



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120252** (13) **C2**  
(51) МПК**C12N 15/82** (2006.01)**A01H 1/02** (2006.01)**A01H 6/20** (2018.01)МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2015 11408</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Руан Домінік (BE),</b> <b>де Бот Грета (BE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>16.04.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>БАСФ АГРІКАЛЧЕРАЛ СОЛЮШНС СІД</b> <b>ЮС ЛЛС,</b> 100 Park Avenue, Florham Park, NJ 07932, USA (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>11.11.2019</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Петров Андрій Володимирович, реєстр.</b> <b>№139</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>13164421.3</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 0141558 A1, 14.06.2001 WO 0131042 A2, 03.05.2001
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>19.04.2013</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>EP</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>25.02.2016, Бюл.№ 4</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>11.11.2019, Бюл.№ 21</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/EP2014/057770,</b> <b>16.04.2014</b>		

**(54) ГІБРИДНА РОСЛИНА BRASSICA****(57) Реферат:**

Винахід стосується рослини *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що містить в своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору. Винахід також стосується клітини або тканини, або насіння рослини; пари рослин *Brassica napus* або *Brassica juncea* для застосування для одержання гібридного насіння; геномної ДНК рослини *Brassica napus* або *Brassica juncea* та рослини, клітини або насіння рослини *Brassica juncea*, що містить елітну подію RF-BN1.

UA 120252 C2



## Галузь техніки

Винахід стосується трансгенних рослин *Brassica*, матеріалу рослин та насіння, зокрема рослин олійного рапсу, який відрізняється тим, що в цих рослинах відбувається поєднання двох явищ специфічної трансформації, зокрема за наявності гена чоловічої стерильності, локалізованого у специфічному місці геному *Brassica*, та гена відновлення фертильності, локалізованого у специфічному місці геному *Brassica*. Винахід також стосується пари трансгенних рослин *Brassica*, зокрема рослин олійного рапсу, спеціально пристосованих для одержання гібридного насіння. Конкретніше, одна з рослин характеризується тим, що вона є чоловічо-стерильною, завдяки наявності в її геномі гена чоловічої стерильності, а друга - тим, що несе ген відновлення фертильності, здатного перешкоджати активності гена чоловічої стерильності. Пара рослин *Brassica* за винаходом поєднує здатність формувати гібридне насіння з оптимальними загальними агрономічними характеристиками, генетичною стабільністю та адаптивністю до різних генетичних фонів.

## Рівень техніки

Фенотипічна експресія трансгена в рослині визначається як структурою самого гена, так і його розміщенням в геномі рослини. В той же час наявність трансгена (в чужому ДНК) в різних місцях генома буде по-різному впливати на загальний фенотип рослини. Агрономічно або промислово успішне надання комерційно цікавої характеристики рослині шляхом генетичної маніпуляції може бути довгою процедурою, що залежить від декількох факторів. По-суті, трансформація та регенерація генетично трансформованих рослин є лише першими кроками з цілої низки кроків, що потребуються для селекції, та включають екстенсивну генетичну характеристику, виведення та оцінку рослин в польових випробуваннях.

