



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119965** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2015 10009	(74)	Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(22)	Дата подання заявки:	11.03.2014	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Jose L. Ortega et al, "The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS 1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa", The Plant Journal, GB, 01.03.2006, vol. 45, no. 5, P. 832 - 846 C Tesniere et al, "Effect of different 3' flanking regions on the activity of the Vitis vinifera alcohol dehydrogenase 2 promoter", Vitis, 01.01.2005, P. 1-4 Goon-Bo Kim et al, "Isolation and Characterization of Medicago truncatula U6 Promoters for the Construction of Small Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing Vectors", Plant Molecular Biology Reporter., NL, 27.11.2012, vol. 31, no. 3, P. 581 - 593 Xiao K et al, "Isolation and Characterization of Root-Specific Phosphate Transporter Promoters from Medicago Truncatula", Plant Biology, Wiley-Blackwell Publishing LTD, GB, DE, NL, 01.07.2006, vol. 8, no. 4, P. 439 - 449 "Medicago truncatula clone mth2-11f1, complete sequence.", GENBANK, 17.09.2010, Database accession no. AC145767 "EST506777 KV3 Medicago truncatula cDNA clone pKV3-39K18 5'- end, mRNA sequence.", GENBANK, 24.04.2001, Database accession no. BG645158.1 "Medicago truncatula chromosome 6 clone mth2-20m4, complete sequence", GENBANK, 17.09.2010, Database accession no. AC139600 "Medicago truncatula clone JCVI-FLMt-4L10 unknown mRNA", GENBANK, 25.05.2012, Database accession no. BT140834 "Medicago truncatula clone mth2-1113, complete sequence.", GENBANK, 17.09.2010, Database accession no. AC122161 "Medicago truncatula chromosome 8 clone mth2- 165f22, complete sequence.", GENBANK, 17.09.2010, Database accession no. AC174341 WO 2010143138 A2, 16.12.2010
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.09.2019			
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/785,268			
(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:	25.01.2016, Бюл.№ 2			
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.09.2019, Бюл.№ 17			
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/023648, 11.03.2014			
(72)	Винахідник(и): Чіттоор Джаішрі М. (US), Міямото Емі Дж. (US), Ніколс Емі М. (US), Оуфаттоле Мохаммед (US), Петерсен Майкл В. (US)				
(73)	Власник(и): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America (US)				

UA 119965 C2

(54) РЕГУЛЯТОРНИЙ ЕЛЕМЕНТ РОСЛИН ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується молекули ДНК, яка містить послідовність ДНК, що має ген-регуляторну активність, і гетерологічну полінуклеотидну молекулу, що транскрибується. Винахід також стосується клітини трансгенної рослини, трансгенної рослини або її частини, рослини-потомка трансгенної рослини, трансгенного насіння та способу отримання трансгенної рослини.

ПОСИЛАННЯ ДО СПОРІДНЕНИХ ЗАЯВОК

[001] Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США № 61/785268, поданої 14 березня 2013 року, яка включена в цю заявку у повному обсязі шляхом посилання.

ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 [002] Список послідовностей містяться у файлі під назвою "MONS332WO.txt", розміром 52,7 Кб (розмір виміряно в Microsoft Windows®), що був створений 11 березня 2014 року, подається при цьому в електронній формі і включений у цей документ шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 [003] Цей винахід відноситься до галузі молекулярної біології рослин, генетичної інженерії рослин та молекул ДНК, придатних для модуляції експресії генів у рослинах.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

15 [004] Регуляторні елементи являють собою генетичні елементи, які регулюють активність генів шляхом модуляції транскрипції функціонально зв'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 ВІНАХОДУ

20 [005] У цьому винаході запропоновані нові регуляторні елементи для використання в рослинах та генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи. У цьому винаході також запропоновані трансгенні клітини рослин, рослини та насіння, які містять регуляторні елементи. В одному варіанті реалізації винаходу, описаному в цьому документі, регуляторні елементи, функціонально зв'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується. У деяких варіантах реалізації винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, є гетерологічною відносно послідовності регуляторного елемента. У цьому документі також запропоновані способи одержання та застосування регуляторних елементів, описаних у цьому документі, включаючи генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи та трансгенні клітини рослин, рослини і насіння, які містять регуляторні елементи, функціонально зв'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується, гетерологічною відносно регуляторного елемента.

30 [006] 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 №: 1-37; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-37; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-37, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально зв'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 з якою вона функціонально зв'язана. У конкретних варіантах реалізації винаходу рекомбінантна молекула ДНК містить послідовність ДНК, що має щонайменше 90 відсотків, щонайменше 91 відсотка, щонайменше 92 відсотків, щонайменше 93 відсотків, щонайменше 94 відсотків, щонайменше 95 відсотків, щонайменше 96 відсотків, щонайменше 97 відсотків, щонайменше 98 відсотків або щонайменше 99 відсотків ідентичності послідовності до послідовності будь-якої ДНК з SEQ ID №: 1-37. 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.

45 [007] 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 №: 1-37; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-37; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-37, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально зв'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.

50 [008] 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 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID № 1-37; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-37; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-37, причому цей фрагмент має ген-

регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально зв'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 насінина, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка породжує таку трансгенну рослину при вирощуванні, також пропонується у цьому винаході.

[0009] В іншому аспекті у винаході запропонований спосіб отримання товарного продукту, який включає отримання трансгенної рослини або її частини, що містять, рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу, і отримання товарного продукту з них. В одному аспекті реалізації винаходу товарний продукт являє собою оброблене насіння, зерна, частини рослин і борошно грубого помелу.

[0010] У ще одному аспекті винаходу також запропоновано спосіб отримання трансгенної рослини, що містить, рекомбінантну молекулу ДНК згідно з цим винаходом, що включає трансформацію рослинної клітини рекомбінантною молекулою ДНК згідно цього винаходу, щоб отримати трансформовану рослинну клітину та регенерування трансгенної рослини з трансформованої рослинної клітини.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0011] Фіг. 1. Демонструє конфігурацію експресійної касети відповідно до цього винаходу.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

[0012] SEQ ID №: 1-30, 38-41, 49 і 56 являють собою послідовності 3'-нетрансльованої області (3' НТО).

[0013] SEQ ID №: 31, 35, 42, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54 і 55 являють собою послідовності груп регуляторних експресійних елементів (EXP), які містять промоторну послідовність, функціонально зв'язану 5' кінцем з лідерною послідовністю, яка функціонально зв'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону, або промоторну послідовність, функціонально зв'язану 5' кінцем з лідерною послідовністю.

[0014] SEQ ID №: 32, 36 і 43 являють собою промоторні послідовності. [0015] SEQ ID №: 33 і 37 являють собою лідерні послідовності.

[0016] SEQ ID №: 34 являє собою послідовність інтрону.

[0017] SEQ ID №: 44 являє собою послідовність, яка кодує β-глюкуронідазу (GUS), яка вирізає інтрон, що вирізається.

[0018] SEQ ID №: 45 і 46 являють собою послідовності, які кодують люциферазу.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0019] Цей винахід відноситься до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність у рослинах. Нуклеотидні послідовності цих молекул ДНК наводяться в SEQ ID №: 1-37. Ці молекули ДНК, здатні впливати на експресію функціонально зв'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, у тканинах рослин і, отже, регулювати експресію функціонально зв'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.

[0020] Наступні визначення та способи пропонуються з метою кращого окреслення винаходу і спрямування до фахівців у цій галузі техніки при застосуванні цього винаходу. Якщо не вказано інше, терміни слід розуміти відповідно до загальноприйнятого використання фахівцями в цій галузі техніки.

Молекули ДНК

[0021] 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» застосовується 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.

[0022] 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.

[0023] 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 №: 1-37.

[0024] 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 №: 1-37, 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

[0025] 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 зв'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, наприклад, шляхом впливу на транскрипцію та/або трансляцію функціонально зв'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.

[0026] Використана в цьому документі «група регуляторних елементів експресії» або «EXP» послідовність може відноситися до групи функціонально зв'язаних регуляторних елементів, таких як енхансери, промотори, лідери та інтрони. Таким чином, група регуляторних елементів експресії може складатися, наприклад, із промотору, функціонально зв'язаного 5' кінцем з лидерною послідовністю, яка, у свою чергу, функціонально зв'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону.

[0027] Регуляторні елементи можуть бути охарактеризовані за своїм характером експресії генів, наприклад, за позитивним і/або негативним впливами, такими як конститутивна, 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 зв'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.

[0028] 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 якостями, а також за кількісними або якісними показниками.

[0029] Промотор є корисним в якості регуляторного елемента для модуляції експресії функціонально зв'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 первісно розпізнаний на 5' нетрансльованій 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 № 32 та 36, включаючи їхні фрагменти або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу заявлені 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.

[0030] 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 або в комбінації з іншими EXP і фрагментами EXP. 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, як описано в цьому документі. Способи отримання таких фрагментів із вихідної молекули промотору добре відомі у цій галузі техніки.

[0031] Композиції, отримані з будь-яких промоторів, представлених у SEQ ID №: 32 та 36, 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 №: 32 та 36, 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 №: 32 та 36, і фрагменти або енансери, отримані з них, можуть бути використані для отримання композицій химерних регуляторних елементів.

[0032] 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.

[0033] Використаний у цьому документі термін «лідер» відноситься до молекули ДНК, що розпізнається з 5' нетрансльованій області (5' НТО) гена і визначається в загальному розумінні як сегмент ДНК між сайтом ініціації транскрипції (CIT) і початковим сайтом послідовності, яка кодує білок. В альтернативному варіанті лідери можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання елементами ДНК. Лідер може бути використаний як 5' регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально зв'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Молекули лідерів можуть бути використані з гетерологічним промотором або з їхнім нативним промотором. Лідери, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID №: 33 та 37, 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.

5 [0034] Лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: 33 та 37, можуть складатися з регуляторних елементів або можуть приймати вторинні структури, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально зв'язаної молекули ДНК, що транскрибується. Лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 33 та 37, можуть бути використані, відповідно до винаходу, для створення химерних регуляторних елементів які впливають на

10 транскрипцію або трансляцію функціонально зв'язаної молекули ДНК.
[0035] 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 зв'язаних генів. Інтрон може бути використаний як регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально зв'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Генетична конструкція може містити інтрон, та інтрон може бути чи не бути гетерологічним відносно молекули ДНК, яка транскрибується.

20 Приклади інтронів у цій галузі техніки включають інтрон актину рису та інтрон HSP70 кукурудзи.
[0036] 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. 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 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, за деяких обставин, виявляє недоліки. У таких випадках необхідно мати колекцію основних елементів контролю для створення відповідних рекомбінантних елементів ДНК.

30 [0037] Інтрони, корисні в застосуванні винаходу на практиці включають SEQ ID №: 34. Композиції, отримані з інтрона представленого як послідовність SEQ ID №: 34 можуть складатися з внутрішньоклональних делецій або дуплікацій цис-регуляторних елементів; та/або змін 5'и 3'-послідовності ДНК, що містять інтрон/екзон кодон сплайсингу, можуть бути використані для поліпшення експресії або специфічності експресії, при функціональному зв'язку з промотором + лідером або химерним промотором + лідером і послідовністю, що кодує.
40 Модифікація інтрон/екзон граничної послідовності може бути вигідна, щоб уникнути використання нуклеотидної послідовності АТ або нуклеотиду А безпосередньо перед 5'-кінцем сайту сплайсингу (GT) і нуклеотиду G або нуклеотидної послідовності TG, відповідно, відразу за 3' кінцем сайту сплайсингу (AG), щоб усунути потенційні небажані стартові кодони, які формуються у ході процесингу РНК в кінцевий транскрипт. Послідовність ДНК навколо 5 '3' кінця сайту кодону сплайсингу інтрона може бути модифікована таким чином. Інтрони і варіанти інтрона змінені, згідно з цим винаходу, і за допомогою методів, відомих в цій області техніки можуть бути перевірені емпірично, як описано в робочих прикладах, щоб визначити вплив інтрона на експресію функціонально пов'язаної молекули ДНК. Зміни 5' 3' ділянок, що містять інтрон/екзон кодон сплайсингу також може бути проведено, щоб зменшити ймовірність отримання помилкових старт - і стоп-кодонів у кінцевих транскриптах після процесингу і сплайсингу РНК. Інтрони можуть бути перевірені емпірично, як описано в робочих прикладах, щоб визначити вплив інтрона на експресію трансгена.

50 [0038] Використані в цьому документі терміни «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 зв'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)-хвости

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..

[0039] 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 може бути ускладнене, оскільки існує мало консервативних послідовностей ДНК, які дозволяють легко передбачати ефективну 3' НТО.

[0040] 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 трансгена 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 хромосомній ДНК, в яку Т-ДНК була вбудована. 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.

[0041] 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 зв'язаної молекули ДНК, що транскрибується. 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 зв'язаної молекули ДНК, що транскрибується. Енхансерний елемент також може бути об'єднаний із промотором для отримання химерного промоторного цис-елемента, що додає аспект загальної модуляції експресії генів.

[0042] 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 вибіркоче 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 домену 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 зв'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються за цим винаходом.

[0043] 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 зустрічається 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 зв'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються відповідно до цього винаходу.

[0044] 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 першої молекули ДНК, такої як варіант із різними сайтами рестрикції та/або внутрішніми делеціями, замінами та/або вставками. "Варіант" може також включати регулюючий елемент, що має нуклеотидну послідовність, що включає заміни, делеції і/або вставки одного або кількох нуклеотидів еталонної послідовності, при якому похідний регулюючий елемент має більше або менше або еквівалент транскрипційної або трансляційної активності, чим відповідні нативні регуляторні молекули. «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 №: 1-37, 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.

[0045] Химерні регуляторні елементи можуть бути розроблені для включення різних складових елементів, які можуть бути функціонально зв'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 зв'язаними. У винаході послідовність ДНК, що наводиться в SEQ ID №: 1- 30 або 31-37, 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.

[0046] Дієвість модифікацій, дублікацій або делецій, описаних у цьому документі, на бажані аспекти експресії конкретної молекули ДНК, що транскрибується може бути перевірена емпірично у стабільних і транзійтних 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 конструкти

[0047] 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 зв'язана з іншою молекулою ДНК функціонально діючим способом, тобто функціонально зв'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 зв'язану із одним або більше регуляторних елементів, як правило, щонайменше із промотором і 3' НТО..

[0048] Використаний у цьому документі термін «функціонально зв'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 зв'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, якщо промотор здатний впливати на транскрипцію або трансляцію молекули ДНК, яка транскрибується.

[0049] Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть бути запропоновані в одному варіанті реалізації винаходу як генетичні конструкції, які складаються із двох граничних областей пухлиноіндукуючої плазмиди (Ti), що мають області правої граничної ділянки (RB або AGRtu.RB) і лівої граничної ділянки (LB або AGRtu.LB) Ti -плазмиди, ізолюваної 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.

[0050] 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 загальноприйнятій композиції та способи отримання і використання генетичних конструкцій та клітин хазяїна добре відомі фахівцям у цій галузі техніки. Наприклад, типові вектори, використані для експресії нуклеїнових кислот у вищих рослинах, добре відомі у цій галузі техніки та включають вектори, отримані з Ti- плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* та pCaMVCN контрольного вектора для перенесення.

[0051] Різні регуляторні елементи можуть бути включені в генетичну конструкцію, включаючи будь-який з тих, що запропонований 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 зв'язаний із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка функціонально зв'язана з 3' НТО.

[0052] 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 зв'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 зв'язаним із гетерологічним промотором, таким як 35S промоторний транскрипт вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*)..

[0053] Експресійні касети також можуть включати кодуючу послідовність транзитного пептиду, яка кодує пептид, корисний для внутрішньоклітинного спрямування функціонально зв'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, ізолюваних 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 фотосенсибілізуєчого 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 зв'язаного з молекулою ДНК, яка транскрибується, що кодує нехлоропластні білки.

Молекула ДНК, яка транскрибується

[0054] 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 антисмислово 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.

[0055] «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.

[0056] Регуляторний елемент, такий як промотор відповідно до цього винаходу, може бути функціонально зв'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 зв'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у природі, тобто молекула ДНК, яка транскрибується, зазвичай не буває функціонально зв'язаною із регуляторним елементом.

[0057] 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.

[0058] 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 №: 1-37, функціонально зв'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 ділянку гена.

Гени, які представляють агрономічний інтерес

[0059] 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 зв'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 олій, 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.

[0060] 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).

[0061] 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 ендogenous 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 ендogenous 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.

Селективні маркери

[0062] 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 зв'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), люциферазу, зелений флуоресцентний білок (GFP), білки, які надають стійкості до антибіотиків і білки, які надають стійкості до гербіцидів.

Трансформація клітин

[0063] Винахід також спрямовується до способу отримання трансформованих клітин та рослин, які містять один або більше регуляторних елементів, функціонально зв'язаних з молекулою ДНК, яка транскрибується.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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.

[0067] 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.

[0068] Трансгенна рослина згодом може бути регенерована 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 рослина-нащадок, вирощена із такого насіння, будуть містити рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу і, отже, будуть трансгенними.

[0069] 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).

[0070] 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.

[0071] 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 пилок. 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.

[0072] Винахід пропонує також товарний продукт, який вироблений з трансгенної рослини або її частини, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК згідно винаходу. Товарні продукти, згідно винаходу, містять визначаєму кількість ДНК, що містить послідовність ДНК, виділену з групи, що складається з SEQ ID №: 1-37. Використаний у цьому винаході термін "товарний продукт" відноситься до будь-якої композиції або продукту, що складаються з матеріалу, отриманого з трансгенної рослини, насінини, рослинної клітини, або частини рослини, що містять рекомбінантну молекулу ДНК згідно винаходу. Товарні продукти включають, але не обмежуються цим, оброблене насіння, зерна, частини рослин і борошно грубого помелу. Товарний продукт за винаходом буде містити кількість ДНК, що може бити визначене, відповідно до рекомбінантної молекули ДНК згідно винаходу. Виявлення однієї чи більше цих послідовностей ДНК у зразку може бути використане для визначення змісту або джерела товарного продукту. Будь-який стандартний спосіб виявлення для молекул ДНК може бути використаний, у тому числі способи виявлення, розкриті в цьому винаході.

[0073] 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

[0074] Групи регуляторних елементів експресії (EXP) та ділянки термінації транскрипції (3' НТО) були ідентифіковані і клоновані з геномної ДНК дводольного виду *Medicago truncatula* (люцерна усічена). Вибір 3' НТО від *Medicago truncatula* був частково заснований на

паттернах експресії, що спостерігалися в гомологічних генах сої.

[0075] Ідентифікація та клонування 3' НТО *Medicago truncatula* почалося з вибору необхідних генів сої на підставі патерну експресії генів сої в обстежених тканинах сої і пропріетарних експериментів з транскрипції. Обрані гени сої потім використовувалися для пошуку гомологічних генів у *Medicago truncatula* з використанням загальнодоступних послідовностей ДНК. Потім зразки тканин, отримані від *Medicago truncatula* були виділені з рослин, вирощених за різних умов навколишнього середовища. Після цього матрична РНК (мРНК), була виділена з тканин люцерни та використана в експериментах із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР), з метою визначення характеру експресії генів люцерни. Отримана в цих експериментах підмножина генів *Medicago truncatula* була обрана для клонування та опису.

