacc tagcctacct tagctatcta agcggggccga cctagtagct acgtgcctag 1440

tgtagattaa agttggcggg ccagcaggaa gccacgtgc aatggcatct tcccctgtcc 1500

ttcgcgtacg tgaaaacaaa cccaggttaag cttagaatct tctgcccgt tggactggga 1560

caccaccaa tcccaccatg ccccgatatt cctccggtct cggttcatgt gatgtcctct 1620

cttgtgtgat cacggagcaa gcattcttaa acggcaaaag aaaatcacca acttgctcac 1680

gcagtcacgc tgcaccgcgc gaagcgacgc ccgataggcc aagatcgca gataaataa 1740

caaccaatga tcataaggaa acaagccgc gatgtgtcgt gtgcagcaat ctgggtcatt 1800

tgcgggatcg agtgcttcac ggctaacaa atattcgcc gatgattaa cacattatca 1860

gcgtagatgt acgtacgatt tgtaattaa tctacagcc ttgctaggc aggtgttctg 1920

ccagccaatc cagatgccc tcgtatcac gctcacatga tggcaggga gggttcacat 1980

gagctctaac ggtcgattaa ttaatccgg ggctcgacta taaatacctc cctaatecca 2040

tgatcaaac catctcaagc agcctaata tctccagctg atcaagagct ctaattagc 2100

tagctagtga ttagctgcgc ttgtgatcga tcgatctcgg gtacgtagca cggaccggac 2160

cgaccgtctt cggtagcgc tcactccgcc ctctgccctt gttactgcca cgtttctctg 2220

aatgctctct tgtgtggtga ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg 2280

aaatcgigt ctgcctgtgc tgattactg ccgtccttg tagcagcaaa atatagggac 2340

atggtagtac gaaacgaaga tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg 2400

cttagcggta ttatttaag cacatgttg tttataggg cacttggtt cagaagttg 2460

ctgttaattt aggcacagc ttcatactac atgggtcaat agtataggga ttcattatt 2520

agcgatact ataataatt gtctgtctgc agagcttatt attgccaaa attagatatt 2580

cctattctgt tttgtttgt gtgctgtaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa 2640

tgacgaaatt ttgatgttta tctctgctcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg 2700

cactgtttt aaatattgt gtctgaagaa ataagtactg acagtattt gatgcattga 2760

tctgctgtt tttgttaaca aaatttaaaa ataaagagtt tctttttgt tgctctcctt 2820

acctctgat ggtatctagt atctaccaac tgacactata ttgcttctt ttacatacgt 2880

atcttgctcg atgccttctc cctagtgttg accagtgtta ctcacatagt ctttgctcat 2940

ttcattgtaa tgcagatacc aagcgg 2966

<210> 37

<211> 2005

<212> ДНК

<213> Zea mays subsp. mexicana

<400> 37

gtcgtgcccc tctctagaga taaagagcat tgcattgtcta aagtataaaa aattaccaca 60

tatttttttg tcacacttat ttgaagtgtg gtttatctat ctcatacat atatttaaac 120

ttcactctac aaataatata gtctataata ctaaaataat attagtgttt tagaggatca 180

tataaataaa ctgctagaca tggctaaag gataattgaa tattttgaca atctacagtt 240

ttatcttttt agtgtgcatg tgatctctct gtttttttg caaatagctt gacctatata 300

atacttcac cttttatta gtacatccat ttaggattta gggttgatgg ttctataga 360

ctaattttta gtacatccat ttattcttt ttagctctcta aattttttta aactaaaact 420

ctattttagt tttttatta ataatttaga tataaaatga aataaaataa attgactaca 480

aataaaacaa atacccttta agaaataaaa aaactaagca aacatttttc ttgtttcag 540

tagataatga caggctgttc aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagegaacc 600

agcagcgctg cgtcggggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtag ctgcctctgg 660