Термін «насіння рапсу» охоплює все насіння різновиду *Brassica*. *Brassica* вирощують в різних країнах - від Китаю та Індії до Фінляндії та Канади - як одну з найцінніших олійних культур. Більшість видів *Brassica* належать до сімейства *Cruciferae*. Вони виникли як диплоїдні види, в яких наявні анеуплоїдні хромосоми в кількості, що лежить в діапазоні від 7 (*Brassica fruticulosa*) до 12 (*Sinapsis alba*). Вид *Brassica*, що росте в Канаді найекстенсивніше, відомий як ріпак олійний або *Brassica campestris* (aa, n=10). *Brassica oleracea* (cc, n=9) урізноманітнілась за останній період історії еволюції у принаймні шість основних садових видів, в тому числі броколі, цвітну капусту та капусту. *Brassica nigra* (b, n=8) або чорна гірчиця є комерційно менш важлива сільськогосподарська культура і більш відома своїм насінням, з якого вперше гірчиця була одержана. З цих основних видів за останні стадії еволюції шляхом схрещування одержали амфіплоїдні гібриди. Найбільш важливою з них є *Brassica napus* (aacc), зимові види яких в північній Європі забезпечують найбільший врожай насіння рапсу, та *Brassica juncea* (aabb) або коричнева гірчиця, що є однією з основних олійних культур Індійського субконтиненту. Хоча схрещування різних різновидів *Brassica* (зокрема тих, що мають сумісні геноми) можливе і його часто здійснюють для виведення культур, не всі характеристики (або гени) можуть бути перенесені з одного різновиду до іншого або, при перенесенні до різних різновидів, зберігають ідентичні характеристики (або профілі експресії генів). Таким чином, генетичний локус, що забезпечує оптимальну експресію природного або химерного гена в одному різновиді *Brassica* не буде обов'язково мати аналогічний ефект в іншому.

Різновиди *Brassica* є двополими та зазвичай на 60-70% самозапилюваними. Одержання гібридів та введення генетичної варіації, в якості основи для селекції, традиційно залежало від адаптації таких природних феноменів як самонесумісність та цитоплазматична чоловіча стерильність. Способи регулювання штучного запилення, такі як ручну емаскуляцію або застосування речовини, що руйнує гамети, не часто застосовують при виведенні *Brassica* через їх лімітовану практичність та високу ціну, відповідно.

Трансгенні способи розроблювали для одержання рослин з чоловічою або жіночою стерильністю, що забезпечують цікаві альтернативи традиційним методикам.

Патентний документ EP 0344029 описує систему досягнення ядерної чоловічої стерильності, за якої трансформують рослини, що мають ген чоловічої стерильності, який містить, наприклад, ДНК, що кодує молекулу барнази, під контролем специфічного промотора TA29 тапетума, який, при включенні у рослину, забезпечує селективну деструкцію клітин тапетума. Трансформація рослин тютюну та олійного рапсу за допомогою гена, одержаного з рослини, в якій повністю запобігали утворенню пилку (Mariani et al. 1990, Nature 347: 737-741).

Цитохімічний та гістохімічний аналіз іншого способу одержання рослин *Brassica napus*, що містять химерний ген барнази PTA29, описаний De Block та De Brouwer (1993, Planta 189:218-225).

Для того щоб відновити фертильність потомства з чоловічою стерильністю, була розроблена система, за якої рослину з чоловічою стерильністю схрещують з трансгенною

рослиною, що несе ген, що відновлює фертильність, який при експресії здатний пригнічувати або перешкоджати активності гена чоловічої стерильності (US 5,689,041; US 5,792,929; De Block and De Brouwer, supra). Застосування корегуючих генів при одержанні рослин з чоловічою стерильністю для збільшення частотності трансформантів, що мають хороші агрономічні характеристики, описано в WO 96/26283. Зазвичай, коли ДНК стерильності кодує барназу, корегуюча ДНК кодуватиме барстар.

Елітна подія MS-B2 та рослини з чоловічою стерильністю, що містять таку елітну подію, що забезпечує чоловічу стерильність, широко розкриті в документі WO01/31042 (включеному сюди шляхом посилання) та включають характеристику трансгена та послідовностей ДНК рослин, що прилягають безпосередньо до вставленого гена.

Еталонне насіння, що містить елітну подію MS-B2, задепоноване в ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) 14 жовтня 1999р. під номером доступу ATCC PTA-850. Інший зразок аналогічного насіння задепоноване під номером доступу PTA-2485. Альтернативною назвою MS-B2 є MS 11.