[0076] Біоінформаційний аналіз було проведено з застосуванням загальнодоступних послідовностей *Medicago truncatula*, щоб визначити регуляторні елементи локусів обраного гена люцерни. Наприклад біоінформаційний аналіз проводився з метою визначення послідовності 3' НТО, що містить поліаденілювання і кінцеві ділянки мРНК і послідовностей, що продовжуються до кінця ідентифікованого локусу гена. Праймери для ампліфікації були сконструйовані та використані для ампліфікації кожного з виявлених регуляторних фрагментів ДНК, таких як 3' НТО фрагменти ДНК, ДНК-фрагменти, що містять промотор, лідер і інтрон, і фрагменти ДНК, що містять промотор і лідер. Отримані фрагменти ДНК були ліговані в стандартні рослинні експресійні вектори і сіквензовані.

[0077] Для застосовуваних фрагментів ДНК потім проводився аналіз початку сайту транскрипції регуляторних елементів (СНТ) і інтрон/екзон кордону сплайсингу з застосуванням трансформованих протопластів рослин. У цьому аналізі, протопласти були трансформовані з використанням експресійних векторів рослин, що містять клоновані фрагменти ДНК функціонально зв'язані з гетерологічною молекулою ДНК, що транскрибується. Далі, 5' RACE система швидкої ампліфікації кінців кДНК, версія 2.0 (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія 92008) була використана для підтвердження регуляторних елементів (СНТ) і інтрон/екзон кордону сплайсингу шляхом аналізу послідовності ДНК сконструйованих транскриптів мРНК.

[0078] Послідовності ДНК ідентифікованих 3' НТО представлені в цьому документі в якості SEQ ID №: 1-30. Крім того, ідентифіковані послідовності ДНК промоторів, які представлені в цьому документі в якості SEQ ID №: 32 та 36; ідентифіковані лідерні послідовності ДНК, які представлені в цьому документі в якості SEQ ID №: 33 та 37; і ідентифікована інтрона послідовність ДНК, яка представлена як SEQ ID №: 34. Крім того, послідовності ДНК, ідентифікованих EXP представлені в цьому документі в якості SEQ ID №: 31 і 35. Група регуляторних елементів експресії EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31) містить промотор P-Mt.Ubq2-1:1:1 (SEQ ID №: 32), функціонально зв'язаний 5'-кінцем з лідером L-Mt.Ubq2-1:1:1 (SEQ ID №: 33), функціонально зв'язаний з 5'-кінцем з інтроном I-Mt.Ubq2-1:1:2 (SEQ ID №: 34), і група регуляторних елементів експресії EXP- Mt.AC145767v28:1:1 (SEQ ID №: 35) містить промотор P-Mt.AC145767v28-1:2:1 (SEQ ID №: 36), функціонально зв'язаний 5'-кінцем з лідером L-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 37). Всі послідовності ДНК ідентифіковані і клоновані з *Medicago truncatula* наведені в Таблиці 1.

Таблиця 1

3' НТО, групи регуляторних елементів експресії,
промотори, лідери і інтрони, клоновані з *Medicago truncatula*

Опис	SEQ ID №:	Примітка
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	AC145767.28
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	AC140914.20
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	AC139600.16
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	AC153125.10
T-Mt.Apx-1:1:2	5	цитозольна аскорбатпероксидаза
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	фактор елонгації-1 альфа
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	передбачувана оксидоредуктаза
T-Mt.FBA-1:1:5	8	фруктозо-бісфосфат альдолаза, цитоплазматичний фермент 1
T-Mt.FBA-1:2:1	9	фруктозо-бісфосфат альдолаза, цитоплазматичний фермент 2
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	ГФІ-заякорений білок
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	білок теплового шоку 20
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	попередник хлорофіл a/b-зв'язаного білка
T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	ліпоксигеназа
T-Mt.Methm-1:2:1	15	5-метілтетрагідроптероілтриглутамат-гомоцистеїн S-метілтрансфераза
T-Mt.MP21-1:2:1	16	білок дозрівання насіння
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	передбачувана оксидоредуктаза
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	інтегральний білок плазматичної мембрани
T-Mt.Prx-1:1:1	19	пероксидаза
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	попередник 5кДа білка фотосистеми II хлоропластів
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	попередник 5кДа білка фотосистеми II хлоропластів
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	переносник фосфата
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	переносник фосфата
T-Mt.RD22-1:2:1	24	посухо-відповідаючий білок
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	рибосомальний білок L3
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	алюміній-індукований білок Sali3-2
T-Mt.Scpl-1:2:1	27	серин карбоксипептидаз-зв'язаний білок
T-Mt.SeqID#21-1:2:1	28	пероксидаза
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	фактор ініціації трансляції SU11
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	білок цинковий палець CCHH типу
EXP-Mt.Ubq2-1:2	31	убіквітин 2
P-Mt.Ubq2-1:1:1	32	убіквітин 2
L-Mt.Ubq2-1:1:1	33	убіквітин 2
I-Mt.Ubq2-1:1:2	34	убіквітин 2
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	35	AC145767.28
P-Mt.AC145767v28-1:2:1	36	AC145767.28
L-Mt.AC145767v28-1:1:2	37	AC145767.28

Приклад 2

- Аналіз ефекту 3' НТО на конститутивну експресію GUS у протопластах з листків сої
- 5 [0079] Протопласти з листків сої були трансформовані з застосуванням векторів, зокрема, плазмідних конструктів, для оцінки впливу обраних 3' НТО *Medicago truncatula* на експресію. Протопласти з листків сої були трансформовані з використанням ДНК векторів, які містять конститутивну послідовність EXP, що регулює експресію трансгена β-глюкуронідази (GUS) функціонально зв'язану з 3' НТО люцерни. Ці трансформовані з допомогою 3' НТО люцерни протопласти з листків сої були порівняні з протопластами з листків сої в яких експресія трансгена GUS регулюється конститутивним промотором і трансген GUS функціонально зв'язаний з 3' НТО, яка отримана з *Gossypium hirsutum* або *Gossypium*
- 10

barbadense.

[0080] Рослинні вектори, як використовуються в цих експериментах, були сконструйовані з використанням способів клонування, відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори, що містять ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, що проявляють стійкість або до гербіциду гліфосату, або до антибіотику спектиноміцину (обидва керуються промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності 3' НТО, що містить EXP або промоторну послідовність функціонально зв'язану 5'-кінцем з послідовністю ДНК для GUS, яка містить інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний 5'-кінцем з 3' НТО, отриманої з *Medicago truncatula*, *Gossypium hirsutum* або *Gossypium barbadense*; и праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*.

Вектори, які містять 3' НТО, що отримана з люцерни (тобто. pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122862, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867, та pMON122868) використовують групу регуляторних елементів експресії EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42) для керування GUS. Вектори, які містять 3' НТО, що отримана з *Gossypium hirsutum* або *Gossypium barbadense* (тобто pMON81345, pMON81347, та pMON83002) використовують конститутивний промотор P-CaMV.35S- enh-1:1:11 (SEQ ID №: 43) для керування GUS.

[0081] У таблиці 2 наводяться плазмідні конструкти, які містять відповідну 3' НТО і SEQ ID №, які використані для трансформації протопластів сої в експериментах, представлених у цьому прикладі.

Таблица 2

Опис плазмідних конструктів використаних
для трансформації протопластів з листків сої та 3' НТО

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11
pMON116830	T-Mt.Scpi-1:2:1	27
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

[0082] Два рослинних вектора, зокрема плазмідні конструкції, для використання в ко-трансформації та нормалізації даних були сконструйовані з використанням способів

клонування, відомих в цій галузі техніки. Кожна з плазмідних конструкцій містила специфічну послідовність, що кодує люциферазу, яка керується конститутивною EXP. Рослинний вектор pMON19437 містить експресійну касету з конститутивною EXP, що містить промотор, функціонально зв'язаний 5'-кінцем з лідерною послідовністю, яка функціонально зв'язана 5'-кінцем з інтроном (EXP-CaMV.35S-ENH+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID №: 47), функціонально зв'язаним 5'-кінцем з послідовністю люциферази світляка (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID №: 45), функціонально зв'язаною 5'-кінцем з 3' НТО від гена нопалин синтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID №: 49). Рослинний вектор pMON63934 містить експресійну касету з конститутивною EXP, що містить промотор, функціонально зв'язаний 5'-кінцем з лідерною послідовністю, яка функціонально зв'язана 5'-кінцем з інтроном (EXP-CaMV.35S-enh+Lhcb1, SEQ ID №: 48), функціонально зв'язаним 5'-кінцем з послідовністю люциферази ренілі морської (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID №: 46), функціонально зв'язаною 5'-кінцем з 3' НТО від гена нопалин синтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID №: 49).

[0083] Протопласти з листків сої були перетворені з використанням способу трансформації, заснованому на застосуванні поліетиленгліколю (ПЕГ), який добре відомий у цій галузі техніки. Кожен протопласт був трансформований плазмідним конструктом pMON19437, плазмідним конструктом pMON63934, і одним з плазмідних конструктів, представлених у Таблиці 2. Після трансформації трансформовані протопласти листків сої інкубували протягом ночі в повній темряві. В слід за цим проводилося вимірювання GUS і люциферази шляхом розміщення аліквоти препарату лізованих трансформованих клітин у двох різних малих лотках. Один лоток використовувався для вимірювання GUS, а другий – для виконання подвійного аналізу люциферази з використанням системи аналізу репортерного гена подвійної люциферази (Promega Corp., Madison, WI; см., наприклад, Promega Notes Magazine, № 57, 1996, p.02).

[0084] Одна або дві трансформації були виконані для кожного плазмідного конструкта представленого в Таблиці 2. Середні значення експресії для кожної 3' НТО були визначені від декількох зразків з кожної трансформації. Заміри зразків проводили з використанням чотирьох повторів для кожної трансформації плазмідним конструктом, або ж, три повтору для кожного плазмідного конструкта на один з двох експериментів з трансформації. Середні значення рівнів експресії GUS і люциферази наведені в Таблиці 3. У цій таблиці значення люциферази світляка (наприклад, при експресії pMON19437) представлені в стовпці "FLuc" і значення люциферази ренілі морської (наприклад, при експресії pMON63934) представлені в стовпці "RLuc".

Таблиця 3

Значення аналізів GUS та люциферази в трансформованих протопластах з листків сої

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	GUS	FLuc	RLuc
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41	795	2332,5	3701
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	73	584,3	802
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39	91	1142,8	1995
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	4783	3619	12341
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	15053	4801,7	15876
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	9771	4202,3	10976
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	7482	3347,3	8395
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	30469	6428	17764
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	22330	3580,5	9984
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	269	343,7	478
pMON116830	T-Mt.Scip-1:2:1	27	3909	4683,7	10180
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	33403	11049	28226
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	12833	11198	22722
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	14811	8775,5	25229
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	40383	17826	50299
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	21870	16141,3	56362
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	24386	6782,7	15024

Продовження таблиці 3

pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	30753	12929,8	40571
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	14499	5586,7	15222
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	27768	14680	35263
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	40579	15837,7	36515
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	34867	17285,5	52519
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	33664	11923	27663
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	7088	9885,3	19590
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	14539	7563,5	22320

- 5 [0085] Крім того, для порівняння відносної активності кожного 3' НТО, значення GUS були представлені як відношення GUS до активності люциферази та нормовані до кращого значення експресії без 3' НТО люцерни, тобто T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID №: 41). У Таблиці 4 наведені співвідношення GUS/люцифераза і нормалізовані співвідношення. Також в цій таблиці значення люциферази світляка позначені "FLuc", значення люциферази реніли морської представлені як "RLuc"

Таблиця 4

Значення експресії GUS/FLuc і GUS/RLuc у трансформованих протопластах із листків сої, нормалізовані по відношенню до T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID №: 41)

Опис 3' НТО	SEQ ID №:	GUS/FLuc	GUS/RLuc	GUS/FLuc нормалізовано до T-Gb.FbL2- 1:1:1	GUS/RLuc нормалізовано до T- Gb.FbL2- 1:1:1
T-Gb.FbL2-1:1:1	41	0,34	0,21	1,00	1,00
T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	0,12	0,09	0,37	0,42
T-Gb.H6-1:2:1	39	0,08	0,05	0,23	0,21
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	1,32	0,39	3,88	1,80
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,13	0,95	9,20	4,41
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	2,33	0,89	6,82	4,14
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	2,24	0,89	6,56	4,15
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	4,74	1,72	13,91	7,98
T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	6,24	2,24	18,30	10,41
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	0,78	0,56	2,30	2,62
T-Mt.Scpi-1:2:1	27	0,83	0,38	2,45	1,79
T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,02	1,18	8,87	5,51
T-Mt.Prx-1:1:1	19	1,15	0,56	3,36	2,63
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	1,69	0,59	4,95	2,73
T-Mt.FBA-1:1:5	8	2,27	0,80	6,65	3,74
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	1,35	0,39	3,98	1,81
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	3,60	1,62	10,55	7,56
T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,38	0,76	6,98	3,53
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	2,60	0,95	7,61	4,43
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	1,89	0,79	5,55	3,67
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,56	1,11	7,52	5,17
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2,02	0,66	5,92	3,09
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,82	1,22	8,28	5,67
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	0,72	0,36	2,10	1,68
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1,92	0,65	5,64	3,03

- 10 [0086] Як показано в Таблиці 4, експресія GUS була збільшена за допомогою обраних 3' НТО люцерни, в порівнянні з 3' НТО з *Gossypium hirsutum* або *Gossypium barbadense*.
15 Наприклад, експресія GUS була в 2,1 - 18,3 рази вища, при використанні отриманих з 3' НТО люцерни на підставі співвідношень GUS/FLuc, нормованих по відношенню до T-Gb.FbL2-1:1:1, кращих експресій 3' НТО, отриманих з *Gossypium hirsutum* або *Gossypium barbadense*.
Так само, експресія в GUS була 1.61 - 10.48 рази вища, при використанні отриманих з 3'

НТО люцерни на підставі співвідношень GUS/FLuc, нормованих по відношенню до T-Gb.FbL2-1:1:1.

Приклад 3

Аналіз впливу 3' НТО на конститутивну експресію GUS у стабільно трансформованих рослинах сої

[0087] Рослини сої були трансформовані за допомогою векторів, зокрема плазмідних конструктів, для встановлення впливу окремих 3' НТО *Medicago truncatula* на експресію. Зокрема, рослини сої трансформували векторами, які містять конститутивну послідовність EXP, яка керує експресією трансгена β -глюкуронідази (GUS) функціонально зв'язаного з 3' НТО люцерни. Ці рослини сої, які трансформовані за допомогою 3' НТО від люцерни порівнювали з трансформованими рослинами сої, в яких експресія трансгена GUS керувалася конститутивним промотором, і трансген GUS був функціонально зв'язаний з 3' НТО, яка отримана з *Gossypium barbadense*.

[0088] Рослинні вектори, використані в експериментах були сконструйовані з використанням способів клонування відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори, містили ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, які проявляють стійкість до антибіотика спектиномицину (що керується промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності 3' НТО, що містить групу регуляторних елементів експресії EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42), функціонально зв'язану 5'-кінцем з кодуючою послідовністю для GUS, яка містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний 5'-кінцем з 3' НТО, що отримана з *Medicago truncatula* або *Gossypium barbadense*; і праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*. Вектори, які містять 3' НТО, яка отримана з *Medicago truncatula*: pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830, pMON122850, pMON122851, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122861, pMON122862, pMON122863, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867, і pMON122868. Вектор, який містить 3' НТО, що отримана з *Gossypium barbadense* – pMON102167.

[0089] Таблиця 5 представляє плазмідні конструкти з відповідною 3' НТО і SEQ ID №, які використовуються для трансформації рослин в експериментах, представлених у Прикладі.

Таблиця 5

Плазмідні конструкти, які використовуються для трансформації рослин і опис 3' НТО

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11
pMON116830	T-Mt.Scpi-1:2:1	27
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5

pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

[0090] Рослини сої були трансформовані з використанням агробактеріальних способів трансформації, відомих в цій галузі техніки. Експресія GUS була кількісно виміряна за допомогою гістологічних зрізів відібраних тканин. Для гістохімічного аналізу GUS повноцінні зрізи тканин інкубували з GUS-забарвлюючим розчином X-Gluc (5-бромо-4- хлоро-3-індол- β -глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали і візуально досліджували на наявність синього забарвлення. GUS активність якісно визначається шляхом прямого візуального огляду або огляду під мікроскопом, використовуючи вибрані органи і тканини рослин. R0 покоління рослин було проаналізовано на наявність експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, R1 квітці, зародку жовтого боба (приблизно R8 стадія розвитку), сім'ядолі жовтого боба (приблизно R8 стадія розвитку), R3 незрілій насінині, R3 бобі, і R5 сім'ядолі.

[0091] Кількісні зміни в експресії GUS пов'язані з експресією обумовленої pMON102167, який містить 3' НТО, яка отримана з *Gossypium barbadense*, було також проаналізовано, як продемонстровано в Таблицях 6-13. Для цього кількісного аналізу загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин. Один мікрограм загального білка був використаний з флюорогенним субстратом 4-метилумбреліферил- β -D- глюкуронід (МУГ) у загальному реакційному об'ємі 50 мкл. Продукт реакції, 4- метилумбреліферил (4-МУ), максимально флуоресціює за умов високого рН, коли гідроксильна група іонізована. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє аналіз та регулює рН для підрахунку флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали зі збудженням при 365 нм, емісією при 445 нм, використовуючи Fluoromax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Microtmax Reader, із шириною щілини, що встановлена на збудження на 2 нм та 3 нм на емісію.

[0092] Таблиці 6 і 7 демонструють середнє значення кількісних рівнів експресії, які виміряно у тканинах рослин покоління R0. Тканини, які не аналізували показано як порожні клітинки в обох таблицях.