acccctctcg agagtccgc tccaccgttg gacttgctcc gtgtcggca tccagaaatt 720

gcgtggcgga gcggcagacg tgaggcggca cggcaggcgg cctctctc ctctcacgc 780

accggcagct acgggggatt ctttccac cgtccttcg ctttccctc ctgcccgc 840

gtaataaata gacacccct ccaaccctc ttccccaac ctctgttcg ttcggagcgc 900

acacacacgc aaccagatct ccccaaatc cagccgtcg cacctccgt tcaaggtag 960

ccgtcatcc tcccccccc cctctctc cttctctag atcgcgatc cgtccatgg 1020

ttagggccc gtagttctac ttctgtcat gttgtgta gagcaaacat gttcatgtc 1080

atgtttgta tgatgtgtc tggttggcg gtcgttctag atcgagtag gatactgtt 1140

caagctacct ggtggattta ttaattttgt atctgtatgt gtgtccata catctcata 1200

gttacgagtt taagatgatg gatggaaata tcgatctagg ataggatac atgttgatc 1260

gggttttact gatgcatata cagagatgct tttttctcg ctggttggtg atgatatggt 1320

ctggttgggc ggtcgttcta gatcggagta gaatactgtt tcaaactacc tgggtggattt 1380

attaaaggat aaagggtcgt tctagatcgg agtagaatac tgtttcaaac tacctgggtgg 1440

atttattaaa ggatctgtat gtatgtgcct acatcttcat agttacgagt ttaagatgat 1500

ggatggaaat atcgatctag gataggtata catgttgatg cgggttttac tgatgcatat 1560

acagagatgc ttttttcgc ttggttgga tgatgtggtc tggttggcg gtcgttctag 1620

atcggagtag aatactgttt caaactacct ggtggattta ttaattttgt atctttatgt 1680

gtgtgccata catcttcata gttacgagtt taagatgatg gatggaaata ttgatctagg 1740

ataggtatac atgttgatgt gggtttact gatgcatata catgatggca tatgcggcat 1800

ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgtttataa 1860

ttattttgat ctgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatttttt 1920

agccctgcct tcatacgcta tttattgct tggtagtgtt tctttgtcc gatgctcacc 1980

ctgttgttgg gtgatacttc tgcag

2005

<210> 38
 <211> 804
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa

<400> 38

accgtcttcg gtacgcgctc actccgcct ctgcctttgt tactgccacg ttctctgaa 60

tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120

atcggtttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat 180

ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct 240

tagcggattt tatthaagca catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagtttgc 300

gttaatttag gcacaggett catactacat gggatcaatag tatagggatt catattatag 360

gcgatactat aataatttgc tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420

tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480

acgaaatttt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540

ctgtttttaa atattgttgc ctgaagaaat aagtactgac agtatattga tgcattgatc 600

tgcttggttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc cttttgttg ctctccttac 660

ctcctgatgg tatctagtat ctaccaactg acactatatt gcttctcttt acatacgtat 720

cttgctcgat gccttctccc tagtggtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt 780

cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 39

<211> 253

<212> ДНК

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 39

gatcggtcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240

atgttactag atc 253

<210> 40
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa
 <400> 40

attaatgat cctccgatcc ctttaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60

tatatataaa ccccttcgca cgtacttata ctatgttttg tcatacatat atatgtgtcg 120

aacgatgat ctatcactga tatgatatga ttgatccac agcctgatct ctgtatcttg 180

ttattgtat accgtcaaat aaaagttct tccactgtg ttaataatta gctactctca 240

tctcatgaac cctatatata actagtttaa ttgctgtca attgaacatg atgatcgatg 300

<210> 41
 <211> 1446
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1446)
 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії.

(EXP).

<400>

41

gggccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60

ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120

catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggcccaaa 180

gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtttca 240

aagcaagtgg attgatgtga tggccgatt gagacttttc acaaagggt aatatccgga 300

aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgcacttta ttgtgaagat agtgaaaag 360

gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420

tctgccgaca gtggcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480

gacgttcaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540

gatgacgcac aatcccacta tcttcgcaa gaccttcct ctatataagg aagttcatt 600

catttgaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cgttacgcgc 660

tcactccgcc ctctgccctt gtactgcca cgtttcttg aatgctctt tgtgtgtga 720

ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtgtt ctgcctgtgc 780

tgattacttg ccgtccttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtac gaaacgaaga 840

tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggta tttatttaag 900

cacatgttgg tgttataggg cacttggatt cagaagttg ctgttaattt aggcacaggc 960

ttcactactac atgggtcaat agtataggga ttcatttat aggcgatact ataataattt 1020

gtcgtctgc agagcttatt attgccaaa attagatatt cctattctgt tttgtttgt 1080

gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140

tcctcctcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgtttt aaatattgtt 1200

gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttgtt tgttgtaaca 1260

aaatttaaaa ataaagagtt tccttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320

atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380

cctagtgttg accagtgtta ctcacatagt ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440