Таблиця 6

Середнє значення кількісних рівнів експресії GUS у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, і R1 квітці рослин покоління R₀

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Черешок	R1 Квітка
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	740,77	654,50	946,25	579,76	342,11	215,37
pMON116803	T-Mt.AC140914 v20-1:2:1	2	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	649,15	785,16	1103,30	644,76	297,30	294,38
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	382,80	891,91	1026,78	262,82	253,94	179,31
pMON116815	T-Mt.AC145767 v28-1:1:2	1	3817,28	1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	1093,15	1626,41	2030,11	3315,25	1376,39	1980,93
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	839,31	1263,82	1172,16	617,58	457,17	235,01
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	240,31	187,07	330,49	113,50	20,79	41,73
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	479,50	673,20	687,00	388,10	524,10	202,68

Продовження таблиці 6

pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	897,98	287,52	667,63	325,50	1056,16	407,35
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	852,05	1003,70	456,38	883,30	560,70	184,02
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	858,88	591,51	362,40	841,82	459,48	220,29
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	957,90	910,53	343,90	583,62	570,15	198,11
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	1293,27	396,14	338,26	167,55	113,14	94,21
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	254,48	250,56	154,27	425,90	223,53	115,33
pMON122857	T-Mt.AC139600 v16-1:2:1	3	1035,43	1014,18	579,85	1631,94	921,34	421,81
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	408,94	299,07	282,34	315,48	562,46	308,11
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3228,98	1315,58	2092,77	849,69	406,58	98,10
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	974,70	433,60	510,50	263,00	103,70	117,70
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	1131,24	710,62	604,88	342,22	182,58	219,67
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	667,00	281,00	398,30	171,40	323,10	281,30
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	448,00	203,00	240,00	401,00	369,00	355,00
pMON122865	T-Mt.AC153125 V10- 1:2:1	4	385,42	160,51	298,16	239,01	104,64	32,62
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	753,94	544,73	395,30	675,68	668,83	255,68
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1151,60	608,21	692,82	235,62	87,40	157,45

Таблиця 7

Середнє значення кількісних рівнів експресії GUS у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 незрілій насінині, R3 бобі, і R5 сім'ядолі рослин покоління R₀

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'ядо ля жовтого боба	R3 Незріла насінина	R3 боб	R5 сім'ядоля
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	18,56	170,11	28,63	406,13	71,91
pMON116803	T-Mt.AC140914v20- 1:2:1	2	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	74,53	120,30	163,76	526,08	407,40
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	127,65	279,84	78,12	282,34	50,92
pMON116815	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	1	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	280,48	577,87	231,15	2868,17	341,60
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	118,18	127,74	10,96	37,22	27,80
pMON116830	T-Mt.Scpi-1:2:1	27	57,11	72,33	23,96	271,88	98,36
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	265,30	489,70	57,40	487,50	264,40
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	95,88	189,41	121,12	1045,20	72,23
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	153,46	320,64	53,24	686,92	518,51
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	46,64	146,53	38,64	360,48	103,28
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	165,11	160,40	66,44	464,75	245,85
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	172,21	381,32	111,57	496,04	306,13
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	46,37	44,66	87,51	775,69	57,17
pMON122857	T-Mt.AC139600 v16- 1:2:1	3	142,78	243,74	45,58	615,99	452,09
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	102,11	260,98	137,76	667,18	169,16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	192,92	539,13	74,44	950,85	43,69
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	53,50	217,70	37,90	95,30	174,50
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	195,81	502,37	62,10	135,60	500,71
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	136,80	270,20	127,20	387,10	150,00
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	140,00	220,00	87,00	398,00	102,00

Продовження таблиці 7

pMON122865	T-Mt.AC153125 V10- 1:2:1	4	20,55	56,64			11,83
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	126,53	334,27			59,33
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	136,36	242,52	77,11	509,01	73,23
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	201,21	186,14	208,37	1264,62	203,90

5 [0093] В таблицях 6 і 7 продемонстровано, що експресія, що керується однаковими EXP відрізнялася в тканинах стабільно трансформованих рослин сої, що містять різні 3' НТО люцерни, порівняно з 3' НТО, які отримано з *Gossypium barbadense*.

[0094] Таблиці 8 і 9 демонструють кратні зміни експресії в тканинах стабільно трансформованих рослин сої, що містять різні 3' НТО люцерни, порівняно з 3' НТО, які отримані з *Gossypium barbadense*.

Таблиця 8

Кратність змін експресії у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₀

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Квітка
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	1,85	1,19	1,56	1,65	0,52
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,26	4,12	3,61	0,98	0,59
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	1,62	1,42	1,82	1,84	0,71
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	0,95	1,62	1,70	0,75	0,43
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	9,52	3,52	5,37	3,97	2,12
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	2,73	2,95	3,35	9,45	4,80
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,09	2,29	1,94	1,76	0,57
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	0,60	0,34	0,55	0,32	0,10
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	1,20	1,22	1,14	1,11	0,49
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,24	0,52	1,10	0,93	0,99
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	2,13	1,82	0,75	2,52	0,45
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	2,14	1,07	0,60	2,40	0,53
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	2,39	1,65	0,57	1,66	0,48
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,23	0,72	0,56	0,48	0,23
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,63	0,45	0,25	1,21	0,28
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,58	1,84	0,96	4,65	1,02
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	1,02	0,54	0,47	0,90	0,75
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,05	2,39	3,46	2,42	0,24
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	2,43	0,79	0,84	0,75	0,29
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	2,82	1,29	1,00	0,98	0,53
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	1,66	0,51	0,66	0,49	0,68
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	1,12	0,37	0,40	1,14	0,86
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,96	0,29	0,49	0,68	0,08
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	5,67	2,13	2,46	2,78	0,11
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	1,88	0,99	0,65	1,93	0,62
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	2,87	1,10	1,14	0,67	0,38

Таблиця 9

Кратність змін експресії у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 незрілій насініні, R3 бобі, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₀

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'ядоля жовтого боба	R3 Незріла насініна	R3 боб	R5 сім'ядоля
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	0,39	3,44	0,42	0,94	0,71
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	1,56	2,43	2,43	1,21	4,02
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	2,67	5,66	1,16	0,65	0,50
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	5,86	11,69	3,43	6,62	3,37
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,47	2,58	0,16	0,09	0,27
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	1,19	1,46	0,36	0,63	0,97
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	5,54	9,90	0,85	1,12	2,61
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,00	3,83	1,80	2,41	0,71
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,21	6,48	0,79	1,58	5,12
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	0,97	2,96	0,57	0,83	1,02
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	3,45	3,24	0,99	1,07	2,43
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,60	7,71	1,65	1,14	3,02
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,97	0,90	1,30	1,79	0,56
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,98	4,93	0,68	1,42	4,46
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,13	5,28	2,04	1,54	1,67
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	4,03	10,90	1,10	2,19	0,43
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	1,12	4,40	0,56	0,22	1,72
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	4,09	10,16	0,92	0,31	4,94
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	2,86	5,46	1,89	0,89	1,48
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,93	4,45	1,29	0,92	1,01
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,43	1,15			0,12
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,64	6,76			0,59
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	2,85	4,90	1,14	1,17	0,72
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	4,20	3,76	3,09	2,92	2,01

[0095] У таблицях 8 та 9 продемонстровано, що експресія в тканинах трансформованих рослин сої, які містять різні 3' НТО люцерни відрізнялася при порівнянні з рослинами сої, трансформованими з використанням pMON102167, що містять 3' НТО отримані з *Gossypium barbadense*. Наприклад, дві 3' НТО люцерни T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1) і T-Mt.Lox-1-1:2:1 (SEQ ID №: 14) приводили до посиленої експресії конститутивної EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42) у всіх тканинах. Інші 3' НТО люцерни приводили до посиленої експресії конститутивної EXP в одних тканинах, знижуючи її в інших. Наприклад 3' НТО T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID №: 26) призводила до 2,19-8,05-разового посилення експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба, при цьому знижуючи експресію в R1 квітці і R5 сім'ядолі. До того ж 3' НТО T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID №: 2) призводила до 1,88-4,12 -разового посилення експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба R3 незрілій насініні і R5 молодому листі, при цьому знижуючи експресію в R1 зрілому листі, R1 квітці і зберігаючи експресію на відносно незмінному рівні в R3 бобі. Крім того 3' НТО T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID №: 17) забезпечувала 2,19-10,90 -разове посилення експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба і R3 бобі, при цьому знижуючи експресію в R1 квітці і R5 сім'ядолі і зберігаючи експресію на відносно незмінному рівні в R3 незрілій насініні.

[0096] Деякі трансформовані рослини сої, що містять різні 3' НТО люцерни використовувалися для отримання покоління R₁. Таблиці 10 і 11 демонструють середнє значення експресії GUS у досліджених тканинах. Таблиці 12 і 13 демонструють кратні зміни експресії щодо 3' НТО, які отримані з *Gossypium barbadense*.

5

Таблиця 10

Середнє значення експресії GUS у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R₁ зрілому листі, R₁ черешку, і R₁ квітці трансформованих рослин сої покоління R₁

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R ₁ Зрілий лист	R ₁ Черешок	R ₁ Квітка
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	934,22	992,31	1210,30	856,01	570,64	603,61
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	1462,92	1169,79	1495,65	1159,28	647,86	506,70
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	5555,77	5146,48	4447,42	2654,13	2825,41	2584,82
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3726,08	3090,41	3862,55	2666,68	1160,66	1041,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3438,35	2856,04	2510,49	2012,63	1087,69	919,57

Таблиця 11

Середнє значення експресії GUS у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R₃ незрілій насініні, R₃ бобі, і R₅ сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₁

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'я-доля жовтого боба	R ₃ Незріла насініна	R ₃ боб	R ₅ сім'ядоля
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	85,27	174,11	298,03	567,48	85,11
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	468,66	537,77	171,00	976,84	342,29
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1314,44	2134,97	1039,30	4506,45	1842,61
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	730,81	1098,62	245,45	1947,45	423,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	686,08	988,27	488,62	1068,10	757,12

[0097] Таблиці 10 і 11 демонструють, що експресія, яка керується однаковими EXP відрізняється в різних тканинах стабільно трансформованих рослин сої, що містять різні 3' НТО люцерни порівняно з 3' НТО, отриманими з *Gossypium barbadense*. Таблиці 12 і 13 демонструють кратність змін експресії в тканинах стабільно трансформованих рослин сої, що містять різні 3' НТО люцерни по відношенню до тканин, які трансформовані із застосуванням pMON102167, який містить 3' НТО, що отримані з *Gossypium barbadense*.

10

Таблиця 12

Кратність змін експресії у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R₁ зрілому листі, R₁ черешку, і R₁ квітці трансформованих рослин сої покоління R₁

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R ₁ Зрілий лист	R ₁ Черешок	R ₁ Квітка
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	1,57	1,18	1,24	1,35	1,14	0,84
pMON116815	T-Mt.AC145767 v28- 1:1:2	1	5,95	5,19	3,67	3,10	4,95	4,28
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3,99	3,11	3,19	3,12	2,03	1,73
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3,68	2,88	2,07	2,35	1,91	1,52

15

Таблиця 13

Кратність змін експресії у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба,
R3 незрілій насінині, R3 бобі, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₁

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'ядол я жовтого боба	R3 Незріла насінина	R3 боб	R5 сім'я-доля
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	5,50	3,09	0,57	1,72	4,02
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	15,42	12,26	3,49	7,94	21,65
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,57	6,31	0,82	3,43	4,97
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	8,05	5,68	1,64	1,88	8,90

[0098] Таблиці 12 і 13 демонструють, що деякі 3' НТО люцерни приводили до посиленої експресії конститутивної EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42) по відношенню до рослин, які трансформовані з використанням pMON102167, що містить 3' НТО, отримані з *Gossypium barbadense* покоління R₁. Наприклад, 3' НТО, T- Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1) забезпечує посилення експресії GUS у 3,10-21,65 рази у всіх досліджених тканинах. 3' НТО, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID №: 26) забезпечує посилення експресії GUS у 1,52-8,90 рази у всіх досліджених тканинах. 3' НТО, T-Mt.Oxr- 1:2:1 (SEQ ID №: 17) забезпечує посилення експресії в більшості тканин, проте призводить до її зниження в R3 незрілій насінині, відносно до рослин, які трансформовані з використанням T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40).

[0099] Вищезазначені експерименти демонструють, що 3' НТО люцерни приводили до посиленої експресії конститутивної елементів EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42) різними шляхами, в залежності від обраної 3' НТО. У багатьох випадку спостерігалось посилення експресії в деяких тканинах рослин, трансформованих із застосуванням рослинних експресійних векторів, що містить 3' НТО люцерни, порівняно з рослинами, трансформованими за допомогою pMON102167, що містить 3' НТО, отриману з *Gossypium barbadense*. Однак ефект посилення спостерігався не у всіх тканинах рослини, і в деяких випадках застосування 3' НТО люцерни експресія послаблювалася в одних тканинах і посилювалася в інших. Таким чином, застосування конкретної 3' НТО люцерни дозволяє добитися "тонкої настройки" профілю експресії конкретного трансгена і може бути використана в поєднанні з різними елементами експресії, такими як промотори, лідери і інтрони функціонально зв'язаними з молекулою ДНК, що транскрибується, для забезпечення оптимальної експресії в конкретних тканинах, при одночасному зниженні експресії в тканинах, які є менш бажаними для конкретної молекули ДНК, що транскрибується.

Приклад 4

Аналіз впливу 3' НТО на експресію GUS у насінні стабільно трансформованих рослин сої

[00100] Рослини сої були трансформовані за допомогою векторів, зокрема плазмідних конструктів, для встановлення впливу окремих 3' НТО люцерни на експресію. Зокрема, рослини сої трансформували векторами, які містять конститутивну послідовність EXP, яка керує експресією трансгена β-глюкуронідази (GUS) функціонально зв'язаного з 3' НТО люцерни. Ці рослини сої, трансформовані за допомогою 3' НТО від люцерни порівнювалися з трансформованими рослинами сої, в яких експресія трансгена GUS управлялася експресійними послідовностями EXP насіння, і трансген GUS функціонально зв'язан з 3' НТО, яка отримана з *Gossypium barbadense*

[00101] Рослинні вектори, використані в експериментах були сконструйовані з використанням методів клонування відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори, містили ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, що проявляють стійкість до антибіотика спектиноміцину (яка керується промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності 3' НТО, що містить групу регуляторних елементів експресії EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID №: 50), що забезпечує експресію в насінні, функціонально зв'язану 5'-кінцем з кодуючою послідовністю для GUS, яка містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний 5'-кінцем з 3' НТО, що отримана з *Medicago truncatula* або *Gossypium barbadense*; і праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*. Вектори, які містять 3' НТО отриману з *Medicago truncatula*: pMON116832, pMON116834, pMON116835,

pMON116841, pMON122869, pMON122870, pMON122871, pMON122872, pMON122873, pMON122874, pMON122875, pMON122876, pMON122878, pMON122879, pMON122880, pMON122881, pMON122882, pMON122883, pMON122885, pMON122887, pMON122888, i pMON126122. Вектор, який містить 3' НТО отриману з *Gossypium barbadense* – pMON83028.

- 5 [00102] У таблиці 14 наводяться плазмідні конструкти з відповідною 3' НТО і SEQ ID № і покоління, для яких проводяться кількісні аналізи.

Таблиця 14

Плазмідні конструкти, які використовуються для трансформації рослин сої та відповідні 3' НТО

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Покоління, для яких надаються дані
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	R ₁
pMON116832	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	R ₀
pMON116834	T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	R ₀
pMON116835	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	R ₀
pMON116841	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	R ₀
pMON122869	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	R ₀
pMON122870	T-Mt.RD22-1:2:1	24	R ₀
pMON122871	T-Mt.Methm-1:2:1	15	R ₀
pMON122872	T-Mt.Prx-1:1:1	19	R ₀
pMON122873	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	R ₀
pMON122874	T-Mt.FBA-1:2:1	9	R ₀
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	R ₀ і R ₁
pMON122876	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	R ₀
pMON122878	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	R ₀
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	R ₀ і R ₁
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	R ₀ і R ₁
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	R ₀ і R ₁
pMON122882	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	R ₀
pMON122883	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	R ₀
pMON122885	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀
pMON122887	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	R ₀
pMON122888	T-Mt.Pt2-1:2:2	23	R ₀
pMON126122	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀

- 10 [00103] Трансформування рослини сої та аналіз GUS проводилися як описано в Прикладі 3. Таблиці 15 і 16 демонструють кількісні середні значення GUS для стабільно трансформованих рослин сої покоління R₀.

Таблиця 15

Середнє значення експресії GUS у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 незрілій насініні, R3 бобі, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₀

Плазмідний конструкт	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'ядоля жовтого боба	R3 Незріла насініна	R3 боб	R5 сім'ядоля
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	572	1045	9	6	8
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	210	371	7	6	61
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1445	4264	11	8	47
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	218	774	15	16	60
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	683	1087			
T-Mt.RD22-1:2:1	24	3164	6809	30	15	24
T-Mt.Methm-1:2:1	15	459	2136	7	6	74
T-Mt.Prx-1:1:1	19	109	794	9	6	42
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	241	745	6	5	

Продовження таблиці 15

T-Mt.FBA-1:2:1	9	622	772	10	6	100
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	192	193	2	2	31
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	319	2150	8	6	157
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	995	3220	5	4	235
T-Mt.Apx-1:1:2	5	41	272	10	9	10
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	120	546	15	116	16
T-Mt.EF1a-1:1:2	6			10	9	17
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	670	614	8	9	5
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2079	4192	8	6	62
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	385	1092	11	5	299
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	142	630	14	14	426
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	440	513	2	1	10
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	527	1122	15	6	154

Таблиця 16

Середнє значення експресії GUS у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₀

Плазмідний конструкт	Оп ис 3' НТО	SEQ ID №:	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Черешок	R1 Квітка
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	23	4	6	4	4	4	4
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	29	5	8	6	3	3	3
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	10	3	4	0	0	0	0
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	8	5	5	5	5	6	6
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	60	26	22	7	8	9	9
T-Mt.RD22-1:2:1	24	21	2	3	12	11	11	11
T-Mt.Methm-1:2:1	15	8	4	4	0	0	0	0
T-Mt.Prx-1:1:1	19	5	5	5	0	0	0	0
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	20	8	6	8	6	8	8
T-Mt.FBA-1:2:1	9	9	3	3	18	15	17	17
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	41	13	14	7	5	6	6
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	7	5	5	0	0	0	0
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	7	3	8	0	0	0	0
T-Mt.Apx-1:1:2	5	31	16	19	1173	294	357	357
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	29	20	19	10	5	4	4
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	8	3	3	16	19	19	19
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	15	7	6	8	4	3	3
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	16	5	3	0	0	0	0
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	22	8	10	6	3	3	3
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	8	6	5	5	6	6	6
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	34	11	11	6	6	6	6
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	15	6	8	5	4	4	4

[00104] Як видно з таблиць 15 і 16, більшість 3' НТО люцерни впливали на експресію конститутивної EXP насінини EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID №: 50), за винятком T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID №: 5), яка посилювала експресію GUS в R1 зрілому листі, R1 сім'ядолі, і R1 квітці. Деякі 3' НТО люцерни забезпечували високу експресію в зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба, такі як T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1), T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID №: 24) і T-Mt.AC153125V10-1:2:1 (SEQ ID №: 4). Тому ці 3' НТО будуть ідеальні для посилення експресії промотора в насінні на пізніх етапах формування насіння. 3' НТО T-Mt.Expr1-1:2:1 (SEQ ID №: 7) забезпечує високий рівень експресії як у R5 сім'ядолі, так і в сім'ядолі жовтого боба порівняно з іншими 3' НТО, що може бути вигідно для забезпечення експресії в широкому часовому відрізку розвитку насінини. У деяких випадках 3' НТО, такі як T-Mt.FBA-1:2:1 (SEQ ID №: 9), T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID №: 30), T-Mt.Pip1-1:2:1 (SEQ ID №: 18), і T-Mt.Pt2-1:2:2 (SEQ ID №: 23) забезпечують більш рівномірний рівень експресії в насінині, як

у зародку жовтого боба, так і в сім'ядолі жовтого боба.

- [00105] Рослини покоління R0, містять T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID №: 30), T-Mt.Apx- 1:1:2 (SEQ ID №: 5), T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID №: 29), і T-Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID №: 6) дали насіння, яке було висаджено для вивчення покоління R1. Таблиця 17 демонструє порівняння середніх значень кількісних аналізів цих, рослин покоління R1, які містять 3'НТО люцерни і рослин, трансформованих із застосуванням pMON83028, яка містить 3' НТО T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40), що отримана з *Gossypium barbadense*.

Таблиця 17

Середнє значення експресії GUS у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R1

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	SEQ ID №:	Зародок жовтого боба	Сім'ядоля жовтого боба	R5 Сім'ядоля
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	102	362	7
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	56	153	498
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	205	645	777
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	462	1241	355
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	415	1059	11

- [00106] Як видно з Таблиці 17, 3' НТО люцерни впливає на експресію інакше, ніж T-Gb.E6-3b:1:1 в зародкових і сім'ядольних тканинах. Наприклад, T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID №:

- 5) і T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID №: 29) посилюють експресію EXP в насінні в зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, і R5 сім'ядолі, у порівнянні з T-Gb.E6-3b:1:1. T- Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID №: 6) підсилює експресію в зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба, але не в R5 сім'ядолі. T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID №: 30) знижує експресію на пізніх етапах розвитку зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба, однак посилює в R5 сім'ядолі.

- [00107] Таким чином, кожен конкретний 3' НТО люцерни диференціально впливає на розвиток насіння, коли він функціонально зв'язаний з промотором насіння. Ці відмінності у впливі на експресію можуть бути використані для забезпечення більш точного та індивідуального підходу регуляції експресії в насінні і може ідеально підходити для "тонкої настройки" профілю експресії конкретно молекули ДНК, що транскрибується, для забезпечення експресії в насінні.

Приклад 5

- Аналіз впливу 3' НТО на конститутивну експресію GUS у стабільно трансформованих рослинах сої

- [00108] Рослини сої були трансформовані за допомогою векторів, зокрема плазмідних конструктів, для встановлення впливу окремих 3' НТО люцерни на експресію. Зокрема, рослини сої трансформували векторами, які містять 2 різних конститутивних послідовностей EXP, які керують експресією трансгена β-глюкуронідази (GUS) функціонально зв'язаного з 3' НТО люцерни. Ці рослини сої, що трансформовані за допомогою 3' НТО від люцерни порівнювалися з трансформованими рослинами сої, в яких експресія трансгена GUS функціонально зв'язана з 3' НТО отриманої з *Gossypium barbadense*.

- [00109] Рослинні вектори, використані в цих експериментах були сконструйовані з використанням способів клонування відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори, містили ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, що проявляють стійкість до антибіотика спектиномицину (яка керується промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності 3' НТО, що містить елементи експресії EXP- EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42) або EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID №: 51), функціонально зв'язану 5'-кінцем з кодуючою послідовністю GUS, яка містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний з 5'-кінцем 3' НТО, яка отримана з *Medicago truncatula* або *Gossypium barbadense*; і праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*. Вектори, які містять 3' НТО отриману з *Medicago truncatula*: pMON118768, pMON153701 і pMON116803. Вектори, які містять 3' НТО отриману з *Gossypium barbadense*: pMON121042 і pMON102167.

- [00110] Таблиця 18 демонструє плазмідні конструкти, з відповідними елементом EXP, 3' НТО і SEQ ID №, що використані для трансформації рослин сої, представлених в цьому Прикладі.

Таблиця 18

Плазмідні конструкти, які використовуються для трансформації рослин сої, відповідні EXP і 3' НТО

Плазмідний конструкт	Опис EXP	EXP SEQ ID №:	Опис 3' НТО	3' НТО SEQ ID №:
pMON121042	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118768	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON153701	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON122866	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON116803	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2

5 [00111] Трансформування рослини сої та аналіз GUS проводився як описано в Прикладі 3. Таблиці 19 і 20 демонструють кількісні середні значення GUS для стабільно трансформованих рослин сої покоління R₀.

Таблиця 19

Середнє значення експресії GUS у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₀

Опис EXP	Опис 3' НТО	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Черешок	R1 Квітка
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	780,79	688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	4782,43	1009,59	1208,48	363,55	1425,76	1398,80
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3792,66	725,38	1106,9	1831,99	4792,28	739,97
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11

Таблиця 20

Середнє значення експресії GUS у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₀

Опис EXP	Опис 3' НТО	Зародок жовтого боба	Сім'ядоля жовтого боба	R3 Незріла насінина	R3 боб	R5 сім'ядоля
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	1582,51	832,99	84,88	1157,18	247,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	961,14	1050,82	456,55	2455,53	861,1
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	126,53	334,27			59,33
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51

[00112] Як представлено в Таблицях 19 і 20, 3' НТО люцерни T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID №: 26) і T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID №: 2) впливають на експресію конститутивного елемента EXP EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID №: 51) інакше, ніж 3' НТО T- Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40) отриманий з *Gossypium barbadense*. У багатьох зразках тканин спостерігалось посилення експресії при використанні 3' НТО люцерни. Що стосується 3' НТО люцерни T-Mt.AC140914v20-1:2:1, посилення спостерігалось в більшості тканин рослин, також містять елемент EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42). Таблиці 21 і 22 демонструють кратність відмінностей в кількісній експресії GUS, по відношенню до експресії, забезпеченої рMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40)), що містить 3' НТО , отриману з *Gossypium barbadense*.

Таблиця 21

Кратність змін експресії у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₁

Опис EXP	Опис 3' НТО	Vn5 Корінь	Vn5 Моло- дий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Чере- шок	R1 Квітка
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	6,13	1,47	2,37	1,14	3,76	2,99
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	4,86	1,05	2,17	5,72	12,62	1,58
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	5,67	2,13	2,46	2,78		0,11
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3,26	4,12	3,61	0,98		0,59

Таблиця 22

Кратність змін експресії у зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₁

Опис EXP	Опис 3' НТО	Зародок жовтого боба	Сім'я- доля жовтого боба	R3 Незріла насінина	R3 боб	R5 сім'я- доля
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	15,13	7,23	0,25	1,35	3,86
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	9,19	9,13	1,34	2,86	13,42
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2,64	6,76			0,59
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88

[00113] Вищезазначені експерименти демонструють, що кожен 3' НТО люцерни має різний ефект на рівень експресії кожного з конститутивних елементів EXP, зв'язаних з рMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40)), що містить 3' НТО, отриману з *Gossypium barbadense*. Наприклад, експресія EXP-DaMV.FLT:1:2 підсилювалася в 1.14-15.13 разів у Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, R1 квітці, в зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 бобі і R5 сім'ядолі, однак зменшувалася в R3 незрілій насініні при використанні T-Mt.Sali3-2-1:2:1. Цей же EXP, при комбінуванні з T-Mt.AC140914v20-1:2:1 приводив до 1.34-13.42-кратного посилення експресії в Vn5 корені, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, R1 квітці, в зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 бобі, R3 незрілому зерні і R5 сім'ядолі, проте зберігав ті ж

значення, що і T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40) в Vn5 молодому листі. Експресія в зародку жовтого боба була близько в 2 рази вища ніж у сім'ядолі жовтого боба при використанні T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (15,13-проти 7,23-кратне посилення), в той час як експресія була практично однаковою в цих двох тканинах при використанні T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (9,19-проти 9,13-кратне посилення). Що стосується елемента EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3, комбінація з T-Mt.AC140914v20-1:2:1 продемонструвала менше посилення експресії в багатьох зразках тканин, у порівнянні з тими самими 3' НТО, комбінованими з EXP-DaMV.FLT:1:2. В R1 квітках спостерігалось зниження експресії щодо T-Gb.E6-3b:1:1, коли EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 комбінувався з T-Mt.AC140914v20-1:2:1. Комбінування EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 з T-Mt.Sali3-2-1:2:1 забезпечувало посилення експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листі, Vn5 зрілому листі, R1 зрілому листі, R1 черешку, в зародку жовтого боба і сім'ядолі жовтого боба, однак знижував експресію в R1 квітці і R5 сім'ядолі по відношенню до T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40).

[00114] Кожна з двох 3' НТО люцерни T-Mt.Sali3-2-1:2:1 і T-Mt.AC140914v20-1:2:1 впливала по-різному на експресію різних конститутивних елементів EXP EXP-DaMV.FLT:1:2 і EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 по-різному. У більшості тканин спостерігалось посилення експресії в порівнянні з T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40), однак в деяких тканинах спостерігалось зниження експресії. Таким чином, при використанні різних 3' НТО люцерни можливо більш точно контролювати експресію в рослині і "тонко налаштовувати" експресію специфічних молекул ДНК, що транскрибуються, щоб забезпечити оптимальну експресію, де потрібно експресія молекул ДНК, що транскрибуються в той же час знижуючи експресії в тканинах, де це може негативно вплинути на рослину.

Приклад 6

3' НТО *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 призводить до посилення транскрипції при комбінуванні з різними EXP в стабільно трансформованих рослинах сої

[00115] Рослини сої були трансформовані за допомогою векторів, зокрема плазмідних конструктів, для встановлення впливу 3' НТО люцерни T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1) на експресію. Зокрема, рослини сої трансформували векторами, які містять кілька різних EXP, з конститутивним профілем експресії, що контролює експресію трансгена β -глюкуронідази (GUS) функціонально зв'язаного з 3' НТО люцерни T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1). Ці рослини сої, трансформовані за допомогою 3' НТО від люцерни порівнювалися з трансформованими рослинами сої, в яких експресія трансгена GUS керувалася конститутивним промотором, і трансген GUS функціонально зв'язаний з 3' НТО отриманої з *Gossypium barbadense*.

[00116] Рослинні вектори, використані в цих експериментах були сконструйовані з використанням способів клонування, відомих у цій галузі техніки. Отримані вектори, містили ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, які виявляють стійкість до антибіотика спектиномицину (що керується промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності 3' НТО T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1), що містить EXP: EXP-Mt.AC145767v28-1:1 (SEQ ID №: 35), EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42), EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 (SEQ ID №: 52), EXP-CERV.FLT:1:2 (SEQ ID №: 53), EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID №: 51), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID №: 54), або EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31) функціонально зв'язану 5'-кінцем з кодуючою послідовністю для GUS, яка містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), яка функціонально зв'язана 5'-кінцем з 3' НТО, що отримана з *Medicago truncatula* або з 3' НТО T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40) або T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID №: 41), що отримана від *Gossypium barbadense*; і праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*. Вектори, які містять T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1): pMON118798, pMON116815, pMON118769, pMON153709, pMON118771, pMON153707 і pMON155502.

Зокрема вектор pMON118798 містить нативний EXP-Mt.AC145767v28-1:1, який складається з промотора, функціонально зв'язаного з лідером, клонованим з того ж локусу гена, що і 3' НТО T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1). Вектори, які містять 3' НТО отриману з *Gossypium barbadense*: pMON102167, pMON113874, pMON121030, pMON121042, pMON140827 і pMON125841.

[00117] В таблиці 23 наводяться плазмідні конструкти, які містять відповідний елемент EXP, 3' НТО і SEQ ID № використані для трансформації рослин сої, представлені в цьому Прикладі.

Таблиця 23

Плазмідні конструкти, використані для трансформації рослин сої і відповідні EXP та 3' НТО

Плазмідний конструкт	Опис EXP	EXP SEQ ID №:	Опис 3' НТО	3' НТО SEQ ID №:
pMON118798	EXP-Mt.AC145767v28:1:1	35	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON116815	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON113874	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118769	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121030	EXP-CERV.FLT:1:2	53	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON153709	EXP-CERV.FLT:1:2	53	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121042	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118771	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON153707	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON125841	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON155502	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1

- [00118] Трансформування рослин сої та аналіз GUS проводився як описано в Прикладі 3. Таблиці 24 і 25 демонструють кількісні середні значення GUS для стабільно трансформованих рослин сої покоління R₀. Клітинки, позначені як "ндр" позначають тканини, які проаналізовані, однак експресія в них була нижче рівня детекції. Таблиці 26 і 27 демонструють кратність змін експресії кожного елемента EXP, функціонально зв'язаної з T-Mt.AC145767v28-1:1:2 у порівнянні з T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40).

Таблиця 24

Середнє значення експресії GUS у Vn5 корені, Vn5 молодому листку, Vn5 зрілому листку, R1 зрілому листку, R1 черешку, і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₀

Опис EXP	Опис 3' НТО	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий листок	Vn5 Зрілий листок	R1 Зрілий листок	R1 Черешок	R1 Квітка	Vn5 Корінь
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	59,00	71,00	32,00	34,00	33,00	23,00	ндр
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	618,03	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	3817,28		1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	111,12		19,96	19,46	17,47	88,14	64,38
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	6514,58	1081,72	477,98	419,52	227,72	1380,90	581,97
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	378,02		344,15	480,25	177,64	285,15	130,87
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	6711,26		1618,72	3262,73	2995,09	5071,90	3608,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	780,79		688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	9322,50	3655,79	5870,15	3923,47	2313,08	3610,84	2131,16
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	189,24	153,52	59,60	37,44	103,01	130,60	130,38

Продовження таблиці 24

EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	2300,06		160,99	216,21	744,44	1628,65	405,97
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93		202,73	275,48	143,60	1195,97	482,13
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	855,00		293,68	1118,76	254,25	875,67	398,10

Таблиця 25

Середнє значення експресії GUS в зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 незрілому насінні, R3 бобі і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R₀

Опис EXP	Опис 3' НТО	Зародок жовтого боба	Сім'я-доля жовтого боба	R3 Незріле насіння	R3 боб	R5 Сім'я-доля
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	31,00	27,00	ндр	ндр	26,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	28,31	62,63	24,08	115,00	11,35
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	547,47	207,69	128,15	927,48	65,67
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	68,57	70,12	64,42	264,62	34,43
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1474,35	4242,09	2441,01	7209,69	900,82
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	2806,65	1814,87	518,90	3720,59	401,66
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	200,28	291,26	58,21	131,17	114,29
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1029,69	1883,48	209,77	1122,51	521,64
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	129,84	83,45	400,15	875,75	72,66
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			247,18	1324,98	352,81

Таблиця 26

Кратність змін експресії в Vn5 корені, Vn5 молодому листку, Vn5 зрілому листку, R1 зрілому листку, R1 черешку, і R1 квітці трансформованих рослин сої покоління R₁

Опис EXP	Опис 3' НТО	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий лист	Vn5 Зрілий лист	R1 Зрілий лист	R1 Черешок	R1 Квітка
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	9,52	3,52	5,37	3,97		2,12
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	58,63	23,94	21,56	13,03	15,67	9,04
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	17,75	4,70	6,79	16,86	17,79	27,57

Продовження таблиці 26

EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	11,94	8,52	7,70	7,23	9,51	4,55
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	12,15	2,70	5,77	7,23	12,47	3,11
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28- 1:1:2	1,07	1,45	4,06	1,77	0,73	0,83

Таблиця 27

Кратність змін експресії в зародку жовтого боба, сім'ядолі жовтого боба, R3 незрілому насінні, R3 бобі, і R5 сім'ядолі трансформованих рослин сої покоління R1

Опис EXP	Опис 3' НТО	Зародок жовтого боба	Сім'я-доля жовтого боба	R3 незріле насіння	R3 боб	R5 сім'я-доля
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	19,34	3,32	5,32	8,07	5,78
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	21,50	60,50	37,89	27,25	26,16
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	26,84	15,76	1,53	4,33	6,26
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	5,14	6,47	3,60	8,56	4,56
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1			1,00	1,00	1,00
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			0,62	1,51	4,86

[00119] Як представлено в таблицях 24 і 25, 3' НТО люцерни T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1) підвищувало експресію шести конститутивних елементів EXP, у порівнянні з T-Gb.E6-3b:1:1(SEQ ID №: 40), але в різних випадках залежно від конкретного елемента EXP і тканини. Елемент EXP EXP-Mt.AC145767v28:1:1, коли використовувався для контролю GUS, функціонально зв'язаний з його нативною НТО T-Mt.AC145767v28-1:1:2 експресувався дуже слабо у всіх проаналізованих тканинах і був не виявлений в R3 незрілому насінні, R3 бобі і R1 квітці. Деякі тканини рослин, які містять елемент EXP EXP-Mt.Ubq2:1:2 і 3' НТО T-Mt.AC145767v28-1:1:2 демонстрували зниження експресії, порівняно з комбінацією EXP-Mt.Ubq2:1:2 і T-Gb.FbL2-1:1:1. Це зниження експресії спостерігалось в R3 незрілому насінні, R1 квітці і R1 черешку, на відміну від Vn5 молодого листка і R5 сім'ядолі, де експресія зростала більше ніж у чотири рази. У Vn5 корені не спостерігалися зміни експресії з EXP-Mt.Ubq2:1:2 і будь-3' НТО.

[00120] Групи регуляторних елементів експресії EXP-CERV.FLT:1:2 і EXP-DaMV.FLT:1:2 забезпечували найвищий рівень експресії. Як продемонстровано у таблиці 26 і 27 ці два EXP підвищувалися у всіх тканинах з T-Mt.AC145767v28-1:1:2 у порівнянні з тими ж EXP, комбінованими з T-Gb.E6-3b:1:1(SEQ ID №: 40). Група регуляторних елементів експресії EXP-CERV.FLT:1:2 посилювалася в 60,50 раз в сім'ядолі жовтого боба і менше в зародках жовтого боба (21,50 рази), в той час як група регуляторних елементів експресії EXP-DaMV.FLT:1:2

найбільш посилювалася в зародку жовтого боба, на відміну від сім'ядолі жовтого боба (26,80 раз проти 15,76 разів відповідно). Ці відмінності в експресії і стимуляції дають можливість забезпечити спеціалізовану експресію трансгена на пізній стадії розвитку насінини. Група регуляторних елементів експресії EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 експресується найбільшою мірою в R3 бобі і Vn5 корені при комбінуванні з T-Gb.E6-3b:1:1 (див. Таблиці 25 і 26). Експресія EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 в цих двох тканинах помітно зростала при комбінуванні з T-Mt.AC145767v28-1:1:2, особливо в Vn5 корені. Крім того експресія EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 зростала до 58,63 раз при комбінуванні з T-Mt.AC145767v28-1:1:2 у порівнянні з тією ж EXP, комбінованою з T-Gb.E6-3b:1:19 (SEQ ID №: 40).

[00121] Загалом, 3' НТО *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1) посилювала експресію шести різних конститутивних EXP, які були отримані з ДНК геному рослини і генома вірусів рослин. Крім того, ця 3' НТО посилювала експресію EXP EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID №: 54) у насінні, порівняно з більшістю інших 3' НТО, отриманих з люцерни. Відповідно, ця 3' НТО підходить для забезпечення підвищеної експресії промотору або комбінації функціонально зв'язаних елементів експресії в конструкті.

Приклад 7

Аналіз EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31) у стабільно трансформованих рослинах сої

[00122] Рослини сої були трансформовані за допомогою векторів, зокрема плазмідних конструктів, які містять конститутивну групу регуляторних елементів експресії EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31), функціонально зв'язану з кодуючою GUS послідовністю. Ці трансформовані рослини потім аналізували на експресію GUS у стабільно трансформованих рослинах.