aagcgg

1446

<210> 42

<211> 1653

<212> ДНК

<213> Photinus pyralis

<400> 42

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60

accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120

gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180

gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgctgta 240

tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcgagtt 300

gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360

tgcagccta ccgtagtggt ttgttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420

aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480

tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540

ttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttctcttgga 600

tctactgggt tacctaaggg tgggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660

catgccagag atcctatitt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttttaagtgt 720

gttccattcc atcacggttt tggaaatgtt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780

cgagtcgtct taatgtatag attgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840

aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctatttcat tcttcgcaa aagcactctg 900

attgacaaat acgattatc taatttacac gaaattgctt ctgggggctg acctctttcg 960

aaagaagtcg ggggaagcgt tgcaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaaggatat 1020

gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaaccgggc 1080

gcggtcggta aagttgtcc atttttgaa gcgaagggtg tggatctgga taccgggaaa 1140

acgctgggctg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200

tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260

ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg ctgaagtct 1320

ttaattaaat acaaaggata tcaggtgccc cccgctgaat tggaatcgat attgttaca 1380

cacccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtctcccg acgatgacgc cggagaactt 1440

cccgccgccc ttgtgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500

tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagtgcgcg gaggagtgtg gttgtggac 1560

gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620

aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg taa 1653

<210> 43

<211> 936

<212> ДНК

<213> *Renilla reniformis*

<400> 43

atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg 60

tgggctcgct gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120

aagcacgccg agaacgccgt gatctttctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtgg 180

aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccggt gctagatgca tcatccctga tctgatcgga 240

atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatcgcc tctggatca ctacaagtac 300

ctcaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360

tggggggctt gtctggcctt tcactactcc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420

gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgac gagtcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480

gaggatatcg ccctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tggtgcttga gaataactc 540

ttctgcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagttcgct 600

gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctctggcct 660

cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720

aacgcctacc ttcgggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctggg 780

ttctttcca acgctattgt cgaggagct aagaagtcc ctaacaccga gtctgtgaag 840

gtgaagggcc tccactcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900

agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cagtaa 936

<210> 44

<211> 675

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(675)

<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії.
(EXP).

<400> 44

ggtcgatgt gagacttttc aacaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60

cccagctatc tgcacttta ttgtgaagat agtggaagaa gaaggtggct cctacaaatg 120

ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180

agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240

aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360

aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420

cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480

aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540

gggatgacgc acaatcccac tacccttcgc aagacccttc ctcctatataa ggaagttcat 600

ttcatttga gaggaacctt cttccacaca ctaagccac actattggag aacacacagg 660

gacaacacac cataa

675

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рекombінантна молекула ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, що складається з:
 - а) послідовності ДНК зі щонайменше 95 відсотками ідентичності повнорозмірній послідовності будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, де послідовність має промоторну активність;
 - б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 13, 15 і 17; і
- 10 в) фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, що містить щонайменше 500 суміжних нуклеотидів, причому цей фрагмент має промоторну активність; при цьому зазначена послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною полінуклеотидною молекулою, яка транскрибується.
- 15 2. Рекombінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана послідовність ДНК має щонайменше 95 відсотків ідентичності послідовності до послідовності ДНК будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17.
3. Рекombінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що гетерологічна молекула ДНК, яка транскрибується, містить ген, який представляє агрономічний інтерес.
- 20 4. Рекombінантна молекула ДНК за п. 3, яка **відрізняється** тим, що ген, який представляє агрономічний інтерес, обумовлює у рослин толерантність до гербіцидів.
5. Рекombінантна молекула ДНК за п. 3, яка **відрізняється** тим, що ген, який представляє агрономічний інтерес, обумовлює у рослин стійкість до шкідників.
- 25 6. Клітина трансгенної рослини, яка містить рекombінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, що складається з:
 - а) послідовності ДНК зі щонайменше 95 відсотками ідентичності послідовності повнорозмірній послідовності будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, де послідовність має промоторну активність;
 - б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 13, 15 і 17; і
 - в) фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, що містить щонайменше 500 суміжних нуклеотидів, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність;
- 30 при цьому зазначена послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною полінуклеотидною молекулою, яка транскрибується.
7. Клітина трансгенної рослини за п. 6, яка **відрізняється** тим, що вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину однодольної рослини.
- 35 8. Клітина трансгенної рослини за п. 6, яка **відрізняється** тим, що вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину дводольної рослини.
9. Трансгенна рослина або її частина, яка містить рекombінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, що складається з:
 - а) послідовності ДНК зі щонайменше 95 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, де послідовність має промоторну активність;
 - б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 13, 15 і 17; і
 - в) фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 13, 15 і 17, що містить щонайменше 500 суміжних нуклеотидів, причому цей фрагмент має промоторну активність; і
- 40 при цьому вказана послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною полінуклеотидною молекулою, яка транскрибується.
- 45 10. Рослина-нащадок трансгенної рослини за п. 9 або її частина, яка **відрізняється** тим, що рослина-нащадок містить вказану молекулу рекombінантної ДНК.
11. Трансгенна насінина із трансгенної рослини за п. 9, яка **відрізняється** тим, що ця насінина містить вказану молекулу рекombінантної ДНК.