[00123] Рослинні вектори, використані в цих експериментах були сконструйовані з використанням способів клонування, відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори, містили ліву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну експресійну касету для відбору трансформованих рослинних клітин, які виявляють стійкість до антибіотика спектиноміцину (що керується промотором Actin 7 арабідопсису); другу трансгенну експресійну касету для аналізу активності EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31), яка містить EXP-Mt.Ubq2:1:2 функціонально зв'язану з 5'-кінцем кодуючої послідовності для β -глюкуронідази (GUS), яка містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), яка зв'язана 5'-кінцем з 3' НТО T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID №: 1), отриманої з *Medicago truncatula* або з 3' НТО T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID №: 40) або T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID №: 41), отриманої від *Gossypium barbadense*; і праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*.

[00124] Отримані вектори використовували для трансформації рослин сої як описано в Прикладі 3. Таблиці 28 і 29 демонструють кількісні середні значення експресії GUS в різних тканинах та на різних етапах розвитку для стабільно трансформованих рослин сої.

Таблиця 28

Середнє значення рівня експресії GUS в листку, корені і квітці стабільно трансформованої рослини сої, що містить EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31)

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	Vn5 Корінь	Vn5 Молодий листок	Vn5 Зрілий листок	R1 Зрілий листок	R1 Черешок	R1 Квітка
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	252,58	126,69	86,01	49,05	108,41	83,23
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93	202,73	275,48	143,6	1195,97	482,13
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	855	293,68	1118,76	254,25	875,67	398,1

Таблиця 29

Середнє значення рівня експресії GUS у бобі, тканинах насінини стабільно трансформованої рослини сої, що містить EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31)

Плазмідний конструкт	Опис 3' НТО	Зародок жовтого боба	Сім'ядоля жовтого боба	R3 Незріла насінина	R3 боб	R5 сім'ядоля
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	2,22	111,19	3,21	24,31	50,98
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	400,15	875,75	72,66	129,84	83,45
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	247,18	1324,98	352,81		

[00125] Як було продемонстровано в таблиці 28 і 29 EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID №: 31) здатний контролювати конститутивну експресію молекули ДНК, що транскрибується у стабільно трансформованих рослинах сої. Також різні 3' НТО проявляли різну ступінь експресії в кожній тканині. Наприклад, комбінування EXP-Mt.Ubq2:1:2 з T-Gb.E6-3b:1:1 призводило до низької експресії у всіх проаналізованих тканинах, порівняно з іншими двома 3' НТО T-Gb.FbL2-1:1:1 і T-Mt.AC145767v28-1:1:2. Однак, незалежно від того, яка 3' НТО використовувалася, EXP-Mt.Ubq2:1:2 виявляла конститутивну експресію в діапазоні від середньої до високої, ступінь якої може бути змінена шляхом вибору 3' НТО, яка буде функціонально поєднана з EXP.

Приклад 8

Енхансери, отримані від регуляторних елементів

[00126] Енхансери можуть бути похідними промоторних елементів, запропонованих в цьому документі, таких, які представлені в SEQ ID №: 32 і 36. Енхансерний елемент може мати один або більше цис-регуляторних елементів, які, у разі, коли вони функціонально зв'язані через 5' чи 3' кінець з промотором, або через 5' чи 3' з додатковим енхансерним елементом, який функціонально зв'язаний з промотором, можуть підвищувати або модулювати експресію ДНК, яка транскрибується або забезпечити експресію ДНК, яка транскрибується в конкретному типі клітин або органі рослини, або на конкретній тимчасовій точці в розвитку чи циркадному ритмі. Енхансери створюють шляхом видалення ТАТА-боксу або функціонально подібних елементів і нижчезазначених послідовностей, що дозволяє ініціювати транскрипцію з промоторів, у тому числі їхніх фрагментів.

[00127] Енхансерні елементи можуть бути отримані з промоторних елементів, описаних у цьому документі, та клоновані з використанням способів, відомих в цій області техніки, таким чином, щоб вони були функціонально зв'язані через 5' - 3' кінець з промоторним елементом або функціонально зв'язані через 5' - 3' кінець з додатковими енхансерними елементами, які функціонально зв'язані з промотором. В альтернативному варіанті енхансерні елементи клонують, використовуючи способи, відомі в цій області техніки, таким чином, щоб вони були функціонально зв'язані з однією або більше копій енхансерного елемента, який функціонально зв'язаний через 5' - 3' кінець з промоторним елементом або функціонально зв'язаний через 5' - 3' кінець з додатковими енхансерними елементами, які функціонально зв'язані з промотором. Надалі, енхансерні елементи також можуть бути клоновані таким чином, щоб вони були функціонально зв'язані через 5' - 3' кінець з промоторним елементом, отриманим з організму іншого роду, або функціонально зв'язані через 5' - 3' кінець з додатковими енхансерними елементами, отриманими з організмів іншого роду або організму того ж роду, які функціонально зв'язані з промотором, отриманим з організму того або іншого роду, в результаті чого утворюється химерний регуляторний елемент. Експресійний вектор з геном GUS для трансформації рослин, створений з використанням способів, відомих в цій області техніки, подібно до генетичних конструкцій, описаних у попередніх прикладах, в яких підсумкові рослинні експресійні вектори містять праву граничну область *A. tumefaciens*, першу трансгенну селекційну касету, яка надає стійкість до антибіотика або гербіциду, і використовується для вибору трансформованих рослинних клітин; і другу касету трансгена, в якому енхансерний елемент, функціонально зв'язаний з промотором, створюючи химерний промоторний елемент, який функціонально зв'язаний з 5' лідером, який функціонально зв'язаний 5' кодуючою послідовністю GUS, яка містить інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), функціонально зв'язаний з 3' НТО, такий як T-Gb.E6-3b: 1: 1 або будь-який з описаних вище з *Medicago truncatula*; і правою граничною ділянкою з *A. tumefaciens*.

[00128] Експресія гена GUS під контролем регуляторного елемента, який містить один або більше енансерів, оцінюється при випробуваннях рослин зі стабільною трансформацією або з транзиторною експресією для визначення впливу енансерного елемента на експресію молекули ДНК, яка транскрибується. Модифікації одного або більше енансерних елементів або дуплікація одного або більше енансерних елементів здійснюється на основі емпіричних досліджень та підсумкової регуляції експресії генів, що спостерігається при використанні композиції кожного регуляторного елемента. Зміна відносних позицій одного або більше енансерів в підсумковому регуляторному або химерному регуляторному елементі може впливати на транскрипційну активність або специфічність регуляторного або химерного регуляторного елемента і визначається емпірично для визначення найкращих енансерів для бажаного профілю експресії трансгена у межах рослини кукурудзи або рослини іншого роду.

Приклад 9

Аналіз впливу 3'НТО на експресію конститутивної GUS у стабільно трансформованих рослинах кукурудзи

[00129] Рослини кукурудзи були трансформовані бінарними плазмідними конструктами для оцінки впливу 3' НТО T-Mt.Oxr-1: 2:1 люцерни (SEQ ID №: 17) на експресію по відношенню до двох 3' НТО часто використовуються в рослинах кукурудзи. Зокрема, рослини кукурудзи, були трансформовані векторами, які містять EXP, що вставлені в конститутивний профіль експресії контролю експресії трансгена β -глюкуронідази (GUS), який функціонально зв'язаний з 3' НТО T-Mt.Oxr-1: 2: 1 люцерни (SEQ ID №: 17). У таких трансформованих рослинах кукурудзи, порівняно з трансформованими рослинами кукурудзи, були GUS функціонально зв'язані або з 3' НТО T-AGRtu.nos-1: 1: 13 (SEQ ID №: 49) або з 3' НТО T-Os.LTP : 1 (SEQ ID №: 56).

[00130] Бінарні плазмідні конструкції, які використовуються в цих експериментах, були побудовані з використанням способів клонування, відомих в цій галузі техніки. Отримані вектори містять праву граничну область A. tumefaciens; перша експресійна касета для аналізу 3' НТО послідовності, що включає конститутивну групу регуляторних елементів експресії EXP-FMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID №: 56), функціонально зв'язану з 5' кодуючою GUS послідовністю, що містить інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний з 5' однієї з трьох наступних 3' НТО: T- Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID №: 17), T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID №: 49) або T-Os.LTP:1 (SEQ ID №: 56); друга експресійна касета трансгена, використовувана для відбору трансформованих рослинних клітин, що надає стійкість до гліфосату (контроль промотору актину 1 рису); і ліва гранична область A. tumefaciens. Отримані плазміди були використані для трансформації рослин кукурудзи.

[00131] Гістохімічний аналіз GUS був використаний для якісного аналізу експресії трансформованих рослин. Ділянки цілої тканини інкубували з GUS забарвлюючим розчином X- Gluc (5-бром-4-хлор-3-індол-бета-глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали і перевіряли візуально по синьому забарвленню. GUS активність якісно визначалася шляхом прямої візуальної перевірки або перевірки під мікроскопом, використовуючи вибрані органи і тканини рослини. R0 рослини були перевірені на експресію в коренях і листках, а також у пиляку, стовпчиках маточки, насінні і зародках, що розвиваються, через 21 день після запилення (21 ДПЗ).

[00132] Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний з флюорогенним субстратом 4-метилумбеллиферил- β -D-глюкуронідом (MUG) у загальному обсязі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеллиферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях рН, де гидроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить рН, для кількісного виміру флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 365 нм, випромінювання - 445 нм з використанням Fluoromax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Micromax Reader, з встановленою шириною щілини: 2 нм - на збудження і 3 нм - на випромінювання.

[00133] В таблиці 30 представлена виміряна середня кількісна експресія GUS, яка демонструє різний вплив кожного 3' НТО на конститутивну експресію EXP.

Середня експресія GUS у трансформованих рослинах
кукурудзи, трансформованих різними 3' НТО

Плазмідний конструкт				
Стадія розвитку	Тканина	pMON128881 T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID №: 17)	pMON119693 T-Os.LTP:1 (SEQ ID №: 56)	pMON132035 T-AGRtu.№:13 (SEQ ID №: 49)
V4	Листок	205	232	222
	Корінь	126	134	44
V7	Листок	277	534	293
	Корінь	110	135	110
VT	Листок	314	429	194
	Корінь	198	1043	291
	Квітка /Пиляк	527	486	308
R1	Початок/ Стовпчик маточки	169	1258	319
R3	Зародок 21ДПЗ	179	72	101
	Ендосперм 21ДПЗ	516	207	243

[00134] Як видно в таблиці 30, кожен 3' НТО мав різний вплив на конститутивну експресію, контрольовану EXP-FMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID №: 56). Наприклад, 3' НТО T-Os.LTP: 1 (SEQ ID №: 56) виявилось підсилює експресію в VT кореня і R1 початку/стовпчиках маточки відносно двох інших 3'НТО. 3' НТО T-Mt.Oxr- 1:2:1 (SEQ ID №: 17) виявилось підсилює експресію в насінні R3, як в 21ДПЗ ендосперму, так і 21ДПЗ зародків по відношенню до T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID №: 49) і T-Os.LTP: 1 (SEQ ID №: 56). Експресія в квітці/пиляку також вище при використанні T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID №: 17) порівняно з двома іншими 3' НТО. Відмінності в експресії, що спостерігаються для кожного з 3' НТО демонструють корисність кожного 3' НТО в модуляції експресії. Таким чином, ці експерименти показують, що вибір 3' НТО можна використовувати в трансгенних касетах для тонкої настройки експресії певної молекули ДНК, яка транскрибується. Цей експеримент демонструє здатність 3' НТО, отриманих з дводольних, такий як тре-Mt.Oxr-1:2:1, впливати на транскрипцію однодольних видів, таких як кукурудза.

Приклад 10

Аналіз інтронного посилення GUS активності з використанням протопластів рослинного походження

[00135] Загалом, інтрон, обраний на підставі експериментування і порівняння з експресією контрольованого безінтронного вектора для емпіричного вибору інтрона і конфігурації в межах розташування елементів перенесення ДНК (Т-ДНК) вектора для оптимальної експресії трансгена. Наприклад, при експресії гена стійкості до гербіциду, такого як CP4 (патент США № 39247), який надає толерантність до гліфосату, бажано отримувати експресію трансгена у репродуктивних тканинах, а також у вегетативних тканинах, для запобігання втрати врожаю після застосування гербіциду. Інтрон, функціонально зв'язаний з конститутивним промотором, в даному випадку буде обрано за його здатністю посилювати експресію стійкості до гербіциду, що надається трансгеном, зокрема, в репродуктивних клітинах і тканинах трансгенної рослини і, таким чином, забезпечувати як вегетативну, так і репродуктивну толерантність трансгенної рослини при обприскуванні гербіцидом. У більшості генів убіквітину 5' НТО складається з лідера, який має послідовність інтрона, вбудовану в нього. Тому, регуляторні елементи, отримані з таких генів, аналізували з використанням усієї 5' НТО, що містить промотор, лідер і інтрон. Для досягнення різних профілей експресії або модулювання рівня експресії трансгена, інтрон з такого регуляторного елемента може бути видалений або заміщений гетерологічним інтроном.

[00136] Інтрони, представлені в цьому документі SEQ ID №: 34, ідентифікували з використанням геномних ДНК контигів порівняно з експресованими кластерами тегових послідовностей або кДНК контигів, для ідентифікації послідовностей екзонів і інтронів в межах геномної ДНК. На додаток, 5' НТО або лідерні послідовності також використовуються для визначення інтрон/екзон сплайсингових зчленувань одного або більше інтронів в умовах, коли послідовність гена кодує лідерну послідовність, яка переривається одним або більше

інтроном. Інтрони клонували з використанням способів, відомих в цій області техніки, у вектор для трансформації рослин так, щоб були функціонально зв'язаними з 3'-регуляторним елементом і фрагментом лідера і функціонально пов'язаними з 5'- або другого фрагмента лідера, або кодуючими послідовностями, наприклад, як показано в експресійних касетах, представлених на фіг. 1.

[00137] Так, наприклад, перша можлива експресійна касета (конфігурація експресійної касети 1 на фіг. 1) складається з промотора або химерного промоторного елемента [A], функціонально зв'язаного з 5' лідером [B], функціонально зв'язаного з 5'-тестованим інтронним елементом [C], функціонально зв'язаного з кодуючою ділянкою [D], яка функціонально зв'язана з 3' НТО елементом [E]. В альтернативному варіанті, друга можлива експресійна касета (конфігурація експресійної касети 2 на фіг. 1) складається з промотора або химерного промоторного елемента [F], функціонально зв'язаного з 5'- першим лідерним елементом або фрагментом першого лідерного елемента [G], функціонально зв'язаного з 5'- тестованим інтронним елементом [H], функціонально зв'язаного з 5'- другим лідерним елементом або другим фрагментом першого лідерного елемента [I], функціонально зв'язаного з кодуючою ділянкою [J], яка функціонально зв'язана з 3' НТО елементом [K]. Додатково, третя можлива експресійна касета (конфігурація експресійної касети 3 на фіг. 1) складається з промотора або химерного промоторного елемента [L], функціонально зв'язаного з 5'- лідерним елементом [M], функціонально зв'язаного з 5'- першим фрагментом елемента кодуючої послідовності [N], функціонально зв'язаного з 5'-інтронним елементом [O], функціонально зв'язаного з 5'- другим фрагментом елемента кодуючої послідовності [P], яка функціонально зв'язана з 3' НТО елементом [Q]. Особливо, конфігурація експресійної касети 3 розроблена для забезпечення сплайсингу інтрона таким способом, щоб отримати повну відкриту рамку зчитування без зсуву рамки між першим і другим фрагментом кодуючої послідовності.

[00138] Як обговорювалося раніше, може бути кращим уникнення використання нуклеотидної послідовності АТ або нуклеотиду А безпосередньо перед 5'-кінцем сайту сплайсингу (GT) і нуклеотиду G або нуклеотидної послідовності TG, відповідно, безпосередньо після 3'-кінця сайту сплайсингу (AG), для усунення потенційних небажаних стартових кодонів, що формуються під час процесингу інформаційної РНК в кінцевий транскрипт. Послідовність ДНК поблизу 5'- і 3'-кінцевих сайтів сплайсингових зчленувань інтрона, таким чином, може бути модифікована.

[00139] Інтрони тестували на ефект посилення через можливість посилювати експресію при аналізі транзиторної експресії або стабільної експресії в рослині. Для аналізу інтронного посилення транзиторної експресії, сконструювали базовий рослинний вектор з використанням способів, відомих в цій галузі техніки. Інтрон клонували в базовий рослинний вектор, який містить експресійну касету, яка складається з конститутивного EXP, що включає промотор і лідер такі як EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42), функціонально зв'язаним з 5'- тестованим інтронним елементом (наприклад один SEQ ID №: 34), функціонально зв'язаним з кодуючою послідовністю GUS, яка або містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), який функціонально зв'язаний з 3' НТО з (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID №: 40). Клітини протопластів, отримані з тканини рослини сої або іншого роду, трансформували базовим рослинним вектором і контрольними векторами з геном люциферази, як описано раніше вище в прикладі 2, і аналізували в них активність. Для порівняння відносної здатності інтрона посилювати експресію, значення GUS виражали як відношення активності GUS до активності люциферази і порівнювали їх з рівнями тих, що отримували за допомогою генетичної конструкції, що містить конститутивний промотор, функціонально зв'язаний з відомим стандартом інтрона, таким як фактор елонгації 4A10 гена I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID №: 57) *Nicotiana tabacum*, а також генетичної конструкції, що містить конститутивний промотор, але без інтрона, функціонально зв'язаного з промотором.

[00140] Для аналізу в стабільно трансформованих рослинах інтронів, представлених у SEQ ID №: 34, розроблено експресійний вектор з геном GUS для трансформації рослин аналогічних генетичних конструкцій, описаних у попередніх прикладах, в яких підсумкові рослинні експресійні вектори містять праву граничну ділянку *A. tumefaciens*, першу експресійну касету для тестування інтрона, що складається з конститутивного EXP такого як промотор і лідер EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID №: 42), функціонально зв'язаним з 5'-тестованим інтронним елементом (SEQ ID №: 34), функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю GUS, яка або містить інтрон, що вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 44), функціонально зв'язаний з 3' НТО *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID №: 40). Клітини протопластів, отримані з тканини рослини сої або іншого роду, трансформували базовим рослинним вектором і контрольними векторами з геном люциферази, як описано

раніше в прикладі 2 вище, і аналізували в них активність. Для порівняння відносної здатності інтрона посилювати експресію, значення GUS виражали як відношення активності GUS до активності люциферази і порівнювали їх з рівнями тих, що отримували за допомогою генетичної конструкції, що містить конститутивний промотор, функціонально зв'язаний з відомим стандартом інтрона, таким як фактор елонгації 4A10 гена I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID №: 57) *Nicotiana tabacum*, а також генетичної конструкції, що містить конститутивний промотор, але без інтрона, функціонально зв'язаного з промотором.

[00141] Слід зазначити, що інтрон, представлений як SEQ ID №: 34, може бути модифікований різними способами, такими як видалення фрагментів у межах послідовності інтрона, яке може зменшувати експресію, або дуплікація фрагментів з інтроном, яка може посилювати експресію. На додаток, послідовності ДНК в межах інтрона, які можуть впливати на специфічність експресії або в конкретних типах клітин, або в тканинах і органах, можуть бути дупліковані або змінені або видалені, з метою вплинути на експресію і характер експресії трансгена. На додаток, інтрони, запропоновані в цьому документі, можуть стати причиною непередбачених транскриптів, експресованих з неправильно сплайсованих інтронів, як ті, що відрізняються, подовжені або укорочені білки. Після того, як інтрон був емпірично перевірений або змінений на підставі проведеного дослідження, інтрон використовується для посилення експресії трансгена у стабільно трансформованих рослинах, які можуть представляти собою однодольні або дводольні рослини будь-якого роду, за умов, що інтрон забезпечує посилення трансгена. Інтрон також може бути використаний для посилення експресії в інших організмах, таких як водорості, гриби або клітини тварин, за умов, що інтрон забезпечує посилення або послаблення, або специфічність експресії трансгена, з яким функціонально зв'язаний.

[00142] З ілюстрацій і опису принципів винаходу фахівцям цієї області техніки буде очевидно, що форма і деталі цього винаходу можуть бути модифіковані без відступу від цих принципів. Ми заявляємо всі модифікації, які знаходяться в межах суті та обсягу формули винаходу. Всі публікації та опубліковані патентні документи, цитовані в цьому документі, включені через посилання в тому ступені, якби кожна окрема публікація або заявка на патент конкретно і індивідуально вказувалися як включені через посилання.

<110> Monsanto Technology LLC

<120> РЕГУЛЯТОРНІ ЕЛЕМЕНТИ РОСЛИН ТА ЇХНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> MONS:332WO

<150> 61/785268

<151> 2014-03-14

<160> 57

<210> 1

<211> 500

<212> ДНК

<213> Medicago truncatula

<400> 1

```
ttaatcatct gaaactgttc accatgcatg caatcttgtg aaatatatgg ttttaattag 60
acttcaatct tatgttggct attgtactaa taaaagcatg tcatgttatt ttcatttgat 120
tttatctgta ctttggtttg ttgagaat aaagatgagc ttgctatgca tgcattgcatg 180
ccatcgatta tcagggtttc cttttttctt ttctggcttc ccatcaattt ggtgtgaatt 240
agtgtgtgtg atatattata ttatgctatt tatgaaataa attgttgggt atatttgatc 300
tacaatctac atacatgtga tttttatcaa caaaatatct cgggaaacaa tacctttttg 360
gtagcaaaat tcaaataata ctattttaaa taaatcaaag ttaaccaata ccttattcaa 420
gttgaggggg tctcaaacaa gcaaaagaat tcaagttgtt aatgaacttc ggttaatgat 480
aaaagaattc gcatttaaaa 500
```

<210> 2

<211> 500

<212> ДНК

<213> Medicago truncatula

<400> 2

```
aagggtcttc tgtcatgatt tcatactttc attattgagc tctgtaatta caattatgac 60
catgagaaca tctottattg tgtggccttt taattgctga tgttagtaact gaaccaaagc 120
ttatcgtgat gatgtaaaag caataagtac ttgtttgtag cttctttgtg tctccctttg 180
ggcttaatac atctgttttag tgttgtggct ttggcataga cttctcttgg taataatgcc 240
ttgcaatgca aaatttcaat tatcaaattc tattatgttc tcacctatg gtaacagctt 300
accctgtgga agatgagatt cttgagttga gtcattgcc aatttttgga ttagcttttg 360
aattagtga ttttgacaaa aattaccgtg aactgattt tgttgaagct ctttaagtga 420
gtttttacaa aatttcagtg gctcgttgtg attatgtcaa actcacggcg aatgtagtgc 480
ttacagaatt tcagtggctc 500
```

<210> 3
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 3
 gcatgaataa tcaagctcat aaatttcacg gctttgaatt tgtactatct tggttactag 60
 aaagtgtatt tgtgtgttta tgcagtaata aatctctaag agatataatg ttgttatctt 120
 ttataattat ccaaaaaatc gttaatgttg aaaattgatt caaaattgat attgaagtgc 180
 tgaaaaaatc gtggcgtgat taaaaatcca aactttttta taaaataata ttgtgtctat 240
 atcttttata aatgacgata aatgggataa agtaaatgaa acaaaaccgt taatgcaatg 300
 ttcactctga caatatatat aattaaaaaa cattataaaa ccttgcttct tcaactcattt 360
 acaatcttga aatttttagtc ttaccattt gaaagtacaa tcttttcacg aaagtttata 420
 gtacaaatca agagtttgga taagctgctc tgctttttat aatcactggg aaatgattta 480
 tgacttgga aaacaacttg 500
 <210> 4
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 4
 aaaattgttg ttgaattcca aaagggtcct gtagtagaaa tttacgtaca agcaaaatcg 60
 atttcttgat atacaagtta aagggtatat gagaaaatac atacatgtaa atgagtaccg 120
 agttttctat agtttgagca tttgtgtcaa ataagcaagt gattgtgatg attccaagct 180
 tttaaattga aaaaagatta gcaaccaaga atcaaacatc cacacaccat atacatgctc 240
 taggcttcaa ataccattga gcaacattat actctatat gtttgatttc aaccaattcc 300
 aagagcttga taattcgcat gagaattata ttatatcaaa aacttttagtg aaagatgctc 360
 caataatttc taaacttggtg atcatttttt ggcattagga ataaggcaaa aatctgcaaa 420
 atgcaataag aaaaaactag ctcatgaata caaagaaaat gttactacaa ctgacatttt 480
 caaaattcaa caataatctt 500
 <210> 5
 <211> 465
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 5

ggagcagtgt gtggtgtttg agaggaatgg tgcattctac ataaatttca cagacattgc 60
tcttattttg aatgcggggt catcgacatt gggtagtttt tggatgtatt ttgctagaca 120
cgatgaacgt ggagtttgat tgttttctct attgttgatc ctctgttaaa taacattgtt 180
aagtgataat tcccagctat ttccggtttta ttattcccca atgttgctct tccgcatgtc 240
ccaaagtagt ctttgaggtt ctcgtctgog ttttaattgta ttggaagtaa attaacagca 300
tcacgactct ttcgtaatta gttactttca aagaattttt ttggcactaa aactaccct 360
gatggagtgt tcaattttta acatgagaac ttataaaaga tttttaaaca tgagaactta 420
tcaaaaatat tatgaatgtt cgctcgatat gaagtaggca aggtt 465

<210> 6
<211> 472
<212> ДНК
<213> *Medicago truncatula*

<400> 6
tctaaccacca tggttacttc ataagttgtt cctttttaat agtttggtat cttgtccgtg 60
tcttagtttt ttgttattcc agttttattt ttccagtttt agaaacttac agaactgggt 120
tcttgatcgg cgatggtacc gtttttggtt ttaattgtta agagtcttga gaacttgaat 180
ttcaaagggc agcttaaagg ttgacatct taattttgct gctgaggaat gttgtaattg 240
cattttattt acaagacagt ttgtttatgt caaatcttat atttatcttt atggttatgt 300
ttttgaattt ttgttcgtaa tttttgtcct tgattgtgtg tttgtgggtc cgtgcttgca 360
attttacttg gaaagattgg ctttctgcag gttgggttta gcctgtttta gctgtcatga 420
catgtttgat tagtgaattc cagagaacat gctaattca tgtgcagcag ca 472

<210> 7
<211> 500
<212> ДНК
<213> *Medicago truncatula*

<400> 7
aaataaaatt acttatagat agatttggaa ctagatgact agtgttttat tgtttctggt 60
ttgtgtaatt ctataaatta atgttatctc tatgtccaag aatgttatct ctagtgctct 120
ttgttgtaact tggactgaaa ttatggggat tggatttatg tgcttttcat gactcgtaa 180
taaatgaata aataaaatgt gacttttctc ctttacttgt tgtgtttggc ttctgatgta 240
ataagaaatc caatgaatct gctaatttc ttgtgagagt tttagtata taataataat 300
cctaccgctt caaacatagt ttttgttttt aaaaaaaaaa aaaaaaaca gggaaagtat 360
attaacaatc tcttagattt atcccagaat aattgaattt ttcactat atgcttagta 420

ctattaagta aagctagtga gaggggcatt ttatggctca tcaactagagc atgtacaaaa 480
gaaattgttc togtgaattt 500

<210> 8
<211> 452
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 8
tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatttt 60
gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattgggtg gagttttatc tttttgtttt 120
ctttttgttc ttttgataat ttcagggttca gtgtacttgg tccaaccgga gcaaaagggt 180
tattataaaa cactatttctg aagtgaagtt cttttttcaa ttgaaatta tgtgggttca 240
tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatgttggtt taactaatgt 300
cttgaaaatt gagagtattt tctocagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt gg 452

<210> 9
<211> 500
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 9
tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatttt 60
gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattgggtg gagttttatc tttttgtttt 120
ctttttgttc ttttgataat ttcagggttca gtgtacttgg tccaaccgga gcaaaagggt 180
tattataaaa cactatttctg aagtgaagtt cttttttcaa ttgaaatta tgtgggttca 240
tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatgttggtt taactaatgt 300
cttgaaaatt gagagtattt tctocagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt ggcgagagatt ttgctgtata taggggttaa 480
ttcttggttg gaggagattt 500

<210> 10
<211> 500
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 10
gctgtttcat tactgtgga gtgctataaa ttggcctact ttttgtttct tacagtctat 60
tagcctagca gccgttaggc ctctttttta aatgtaataa gttgaattcc tgaactcgtg 120
aagcttgccc cttattgaac cgtagtgttt ttggttgctt aataccatta agcaatgagt 180
tgttttggat ttatatgcat ttaccgaatt ttatttggat gatagtaago gttttttcca 240
tgttcacaaa tatgccatga aaaaagcagt aaaatttcaa taaaccaaca tcatgataaa 300
acaaaagtat gcacgtatg aaaaaagtg ggtgatgaaa tgataagtct aattttggtc 360
gaatttggtc gttgttattt ttgcatgaac atctottttg tacaacctaa caacttattt 420
gctattttta atatttttgt actgcttttg atttgcttgc tottcacaat attatagtgt 480
tgcattagtt gttcaatttt 500

<210> 11
<211> 500
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 11
tatctcaata totcaacttc aattcatttg ttgcagtgct ttgcattggt gtattatcag 60
tgaacatatt tatttatata acatgttcgt tattgttgat gcgggttgat tatgctagag 120
ctgaaaotcg agcttggtact tatatatagt taccatatag ttacctatgt tgtatttgag 180
tgttgtttag agattgcaag ttttgttga tcttgtgttc totgcaaag aagagtaata 240
ttttatgtag aataggtttg tgtgaattaa ttttttagaa tctggattta aactactgcg 300
atcaattgat ttaagccctt ggatagagat cagttgactc acatcgtgac ctcgacaaat 360
tgagtgtttt tttcttctt tttcgatag aaaaatgtaa gttttgggaa gcagattttc 420
tgctgtaaca gcagggtgct gtaaagcatc cgagctgtcc ggtcagaatt gtacggccat 480
gatccgggtc tgctcaccaa 500

<210> 12
<211> 500
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 12
acacatattc aagctctatt actctgtttt taggttgaga atattgtgaa gtgtgttgtg 60
tgtgcgttct gttttatgta aaagtaaatt ctgtgaatta tttttgtaa ggaataaatt 120
atgtaagaat ggtttaatta tctattgtct cacatcgttt tttatgtcta ttttaagtat 180
tggatttgta ttctatttat acacaagagt taataatagc ataacataaa ttccacaagg 240

atcaagtaaa ataatatcca catgaaacat ctaagaaagg aaaacaatat ggctcaattt 300
 cctatctttc tttatttatg ttttagtcat ctttctttcc ctatttcttg ttgaaagcta 360
 ataggagtat ggtactttct acgccatttt tttttaagta ctctctttta cacaatatatt 420
 tatcaaattg tagtgacatt ttattttacg atgcagttaa tgttcgttgt gttactgtca 480
 atgattgtcc aaaggtgaaa 500

<210> 13
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 13

gaacgccaaag acatggcggc ctcttgagct gaatcttctg cttttatttg catttctgtt 60
 gtattttaact cctattttca ccaatgtaac tacacaagca gaagaacctg tatgtggctg 120
 attatatgtt agaaatatgg atccaagaa atgtcaactc ttgtgcatga gttcagaata 180
 tttattgggc tgtcttagtc atgtttttaa ttaattttcc gtaacctata tctcttattt 240
 tatgttaatt agtacaaca agacaacaaa agacctaagc caaaaataaa atcatcaact 300
 acttaaaggt aagaatgggt tcaaatcaat caggctcgtag gtaaccatgc acttggtatg 360
 gtcaaagtag aagtaaaatt ttgtcactat accattgato atttatgtgt tgtaaaaaaa 420
 aattgttcct tttagcattg cacttgaca aaaactcagt ttcattgtga attcaaactt 480
 gttattttct gtctgacaaa 500

<210> 14
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 14

gaaaactagt ggtttattta ctatatgtta ttgtatcttt caataaagag atgctccatt 60
 tgaccaaaaa taaaaagaga tgctocagat agtgcactct atctatgtta taataatcaa 120
 gtgtatgcat ttcttcccc tttatttgga gcatgtgtat gtttaaatat ttgtaatttg 180
 aaccttcaaa cttgttctag ttaccaaata ataagatcat tattagtttg tgtgtttatc 240
 tctattgtct actaatttta tttttttttt acttttctat tctttatttg tattaatatca 300
 taagttctaa ttatttaatc aaaacttcaa atggtggcgg ttatacgcta ttccgaatcg 360
 tcttttggtg tccgagtota taggctacac tcatatcctg gttgaaacag actctatagc 420
 tgtcctgata aggtcaatca gattagaaga ttcttttctc aaaattggag tcttttcttt 480

caacgctgtg cagattgact 500

<210> 15
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 15

aaaggttgaa gaaagagaa tctcagcagt catattgaat ctgtttgatt tactacacaa 60
 aaggataatt ttctattttg gatgtttcaa taactgtgtg caatatttag gtatttagta 120
 tgctctgtga gcaaattaat ccccccctccc aaaatttcat ttcaccccccac ttttctgttt 180
 ttccaaatgt ctctgtatcc gtggctctgc cacaatcttt attgatattg caattttcca 240
 gttttgtgca aataatcatg agcatttcaa ttcactatct tcaaatgcgg ctttatacct 300
 taaacacgag ggcatagtct cacactatgg tttccatgaa tattgtcaca ccgtgggttg 360
 caaggatatt gtttaaaggt taaatgtgac tgtgaatgat caatattttg cagaaaagaa 420
 ataaacttaa acaaaaggtg atctaaattt tcaatgacca gtaatcaata tcttacaatc 480
 tctcaactgt gaaattccga 500

<210> 16
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 16

tttgctttat atatgataag aaattgtttt tttagttttg ctttccattt gtaaaattat 60
 cttttgagag ttttttagatt attgcacttt ctaaattttc attttgcttc tttgttggat 120
 ctgggatttc tgaatgaac attagagtaa taaatcgaat ctgagtatta caagcaagtt 180
 tgttgaaata atgatctcta attttgtcaa gttaaagaaa tcaaaatatac ttgtacacaa 240
 aaaaaaaaaa aatcaaaaaca tcatgtttga ttaacaaaac tccaatttga aatcaattta 300
 aatttaaatt tcatttttag aaagaaaaaa aaaatattat tccatccatt attagtcttc 360
 gatttcacac aactagtttt tcgatttact cactaccta catatgagta tgtaagggtt 420
 gattacgtat tcattattgc tctttgtttc acataattct tttttttcaa tcaaaatgaa 480
 aattatataa aggagtacaa 500

<210> 17
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 17


```

aatgaatga atcagctttc tcttggtcat aaagaattgt gtggaaatga attgtgtgtt 60
gctatataca tgagtgtgtt ggttgctgcc ttatgtgttc ttctagggtt attttttctt 120
ttgctttgta ataatttgtg cggtactatt gtaaacaatg tatttaatga ataataaag 180
tctaaagtgt gtaatggagg gaagtaaag taaatccttt cgcaagtgtt tttttagctt 240
gaaagtcttt catgcattgg tttggagtac catcatatca cccttaattt ttctagttaa 300
gatttttaggg acaagagaag ttcaaattac actccaatta tgtgctcggg gaaatttaat 360
tggttagcaga caatacacga aaaagtaaca catttagtat ctactatca tctgcaaata 420
gtgcatatgt tcatatcatt tcacattttt ataatacagc atattataaa ttcaaacta 480
attttggtac ataatagtat 500

```

```

<210>      18
<211>      500
<212>      ДНК
<213>      Medicago truncatula

```

```

<400>      18

ttaatccatc atcatcgga tgtgtgtttg ttttttttgt gtctattttg accaaatcat 60
atattcatat gtatgtgtaa attattatga actactgtat gttagtgtt catgttcgtg 120
aactgaacac attgaatggt ctgtggagtg tggagattct ttcattgtgt tatttattat 180
gagtttttct tttttatttc ttcaaaagca gactactgaa atattgattt gataccacca 240
aaaagaaaaa gtaatatatc ttactattaa tatttatagt tgatataaac atcatcaaaa 300
tttaaaatca gtttctaata ttggtttgtt cggggtggcc cttggattcc attttgcata 360
tgctgttgcc caggaactaa gctctttcat aagataatgt tcggggtagc tctgttacta 420
ggtcataaaa aagaccgatt gttgtcatcg ttcgaaaaag cgaaaaaaca aacacaagca 480
ttctcgtcat aacaaagacc 500

```

```

<210>      19
<211>      500
<212>      ДНК
<213>      Medicago truncatula

```

```

<400>      19

tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgagggaatt tttttatatt 60
ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga 120
atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaagtg tgagatttat tattatgttt catttcaaaa 180
gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta 240

```

ttaaaatttg catgcttttt gtccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc 300
aagtttttaga ttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata 360
aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac 420
tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcagtatac 480
ggataattgc actcacaata 500

<210> 20
<211> 289
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 20

gggtcttagt ttaactttct tgatttgtaa tgtacaatgg ggctgtggtg tttatatttc 60
atttaatcgt taatgtacta ctttatacta gttgtttata tttaaaaag cataaacttt 120
gcctcatcta aatgtacttg aattgagttt acttagaagt gcttgaattg agtttgtgta 180
aatgaacata attttagtag tgcttagatt aagttcacat atcactactt tataccaggg 240
gattaactatt ctttttagct tttgttttta ctggttggtt tttgcaaaa 289

<210> 21
<211> 382
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 21

gaagggctct gatctatgaa gcacggaac gcctccgatt aggcgtgtcc aggtgtccga 60
cacgtatcat ctctgatacc gacacgacac cgacacttac aattacacgg aattatgtaa 120
ttttctcaaa ttattagagg tgtcggcgtg tcagtgtacg tgcgtgtcc tttgtatccg 180
tgtttcatag gtcttggttc atttttcttg atttgtaatg tacaatgggg ttgttgtgtt 240
taaatttcat ctaatcttta ctgtactatt ataaatatat atactagttt gttcataaaa 300
gcataaagtt ttgcttatct ctttggtgtt accggttcaa tgctcgacct aggaaaaaat 360
taataaaaatt tcattcataa aa 382

<210> 22
<211> 400
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 22

gcaaggagga tcatgaacat caciaagtga atttatttta tgtttgacc atatattatt 60
atttgtgaca catttttagaa ctcttaaacc atttttctgt ttgcatttta gctactggtt 120

gttgatttca caataatgat gcagtcctat gcttcttggt gtaagattca atactatgta 180
aagtgtatgt ctttggttgt atactattta aaatctattc ttgtattgta taattttattt 240
tagcctttgt ttgagattga ggttacttgt tctgttgcat ttaatcacia gttttcattt 300
tgttatacgt acgtgttata cctgtttttt ggacctaaaa atactgggcc caatttcatt 360
tcaaactttg tcaattatca aatttcaact gcacagttca 400