12. Спосіб отримання товарного продукту, який включає отримання трансгенної рослини або її частини за п. 9 та виробництво з неї товарного продукту.

13. Спосіб за п. 12, який **відрізняється** тим, що товарний продукт являє собою оброблене насіння, зерна, частини рослин і борошно грубого помелу.

5 14. Спосіб отримання трансгенної рослини, який включає:

а) трансформацію клітини рослини рекомбінантною молекулою ДНК за п. 1 для отримання трансформованої клітини рослини; і

б) регенерацію трансгенної рослини із трансформованої клітини рослини.

10 15. Трансгенна рослина за п. 9, яка **відрізняється** тим, що вказана трансгенна рослина являє собою однодольну рослину.

16. Трансгенна рослина за п. 9, яка **відрізняється** тим, що вказана трансгенна рослина являє собою дводольну рослину.

17. Трансгенна рослина за п. 15, яка **відрізняється** тим, що вказана однодольна рослина вибрана з групи, яка включає кукурудзу (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum*), 15 ячмінь (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum spp.*), просо, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), пальчасте просо (*Eleusine coracana*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), овес (*Avena sativa*), тритикале, жито (*Secale cereale*), росичку (*Digitaria*), цибулі (*Allium spp.*), ананас (*Ananas spp.*), газонну траву, цукрову тростину (*Saccharum spp.*), пальми (*Arecaceae*), бамбук (*Bambuseae*), банани (*Musaceae*), імбирні 20 (*Zingiberaceae*), лілії (*Lilium*), нарциси (*Narcissus*), півники (*Iris*), амариліси, орхідеї (*Orchidaceae*), канни, дзвіночки (*Hyacinthoides*) та тюльпани (*Tulipa*).

18. Трансгенна рослина за п. 16, яка **відрізняється** тим, що вказана дводольна рослина вибрана з групи, яка включає сою (*Glycine max*), дику сою (*Glycine soja*), бавовник (*Gossypium*), 25 томати (*Solanum lycopersicum*), перець (*Piper*), гарбуз (*Cucurbita*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолю (*Phaseolus*), нут (*Cicer arietinum*), соняшник (*Helianthus annuus*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), кінву, гречку посівну (*Fagopyrum esculentum*), ріжкове дерево (*Ceratonia siliqua*), буряк (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*) та огірок (*Cucumis sativus*).

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	ATGGTGAGGCCCGTTGAGACCCCGACTAGGGAGATCAAGAAGCTGGACGGCCTCTGGGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	ATGGTCCGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTCTGGGCCA
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TTCTCCCTCGACCGTGAAGTGCAGCATCGACCGCGCTGGTGGGAGTCCGCCCTCCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4	TTTCAGTCTGGATCGCGAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAA
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	GAGTCTAGGGCCATCGCCGTGCCCGGTTCCCTTCAACGACCACTTCGCGGACGCCGACATC
CR-Ec.uidA-1:1:4	GAAAGCCGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTAAACGATCAGTTTCGCGGATGCAGATATT
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	CGCAACTACGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAGGTGTTTCATCCCGAAGGGCTGGGCG
CR-Ec.uidA-1:1:4	CGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGTTGGGCA
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	GGCCAGCGCATCGTGTCCGCTTCGACGCGGTGACCCACTACGGCAAGGTCTGGGTGAAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	GGCCAGCGTATCGTGTTCGCTTTTCGATGCGGTCACTCATTACCGCAAGGTGTGGGTCAAT
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	AATCAGGAGGTGATGGAGCACCAGGGCGGTTACACCCCGTTTCAGAGCCGACGTGACGCCG
CR-Ec.uidA-1:1:4	AATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTACGCCCG
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TACGTGATCGCCGGGAAGTCCGTCCGCATCACCGTCTGCGTGAACAATGAGCTGAAGTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4	TATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAAGTGAAGTGG
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	CAGACCATCCCGCCTGGCATGGTCAATCACCGACGAGAACGGCAAGAAAGACAGTCTTAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	CAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGAATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAGACAGTCTTAC
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TTCCACGACTTCTTCAACTACGTGGCATCCACCGCTCCGTGATGCTCTACACCACTCCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	TTCCATGATTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACTCCG
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	AACACCTGGGTGGACGACATCACCGTGGTCAACCCAGTGGCCAGGACTGCAACCAACGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	AACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGGTACGCGATGTGCGCGCAAGAGTGAACCAACGCC
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TCCGTGGACTGGCAAGTTCGTGCGCAACGGCGACGTGACGCTGAGCTGCGCGACGCCGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	TCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGTATGTGACGCTTGAAGTGGCTGATGCGGAT

Фіг. 1а


```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGCAAGTCGTTGCCACCGGCCAGGGCACCAGCGGCACCCTCCAAGTCGTCAACCCTCAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCAC
** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTCTGGCAGCCTGGCGAGGGCTACCTCTACGAGCTGTGCGTCACCGCCAAGAGCCAGACT
CR-Ec.uidA-1:1:4 CTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAAGTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACA
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GAGTGGCAGATCTACCTCTCCGCGTCGGCATCAGGAGCGTCGCTGTCAAGGGCGAGCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGCTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCCTCATCAACCACAAGCCTTTCTACTTCACTGGTTTCGGCCGCCACGAGGACGCTGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCCTGATTAACCACAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGAGGGGCAAGGGTTTCGACAACGTCCTGATGGTCCACGACCAGCTCTGATGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCAGCATTAAATGGACTGG
** * ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCGGTGCCAACAGCTACAGGACCAGTCACTACCCGTACGCTGAGGAGATGCTGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATTGGGGCCAACCTCCTACCGTACCTCGCATTACCCCTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG
** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCTGACGAGCAGCGTATCGTCGTGATCGACGAGACTGCTGCGGTGCGTTTCAACCTGTCT
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGTGCGGCTTTAACCCTCTCT
** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGGGCATTGGTTTCGAGGCTGGGAACAAGCCGAAGGAGCTGTACTCTGAGGAAGCTGTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTC
* ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACGGCGAGACTCAGCAAGCTCATCTCCAGGCGATTAAGGAGCTGATTGCCAGGGACAAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACGGGGAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAA
***** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACCATCCGTCTGTGCTGATGTGGTCTATTGCGAATGAGCCGGACACCAGACCGCAAGGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCCGCAAGGT
***** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGCGTGAATACTTCGCGCCGCTGGCGGAGGCGACTCGCAAACTGGACCCAACCCGTCCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCACGGGAATATTTGCGGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAACTCGACCCGACGCGTCCG
** ** **

```

Фиг. 1b

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCACGTGCGTCAATGTCATGTTCTGCGACGCCCATACGGATACGATCTCGGACCTGTTT
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT
***** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GATGTTCTTTGTCTCAATCGGTACTATGGGTGGTATGTTAGAGCGGGGATCTTGAGACG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACG
***** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGGAGAAGGTTCTTGAGAAGGAACTCCTGGCGTGGCAAGAGAAGTCCATCAGCCGATC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGAGAAGGTAAGTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATT
** *****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATTATCACGAGTACGGGGTTGACACACTTTCGCGGCCCTTCAGATGTACACAGATATG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCATCACGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATG
** *****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TGGTCGGAGGAATACCACTGTGCATGGTTGGATATGTACCATCGTGTCTTCGACCGGGTT
CR-Ec.uidA-1:1:4 TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTC
*** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TCAGCGGTTGTGCGCGAACAAGTCTGGAACCTTCGAGACTTCGCCACGAGCCAAGGGATA
CR-Ec.uidA-1:1:4 AGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCGATTTGCGACCTCGCAAGGCATA
** ** *****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGCGGGTAGGAGGGAACAAGAAGGAATCTTCACACGGGATCGGAAGCCCAAGTCAGCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGCGTTGGCGGTAAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGGACCGCAAACCGAAGTCGCGG
***** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCCTTCCTGTGTCAGAAGCGATGGACAGGAATGAACTTCGGAGAAAAGCCACAGCAAGGC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGA AAAACCGCAGCAGGGA
** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GGAAAGCAGTGA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GGCAACAATGA
** **

```

Фиг. 1c

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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