<210> 23
<211> 699
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 23
actgcagtca cagtcataaa taccggtgca taacatgaat taattttata ttgcaacat 60
gttttttaaaa tcttaaacct tctatttttc cactccatag gttatcaatt aagtattatt 120
attttgtgtg attctactac ttggaatat aagaagattg aaaaggaatt tctgtgagcc 180
ctatatataa accctaaacc ctatgtttat tgccatttgg taccactgt actttgcggc 240
tgttgtgaag atcaagttat aattgctagg atagtttcta ttgggttcat gttagttttc 300
aaciaaagtga tttcaattat gttgtttgaa cactttaaac tagttattgg ttgttgtatt 360
cacaataatg atgtagttct atgcttcttg gtgcatgaac aaatactaca taaagtgtaa 420
gccottgggt gtaattgtat tttaggaaat atttactatt ttgtaattga ttttagcctt 480
tgtttgagat tgagataaca tgtatttact ttcttttctc attttatcac aattcttcat 540
ctttttttac attttggttt tatgaagagg actaaaaata tctctagtta cttaacttct 600
cttttgtagt aagaaaaata ctatgatcag aaacataaat caagcatctg ttacgaacgg 660
tatacttggg aaaacaatat cattattaac aactttagt 699

<210> 24
<211> 500
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 24
aaacaccaat tccatcttct tcaataataa ccactatata tatatagaag caacttcaaa 60
aataacttaat acttgtatta taaattgagt tactttgaat gtctacgat agagacggag 120
ttcaaatctc ctcaagtatg gttgaaaaat ggtcttcaat gtaactttaa ataaaaactt 180
tgtacgtcct cgctaataaa aataatgttt gtttaattac tttatatatg tattttttaa 240
tgctatttta tatatgttgt accccaaact tgtctgacca atttaacag aagaacatgt 300

agagtgtagg tttgccggga agatttggat taaagtcttc gtttggttgg gtttggctct 360
 ggtcatgccg gaaaatttat tttccttgta cttcaaatgt tttgcttttt cgatcggaaa 420
 gggaatagga gattaaaggg cctcctttta atatggcaaa cagaattata gctttagact 480
 gacgctgcgg tttagcttca 500

<210> 25
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 25
 ttatggtagt agttttgaaa tgttgggaac ttgtttttca tgttttgta ccatctgttt 60
 taaactatgt actgtctcca tctgacattt taataactcg atcctcgggt tatttttagtt 120
 ttcctattta ttactgcagt acttttggtt caattttgat ttagttgttt ccattatact 180
 tccaattttg gtgttttatt cttttttctt aaaattttga tttatttata cttcgcata 240
 gtgttttttt tacattgcga ttctatttaa attattatgt ttttcattta ggtttacaat 300
 tttggttttag ttgttcccat aatattttca ttgttttagtt gttcgcatag tgttttttac 360
 atttatgttt ttcatttctt aaattaaatt gttaatttga gatgatgctt ttttgtgaac 420
 aatgaaaaca ttcttgatat tttcattgtt tcaatgtctt gtataaatat tttcacatgt 480
 tagaattttt atgttggttg 500

<210> 26
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 26
 gagtactctc caacatggac acaccatggg attgtgtaac ataaataatg tgtcgtttgt 60
 aatgaatgct cgcaactttt ctagctaatt aagctagagt tgaacttgag ctacttttat 120
 gtaccctaaa gaggcacaat ctttgctgtt gatgtactat gatcatgtta taatatgatg 180
 aaaatggagt gtgcctcatt ttataatttt tattttctctg agtatatgtt tttagggcta 240
 aacaccttat aaaaaaaggc cacttagaat atgaaacatg aacttttgta aaaaagtaga 300
 gattaaaatt gaaatcaaaa atttttatag gatcaatatt cgaagaattt ttttagaggg 360
 attaaaatta aatatagttt cggactgacc caaggcacia tccggctccg ctcggttctg 420
 acctgagtcc accatgcac tgtcacctta ccattgacac gccctaaaat acattagatc 480
 gcagtacaaa ttgagagtta 500

<210> 27
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 27
 caaattgtta gtgtttttct gatttagttc agagattgta agtaagatac cccaaaagtt 60
 gtattatact atactattat agttagtaaa gcaatgtaat aactgtgcag gatgtcaaaa 120
 gaaaagctag aaaaaatgat ttaaggggat atccggatat gagattgagt ccataggagc 180
 acccacattc atgccacca aatgagtggc ataaatggga cccacataat atattatatt 240
 actttatact ttccaattat ttaaaccact caactacatt ttctaaatat ccataccact 300
 cctctaaaac tctaaaatgg gtccactta tcttacaact acaatatact ttaaattata 360
 ttttaaatta atatataaaa tgtgtaatga aaatatataa aatgtatcac acaatatact 420
 caaaatgaat caaatatata tgttaaaaaa attagccgtt gcatgagtga aaaaaaaaaa 480
 atattaccgt tgcattgagtt 500

<210> 28
 <211> 500
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 28
 tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgagggaatt tttttatatt 60
 ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga 120
 atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaatg tgagatttat tattatgttt catttcaaaa 180
 gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta 240
 ttaaaatttg catgcttttt gtccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc 300
 aagttttaga ttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata 360
 aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac 420
 tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcatgtatac 480
 ggataattgc actcacaata 500

<210> 29
 <211> 481
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula
 <400> 29
 gcagctggaa acttactagt gttaaagttg tatctggctc atttcgagct gggtatatat 60

atattgtgatt gtggaatttc ttgtggtctg gaagtatttt caacagttgt gatgcagtat 120
tatggaattt atgacatgcg gtattatgga atttatgaca ttatgtggtg tttgcttcaa 180
taatatgtat caaaggagtt ttataagact tcatttaaca tttcagatgc ttggatgtgt 240
tactttatgt ttaccgtgct atgtttttat accagattca agattttaga tgcotttaggc 300
ttggaacaag ttttgattgt ttaacaatta aaaaggtttt atgacctaaa accatggatt 360
ttcctgattt ccgaaagttt taaaattatt tcaaataaaa tcatggatgt tggtttaagt 420
ggcgaagtct tctgctcttt cttttcaagt agagtaagat cttggattct agtcaccatg 480
a 481

<210> 30
<211> 600
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 30
tcattcaatt tgaccotttt gctacattct tgctgtcata gttatttaat ttaatttctt 60
aagggtgcata ttcttttggg gaatttaagc cccccgaaa catggaagga ggttggctgc 120
aaagttcctg aaggataatc gtttttttca ttccctttaa tttttgttat tcattatttc 180
acattttacc taaaacttca gggagtga taaagaactc tttctctctg aactgtttat 240
gttgtctact agaaaaaaaa atcctgtaag aggttaaggta ttcttccaaa acaggattct 300
ttttcttato attttacttc attagtttct aagttccttt tctacattg tataagattc 360
tgtcagtaca tttatgttgc ttatgtagga agtgggactg agtttcttat gaaggaattt 420
atgagttatt gaatatttat tgcaagctat attttagaat acagtatact ttcttcttat 480
gttattattt ttttaagtgt attgtgttgt gttattatta taagctttgt taaactctga 540
tcattttcaa attcaaaaaca atgtttagtt caaaggcaaa gctgagttgt gctgattatt 600

<210> 31
<211> 1594
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 31
actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
taaaaaacac acactagttt atgacgcaat actattttac ttatgatttg ggtacattag 120
acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240
tttatcgga acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300

```

agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatgttg taaaaattca 360
ttataaatgt atatgattca attttagata tgcatacagta taattgattc tcgatgaaac 420
acttaaaatt atatttcttg tggaagaacg tagcgagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
ttaaataaaa ttaatgttaa gttcttttaa tgatgtttot ctcaatatca catcatatga 540
aaatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
atTTTTTaaa aattgtatct ttataataa tacaataata aagagtaatc agtggttaatt 660
ttttttcaaa tataagtttt attataaatc attgttaacg tatcataagt cattaccgta 720
tcgtatctta atTTTTTTTT aaaaaccgct aattcacgta cccgtattgt attgtaccgg 780
cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcgggtgc aagacagcat 840
ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaagggt taggtaacaa 900
gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccgttggc gtaatataac 960
agccaatcga tttttgctat aaaagcaaat caggtaaact aaacttcttc attcttttct 1020
tccccatcgc tacaaaaacc gttcctttgg aaaagagatt cattcaaacc tagcacccaa 1080
ttcogtttca aggtataatc tactttctat tcttcgatta ttttattatt attagctact 1140
atcgtttaat cgatcttttc ttttgatccg tcaaatTTaa attcaattag ggTTTTgttc 1200
ttttctttca tctgattgaa atccttctga attgaaccgt ttacttgatt ttactgttta 1260
ttgtatgatt taatcctttg tttttcaaag acagtcttta gattgtgatt aggggttcat 1320
ataaattttt agatttggat ttttgtattg tatgattcaa aaaatacgtc ctttaattag 1380
attagtacat ggatattttt tacccgattt attgattgtc agggagaatt tgatgagcaa 1440
gtttttttga tgtctgttgt aaattgaatt gattataatt gctgatctgc tgcttcaggt 1500
tttcataacc catattcttt taacctgtgt gtacacacaa tgaaaaattg gtgattgatt 1560
catttgTTTT tctttgtttt ggattataca gggt 1594

```

```

<210>      32
<211>     1000
<212>      ДНК
<213>     Medicago truncatula

```

```

<400>      32
actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
taaaaaacac acactagtgt atgacgcaat actatTTTtac ttatgatttg ggtacattag 120
acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240

```

```

tttatcggat acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300
agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatgttg taaaaattca 360
ttataaatgt atatgattca atttttagata tgcattcagta taattgattc tcgatgaaac 420
acttaaaatt atatttcttg tggagaacg tagcgagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
ttaaataaaa ttaatgttaa gttcttttaa tgatgtttct ctcaatatca catcatatga 540
aatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
attttttaaa aattgtatct tttataataa tacaataata aagagtaato agtgtaatt 660
ttctttcaaa tataagtttt attataaatc attgttaacg tatcataagt cattaccgta 720
tcgtatctta attttttttt aaaaaccgct aattcacgta ccogtattgt attgtacccg 780
cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcgtgc aagacagcat 840
ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaagggt taggtaacaa 900
gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccgttggc gtaatataac 960
agccaatcga tttttgctat aaaagcaaat caggtaaact 1000

```

```

<210>      33
<211>      92
<212>      ДНК
<213>      Medicago truncatula

```

```

<400>      33

aaactttctt attcttttct tcccatcgc tacaaaaccg gttcctttgg aaaagagatt 60
cattcaaacc tagcacccaa ttccgtttca ag 92

```

```

<210>      34
<211>     502
<212>      ДНК
<213>      Medicago truncatula

```

```

<400>      34

gtataatcta ctttctattc ttogattatt ttattattat tagctactat cgtttaatcg 60
atcttttctt ttgatccgct aaatttaaat tcaattaggg ttttgttctt ttctttcatt 120
tgattgaaat ctttctgaat tgaaccgttt acttgatttt actgtttatt gtatgattta 180
atcctttggt ttcaaagac agtctttaga ttgtgattag gggttcatat aaatttttag 240
atttggtttt ttgtattgta tgattcaaaa aatacgtcct ttaattagat tagtacatgg 300
atatttttta ccgattttat tgattgtcag ggagaatttg atgagcaagt ttttttgatg 360
tctgttgtaa attgaattga ttataattgc tgatctgctg cttccagttt tcataacca 420
tattctttta accttggtgt acacacaatg aaaaattggg gattgattca tttgtttttc 480

```


tttgttttgg attatacagg gt 502

<210> 35
<211> 1141
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 35

tggattaatt tatttggact ggtttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60
aattttgggt gaaagtggtc attgtatttt cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
agagagaaaa aaagatcggt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180
taatcaaacg ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300
cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
ctttagaaat taattttttt ttttgacaag actttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
tttgttgga aaaattaaca agttaaatat caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgca 600
aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat tttttagtgc ataaatcaaa 660
ccgttgacct ttttattgaa ctogtttagt ctcaactcat atcattggac tctacottcg 720
agaatgtacc aaaatgtgtt tagttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
acttttcttg aaaaattgtt cttctcccat ttaaaattgc tcaactcctt gatctatcgg 840
gagttaactc atactcggca ttattcaacg gtagctaacc cacattgtca ctgttagatt 900
agttcaatca ttttttaaat cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
ccgctgaaaa atgtcgagcc cgagttaact tcatctgaat caagggaatg aacaatttta 1020
aaaggagaaa aagcaatttt ccttttcttg aactcattaa ggttccaaat tcttttataa 1080
aagggccact aactgccttt catatataca ccattcatac atagaaacca atagccaaaa 1140
a 1141

<210> 36
<211> 1107
<212> ДНК
<213> Medicago truncatula

<400> 36

tggattaatt tatttggact ggtttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60

```

aattttgggt gaaagtgggc attgtatttt cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
agagagaaaa aaagatcggt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180
taatcaaacg ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300
cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
ctttagaaat taattttttt ttttgacaag actttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
tttggttgaa aaaattaaca agttaaatat caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgca 600
aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat tttttagtgc ataaatcaaa 660
ccgttgacct ttttattgaa ctggtttagt ctcaactcat atcattggac tctaccttcg 720
agaatgtacc aaaatgtgtt tagtttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
acttttcttg aaaaattgtt cttctcccat ttaaaattgc tcaactcctt gatctatcgg 840
gagttaactc atactcgcca ttattcaacg gtatgtaacc cacattgtca ctgttagatt 900
agttcaatca ttttttaaat cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
ccgctgaaaa atgtcgagcc cgagttaact tcacttgaat caagggaatg aacaatttta 1020
aaaggagaaa aagcaatttt ctttttcttg aactcattaa gggtccaaat tcttttataa 1080
aagggccact acactgcttt catatat 1107

```

<210> 37
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Medicago truncatula

<400> 37

acaccattca tacatagaaa ccaatagcca aaaa 34

<210> 38
 <211> 298
 <212> ДНК
 <213> Gossypium hirsutum

<400> 38

```

tgtcgtacag tattttotaca tttgatgtgt gatttgtgaa gaacatcaaa caaaacaagc 60
actggcttta atatgatgat aagtattatg gtaattaatt aattggcaaa aacaacaatg 120
aagctaaaaat tttatttatt gagccttgcg gttactttct tgtgatgatc ttttttattt 180
tctaattata tatagtttcc ttgcgtttga aatgctaaaag gtttgagaga gttatgttct 240

```

ttttctcttc ctctttcttt tttaacttta tcaaacaatt tttgaataaa aatgtgag 298

<210> 39
<211> 436
<212> ДНК
<213> *Gossypium barbadense*

<400> 39

aacaaaagag tgcctcacat ttgatgcaat agctctgtaa tgtttcattc atttgcttat 60
ttcggccttg tttttctcgt attctatggg ctgatgtctc atatgggact tttctactag 120
agagcctacg ttactttacc attatattgt attctttgag acattattat tattttttta 180
ccttttgagg acactctttt tttgtatttg aaggaattta ttgtttattt tgtttggaat 240
atgtttgggt ggattttattc gattcatata tattatataa aagtaattat gttattaaga 300
aacgtagtaa gaacttacia atataaggat cgaatccga acttcatgca aatcaattta 360
caaccacac aagtttaaca ttaaattaac gtgattgggt agtaaattca tgtttctctg 420
tttaatttgt tgaatt 436

<210> 40
<211> 315
<212> ДНК
<213> *Gossypium barbadense*

<400> 40

tgatcacctg tcgtacagta tttctacatt tgatgtgtga tttgtgaaga acatcaaaca 60
aaacaagcac tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa 120
caacaatgaa gctaaaaattt tatttattga gccttgcggt taatttcttg tgatgatctt 180
tttttttatt ttctaattat atatagtctc ctttgctttg aaatgctaaa ggtttgagag 240
agttatgctc tttttttctt cctctttctt tttaacttt atcatacaaa ttttgaataa 300
aaatgtgagt acatt 315

<210> 41
<211> 315
<212> ДНК
<213> *Gossypium barbadense*

<400> 41

accatatgac actggtgcat gtgccatcat catgcagtaa tttcatggta tatcttaatt 60
atatgggtta taaaaaaaag atggtgagtg aataatgtgc gtgcattcct ccatgcacca 120
atggtgaatc tctttgcata catagagatt ctgaatgatt atagtttatg ttgtagtga 180

attaatttttg aatgttgttt ttaaatttta atgtcacttg gcttgattta tgttttaacg 240
aagccttatgt tatgtatttt actttaatga tattgcatgt attgttaatt taacattgct 300
tgatcagtat actct 315

<210> 42
<211> 712
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(712)
<223> Група хімерних регуляторних елементів транскрипції або EXP.

<400> 42

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt gaaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
aaacctcttc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa 360
ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc ccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag 540
ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttc tctatataag gaagttcatt 600
tcatttgag aggacactct agacagaaaa atttgctaca ttgtttcaca aacttcaaat 660
attattcatt tatttgtcag ctttcaaact ctttgtttct tgtttgttga tt 712

<210> 43
<211> 613
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(613)
<223> Посилений 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти.

<400> 43

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120

```
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
aaacctctct ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaaa 360
ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccaccacag aggagcatcg tggaaaaaga 480
agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag 540
ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt 600
tcatttgag agg 613
```

```
<210>      44
<211>      2001
<212>      ДНК
<213>      Штучна послідовність

<220>
<221>      misc_feature
<222>      (1)..(2001)
<223>      Нативна послідовність GUS з інтроном, який вирізається

<400>      44
```

```
atgggtcgcg ctgtagaaaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaaag cgcgttacia 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgacg agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgctgcg ttctgatgag gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccc 360
tatgttattg ccgggaaaaag tgtacgtaag ttctgtcttc tacctttgat atatatataa 420
taattatcat taattagtag taatataata ttcaaatat ttttttcaaa ataaaagaat 480
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttta tttataactt 540
ttctaataata tgacaaaaat ttgttgatgt gcaggatatc ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
cagtcttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgacgagt aatgctctac 720
accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtgggtg cgcattgtcg gcaagactgt 780
aaccacgcgt ctgttgactg gcagggtgtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt 840
gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggt 900
```

aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaaggt tatctctatg aactgtgctg cacagccaaa 960
agccagacag agtgtgatat ctacccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
ggcgaacagt tcttgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggcttttg tcgtcatgaa 1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 1140
atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg 1200
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgcggcttt 1260
aacctctctt taggcattgg ttctgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
ccgcaagggtg cacgggaata ttctgcgcca ctggcggag caacgcgtaa actcgaccg 1500
acgcgtccga tcacctgctg caatgtaatg ttctgcgacg ctacaccga taccatcagc 1560
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
ttggaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt 1800
gatcgcgtca gcgcgctcgt cgggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
caaggcatat tgcgcgtttg cggtaacaag aaagggatct tcaactcgca ccgcaaaccg 1920
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1980
cagcagggag gcaaacaatg a 2001

<210> 45
<211> 1653
<212> ДНК
<213> Photinus pyralis
<400> 45

atggaagacg caaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctgggttc tggaacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcaagtga aaactcttca attctttatg ccggtgttg gcgcgttatt tatcgagtt 300
gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgcctaacag tatgaacatt 360
tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480

```

tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600
tctactgggt tacctaaggg tgtggccott ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttaaagtgt 720
gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840
aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgatttatt taattttacac gaaattgctt ctggggggcg acctctttcg 960
aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaaggatat 1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg aggggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgctggggc ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggg 1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct 1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgtttaca 1380
caccocaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cgggtgaactt 1440
cccgccgcg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagttgt gtttgtggac 1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa 1653

```

```

<210>      46
<211>      936
<212>      ДНК
<213>      Renilla reniformis

<400>      46

```

```

atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg 60
tgggctogct gcaagcaaatt gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120
aagcacgccg agaacgccgt gatttttctg catggtaacg ctgctccag ctacctgtgg 180
aggcacgtcg tgctcacat cgagcccgtg gctagatgca tcatccctga tctgatcgga 240
atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatogcc tcctggatca ctacaagtac 300
ctcacgcgtt ggctcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360

```

```

tggggggcctt gtctggcctt tcactactcc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gattcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480
gaggatatcg cctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tggtgcttga gaataacttc 540
ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagtctgct 600
gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctctggcct 660
cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720
aacgcctacc ttctggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgacctggg 780
ttcttttcca acgctattgt cgagggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
gtgaagggcc tccacttcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900
agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cagtaa 936

```

```

<210> 47
<211> 1446
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1446)
<223> Група хімерних регуляторних елементів транскрипції або
      EXP.

```

```

<400> 47

```

```

gggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccgga acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
catcattgag ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
gatggacccc caccacagag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc acaaagggt aatatccgga 300
aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
gaaggtggct cctacaaatg ccattcattg gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttccaa ccaogtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
gatgacgcac aatccacta tocttcgcaa gaccttcct ctatataagg aagttcattt 600
catttgagag ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtacgcgc 660
tcactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtgtt ctgcctgtgc 780
tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atataggac atggtagtac gaaacgaaga 840

```


tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttgggtg cttagcggta tttattttaag 900
cacatgttgg tggtataggg cacttggatt cagaagtttg ctgttaattt aggcacaggc 960
ttcatactac atgggtcaat agtataggga ttcatattat aggcgatact ataataattt 1020
gttcgtctgc agagcttatt atttgcaaaa attagatatt cctattctgt ttttgtttgt 1080
gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140
tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgtttt aaatattgtt 1200
gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttgtt tgttgtaaca 1260
aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
cctagtgttg accagtgtta ctcacatagt ctttgcctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440
aagcgg 1446

<210> 48
<211> 675
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(675)
<223> Група хімерних регуляторних елементів транскрипції або ЕХР.

<400> 48

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagg gaagggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttcaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
aggaagggtg ctccatacaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
ttcatttga gaggaacct cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
gacaacacac cataa 675

<210> 49
 <211> 253
 <212> ДНК
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 49
 gatcgttcaa acatttgga ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttgaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 50
 <211> 841
 <212> ДНК
 <213> Glycine max
 <400> 50
 ggcaaaaaca tttaatacgt attattttaag aaaaaaatat gtaataatat atttatattt 60
 taatatctat tcttatgtat tttttaaaaa tctattatat attgatcaac taaaatattt 120
 ttatatctac acttattttg cattttttatc aattttcttg cgttttttgg catattttaat 180
 aatgactatt cttaataaat caatcattat tcttacatgg tacatattgt tggaaccata 240
 tgaagtgtcc attgcatttg actatgtgga tagtgttttg atccaggcct ccatttgccg 300
 cttattaatt aatttggtaa cagtcogtac taatcagtta cttatccttc ctccatcata 360
 attaatcttg gtagtctcga atgccacaac actgactagt ctcttggaac ataagaaaaa 420
 gccaaaggaac aaaagaagac aaaacacaat gagagtatcc tttgcatagc aatgtctaag 480
 ttcataaaat tcaaacaaaa acgcaatcac acacagtgga catcacttat ccactagctg 540
 atcaggatcg ccgcgtcaag aaaaaaaaaac tggaccccaa aagccatgca caacaacacg 600
 tactcacaaa ggtgtcaatc gagcagccca aaacattcac caactcaacc catcatgagc 660
 ccacacattt gttgtttcta acccaacctc aaactcgtat tctcttcogc cacctcattt 720
 ttgtttattt caacaccogt caaactgcat gccacccogt ggccaaatgt ccatgcatgt 780
 taacaagacc tatgactata aatatctgca atctcggccc aggttttcat catcaagaac 840
 c 841

<210> 51
 <211> 422
 <212> ДНК
 <213> Вірус мозаїки жоржини

<400> 51
atcaacggag aaacaaagat aaaaatcaat tactcacatg aaagagtatt gatcacgagt 60
cactatggag cgacaatctc cagacaggat gtcagcatct tatcttcctt tgaagaaagc 120
atcatcaata acgatgtaat ggtggggaca tccactaagt tattgctctg caaacagctc 180
aaaaagctac tggccgacaa tcataattgc tcggcatgtg caggtggggc ctccactagc 240
aataatacaa gctttacagc ttgcagtgc tcacccctca ataattggaga aaaagacgtc 300
agcagtgcg aacaagggtc gaaagacttg cctatataag ggcattctcc cctcagttga 360
agatcatcga aagttggagc aataaaactct ctcttcaaca aatctatott ttatctttta 420
tc 422

<210> 52
<211> 595
<212> ДНК
<213> Вірус штриховності банана штам Acuminata Vietnam

<400> 52
agacatcctg gaccaatatg ctgaagatta tgctacctac accaggatag gacttgaagc 60
acttaacctt gaagattggt tcgaagaacc agaaccgat ccacctaacc ctgtggaccg 120
ccagaggata gaggacatcc tggacctact gaacgtcagc aatgacgact gaaagattcc 180
caggacaccg gcggaagtgg tggaccagt ctaggtgcga tgcttagtcg cgcacgatga 240
ctatgtcgga aggcactctt gctttcgga aacttttagta atactttaag gaaagtattg 300
tacaagttag gtgcagagac aataatgcac ccagctttag ctttgtttat ggaattattg 360
tgtcggttgc attattggat gcctgcgtgc accctaagca atccccggcc ctcttctcta 420
taagaggagc ccttgcaatc agttgcaagc attcaagttt cccactgcaa gcttacttct 480
gagtttgagt tcaagttcaa taaaattcaa gctttcctct tacattctgt tcttgaaagg 540
ttcgatctaa tcgagcgagt agagaacaag atcttttggg atttccgccg ttcca 595

<210> 53
<211> 382
<212> ДНК
<213> Вірус кільцевого гравіювання гвоздики

<400> 53
atcctcaact tccaatcaga agttagcagc tgcaagcttt taggattcca tagtgataag 60
atatgttctt atctaaacaa aaaagcaagc gtcggcaaac catacagctg tccacaaaaa 120
ggaaaggctg taataacaag cggaccagc ttctcagtgg aagatacttt atcagacact 180

gaataatgga tggaccctac cacgattaaa gaggagcgtc tgtctaaagt aaagtagatg 240
 cgtctttaat aattcatcta ctttagacgt catgcatgac gtttaacatg cattgtatcc 300
 agatcctccc tggctatata aaggaggtta aatttcattg ttaaggcatc gaaaaaaaaa 360
 tttcaagtct atctctcaag aa 382

<210> 54
 <211> 1235
 <212> ДНК
 <213> Cucumis melo

<400> 54

aaattttaat aattaaaatg aacaattttt caagagtaat agagtttgag agatgtcaga 60
 gaagtttgag gaagaagata acaagtggga gaagagaata agtttggtgt gtgaaagaga 120
 aggggaaatt tcattcaagg gtatattgaa ctttttactc aaattttgta agtctatttt 180
 ttccgatcaa tcttaaaatc acacacaccc ttaaaaaatg gattatattt ggcaattttc 240
 catgataaac tcattttttaa ttttagagtta ttttttcaac gagatattaa cagtttttagt 300
 tcatatacta attgtaagaa tagtttcttt taagttgaat agaatttttg aaacttttaa 360
 tagttcaaaa ggtatttttg aaacaaaata agaatgtttt tgaacttttt ataaaaagaa 420
 ttgagatttt tttgaaattt ttgataaaga gaaaagaaaa gaagaaagaa aaaagaaaaa 480
 caagtttgta gaactcgtg ggaaaatogt cgagggccct gtgaaggaat tttgaaatta 540
 taatgagggt attttcgtca acaagggaat ttagacatcg tatataagca tcctcaaacc 600
 ctataattaa gcccttcaat ccaattgcc a ttctccatct ctgcgcgcaa gggtttaaga 660
 gcagcttctc tctcaggtt ggggtttccc cctatcttct tcattcttcc tcttctcgat 720
 ttctttcttc tatttgctcg atagtctctt atttcttgag cttttgctgt ttttctcctg 780
 tacatcctaa catgaattat aacttggtt tgattttgtc ttttacttct gtattaaaca 840
 acttttctta cccttttatt cttctcttct tcttcgtgtc cctgcccttt tgtttttatg 900
 ctaattttat gtttctgtt atcaatctat cgaggcgtga cctgtcgttc ttccaatagc 960
 gtagatctgc acttaatcta ttctagctga ttggattggt cgtttttcgt ttttttaatt 1020
 tattttctct gttctagtgc cgataaattt ttttatatat aattaacaag ttctccagcc 1080
 aaaagggtta atattgcgtt ggatatttta atttttacgt tatttagatg tgtgaatcta 1140
 ataaaattag ggttattcat aaatttcagt aatgatattt tggttatctg ttcttgctgt 1200
 tctgtttcgt cagttctttt acctaatatt caagc 1235

<210> 55
 <211> 1865

```

<212>      ДНК
<213>      Штучна послідовність

<220>
<221>      misc_feature
<222>      (1)..(1865)
<223>      Група хімерних регуляторних елементів транскрипції або
            ЕХР.

<400>      55

aattctcagt ccaaagcctc aacaagggtca gggtagagag tctccaaacc attagccaaa  60
agctacagga gatcaatgaa gaatcttcaa tcaaagtaaa ctactgttcc agcacatgca 120
tcatggtcag taagtttcag aaaaagacat ccaccgaaga cttaaagtta gtgggcatct 180
ttgaaagtaa tcttgtcaac atcgagcagc tggcttgtgg ggaccagaca aaaaaggaat 240
gggtgcagaat tgttaggcgc acctaccaa agcatccttg cctttattgc aaagataaag 300
cagattcctc tagtacaagt ggggaacaaa ataacgtgga aaagagctgt cctgacagcc 360
cactactaa  tgcgtatgac gaacgcagtg acgaccacaa aagaattagc ttgagctcag 420
gatttagcag cattccagat tgggttcaat caacaaggta cgagccatat cactttattc 480
aaattggtat cgccaaaacc aagaaggaac tcccatcctc aaaggtttgt aaggaagaat 540
tctcagcca  aagcctcaac aaggtcaggg tacagagtct ccaaaccatt agccaaaagc 600
tacaggagat caatgaagaa tcttcaatca aagtaaaacta ctgttccagc acatgcatca 660
tggtcagtaa gtttcagaaa aagacatcca ccgaagactt aaagttagtg ggcattcttg 720
aaagtaatct tgtcaacatc gagcagctgg cttgtgggga ccagacaaaa aaggaatggt 780
gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaaa gataaagcag 840
attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct gacagcccac 900
tcactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaag aattccctct atataagaag 960
gcattcatte ccatttgaag gatcatcaga tacaaccatc ttccacacac tcaagccaca 1020
ctattggaga acacacaggg acaacacacc ataacggacc gaccgtcttc ggtacgcgct 1080
cactccgccc tctgcctttg ttactgccc gtttctctga atgctctctt gtgtggtgat 1140
tgctgagagt ggtttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgcctgtgct 1200
gattacttgc cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat 1260
agaacctaca cagcaatacg agaaatgtgt aatttggtgc ttagcgggtat ttatttaagc 1320
acatgttggg gttatagggc acttggaatc agaagtttgc tgtaattta ggcacaggct 1380
tcatactaca tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg 1440
ttcgtctgca gagcttatta ttgccaata ttagatattc ctattctgtt tttgtttgtg 1500

```

tgctgttaaa ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat 1560
ctctgctcct ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttgtttta aatattgttg 1620
totgaagaaa taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttggtt gttgtaacaa 1680
aatttaaaaa taaagagttt cctttttgtt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta 1740
totaccaact gacactatat tgcttctott tacatacgtt tcttgctcga tgccttctcc 1800
ctagtgttga ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca 1860
agcgg 1865

<210> 56
<211> 300
<212> ДНК
<213> *Oryza sativa*

<400> 56
attaatcgat cctcogatcc cttaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
tatatataaa ccccttcgca cgtacttata ctatgttttg tcatacatat atatgtgtcg 120
aacgatcgat ctactactga tatgatatga ttgatccac agcctgatct ctgtatcttg 180
ttatttgtat accgtcaaat aaaagtttct tccacttggt ttaataatta gctactctca 240
totcatgaac cctatatata actagtttta tttgctgtca attgaacatg atgatcgatg 300

<210> 57
<211> 892
<212> ДНК
<213> *Nicotiana tabacum*

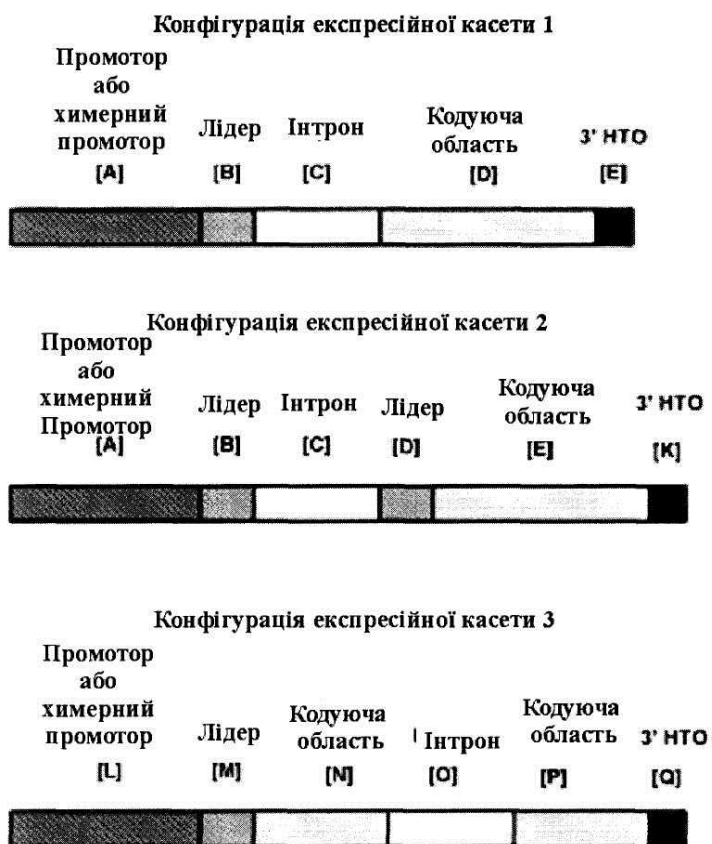
<400> 57
gttagctatg ttttttttcc ctttaatat ttaatgtatt tcttgtaata tttgtttgtg 60
tattgaagat tgaatcttga tgattgattg ttggctctgac tacagctggg ttttgtgtta 120
tgtaactatt ttttaactatt ttggatagag gtctgtttga tgtgatgttc ttgattataa 180
aaataccatc ctactttggt atctcatatc tggttggaac atgagcaatt tcatttctcc 240
tagttcttga attaaaaacc tgaaagtatt gtgcaaaaag atgctaggaa tgagactatc 300
attgttttga tgcaatatgt tcttttaagt aataggtgtt ttgtaagaag totacgcagt 360
totggatgta ttttactact cgggaaaact ggatagttgg atacttatta tgtataggaa 420
gtaaatgtgg ggattataat gcctttctct gccatctgct ctttgtatct tgtgtaaagc 480
ttggcatgcc tctcgtcaga tagccatgcg taccgtacat tcttttaaga atgaagcaat 540
tagacacttg ctcgtttctg cctttgtcac attgaccag catcatataa totgaaagat 600
tgggttagcag ttggctgcta ttttaactgt atgttaaaac aattgatttt catgtgtatc 660

```
tcctcctttt gtgctttgtg cttcttcata aaagaaagaa aacatacatt cggttgtgct 720
ctcctccttt ttcaatggta gagaggaaga acagataatt ttattgctgc ttaggtatt 780
tgacatctgt gatattttca tagtaagggt ttgttttttc ctttttattt agttcaagat 840
tgtttcatga atttcataa gcgtaatacc atagtctttt tatttgctac ag 892
```

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 послідовності до будь-якої з SEQ ID NO: 1-30;
 - б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 1-30; та
 - 10 в) окремого фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 1-30, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність;при цьому зазначена послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується.
- 15 2. Рекombінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана послідовність ДНК має щонайменше близько 97 відсотків ідентичності послідовності до послідовності ДНК будь-якої з SEQ ID NO: 1-30.
3. Рекombінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана послідовність ДНК містить будь-яку з SEQ ID NO: 1-30.
- 20 4. Рекombінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що гетерологічна полінуклеотидна молекула, яка транскрибується, містить ген, який представляє агрономічний інтерес.
5. Рекombінантна молекула ДНК за п. 4, яка **відрізняється** тим, що ген, який представляє агрономічний інтерес, обумовлює у рослин толерантність до гербіцидів.
- 25 6. Рекombінантна молекула ДНК за п. 4, яка **відрізняється** тим, що ген, який представляє агрономічний інтерес, обумовлює у рослин стійкість до шкідників.
7. Клітина трансгенної рослини, яка містить рекombінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану із групи, що складається з:
 - а) послідовності ДНК із щонайменше 95 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID NO: 1-30;
 - 30 б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 1-30; і
 - в) окремого фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 1-30, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність;при цьому зазначена послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується.
- 35 8. Клітина трансгенної рослини за п. 7, яка **відрізняється** тим, що вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину однодольної рослини.
9. Клітина трансгенної рослини за п. 7, яка **відрізняється** тим, що вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину дводольної рослини.
10. Трансгенна рослина або її частина, яка містить рекombінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, що складається з:
 - а) послідовності ДНК із щонайменше 95 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID NO: 1-30;
 - 40 б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 1-30; і
 - в) окремого фрагмента будь-якої з SEQ ID NO: 1-30, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність;при цьому вказана послідовність ДНК функціонально зв'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується.
- 45 11. Рослина-нащадок трансгенної рослини за п. 10, яка **відрізняється** тим, що рослина-нащадок містить молекулу рекombінантної ДНК за будь-яким з пп. 1-4.
- 50 12. Трансгенна насінина із трансгенної рослини за п. 10, яка **відрізняється** тим, що трансгенна насінина містить молекулу рекombінантної ДНК за будь-яким з пп. 1-4.
13. 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.



ФІГ. 1