Елітна подія RF-BN1 та рослини, що містять таку елітну подію, що забезпечує чоловічу стерильність, широко розкриті в документі WO01/41558 (включеному сюди шляхом посилання) та включають характеристику трансгена та послідовностей ДНК рослин, що прилягають безпосередньо до вставленого гена.

Еталонне насіння, що містить елітну подію RF-BN1, задепоноване в ATCC (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) 20 вересня 1999р. під номером доступу ATCC PTA-730. Альтернативною назвою RF-BN1 є Rf 3.

WO01/41558 описує також елітну подію MS-BN1, рослини з чоловічою стерильністю, що містять таку подію, а також способи ідентифікації таких рослин та їх потомства. Альтернативною назвою MS-BN1 є MS 8.

Події MS-BN1 та RF-BN1 містяться в гібридних рослинах *B. napus*, що продаються під брендом InVigor® Canola.

Вищезазначені документи не описують, ані конкретне поєднання MS-B2 та RF-BN1 в рослинах *Brassica*, ані їх застосування при одержанні гібридного насіння. RF-BN1 в *Brassica juncea* та застосування MS-B2 з метою збільшення врожаю олійних рослин *Brassica* також не описується у вищезазначених документах.

Суть винаходу

В одному варіанті здійснення винахід пропонує спосіб одержання гібридного насіння з рослин олійного рапсу, таких як *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що включає стадії забезпечення материнської особини рослини олійного рапсу з чоловічою стерильністю, що містить елітну подію MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850; забезпечення батьківської особини рослини олійного рапсу з чоловічою фертильністю, що містить елітну подію RF-BN1, переважно в гомозиготній формі, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730; забезпечення запилення вказаної материнської особини рослини олійного рапсу пилом вказаної батьківської особини рослини олійного рапсу; збирання врожаю гібридного насіння зі вказаної материнської особини рослини.

В іншому варіанті здійснення винахід пропонує рослину олійного рапсу, таку як *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що містить у своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850 та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730. Також пропонуються клітини або тканини, або насіння таких рослин олійного рапсу.

В ще одному варіанті здійснення винаходу пропонується пара рослин олійного рапсу для застосування при одержанні гібридного насіння, де одна з рослин олійного рапсу містить елітну подію MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850, а інша з цих рослин олійного рапсу містить елітну подію RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

Також завданням винаходу є забезпечення геномного ДНК рослини олійного рапсу, такої як *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що містить у своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850 та принаймні одну копію

елітної події RF-BN1, де еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

Також винахід пропонує *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що містить у своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850, та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

Також винахід пропонує *Brassica juncea*, а також його клітини та насіння, що містять елітну подію RF-BN1, де еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730. Такі рослини можуть додатково містити елітну подію MS-B2, де еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850.

Винахід додатково пропонує застосування елітної події MS-B2, де еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850, для збільшення врожаю насіння в трансгенній рослині олійного рапсу, такий як *Brassica juncea*.

В ще іншому варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб збільшення врожаю рослин олійного рапсу, що включає стадію забезпечення рослини олійного рапсу елітною подією MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850.

Короткий опис креслень

Фіг. 1: Порівняння активності після гербіцидного застосування ліній гібридного *B. napus* з MS/RF. Секція A: без застосування глюфосинату амонію. Секція B: одноразове застосування глюфосинату амонію. Секція C: дворазове застосування глюфосинату амонію. Квадрати: рослини з MS-BN1/RF-BN1; точки: рослини з MS-B2/RF-BN1.

Фіг. 2: Порівняння врожаю після гербіцидного застосування ліній гібридного *B. napus* з MS/RF. Секція A: без застосування глюфосинату амонію. Секція B: одноразове застосування глюфосинату амонію. Секція C: дворазове застосування глюфосинату. Темно-сірі стовпчики: рослини з MS-BN1/RF-BN1; світло-сірі стовпчики: рослини з MS-B2/RF-BN1. Лос. 1 - Лос. 5: місцезнаходження польових випробувань; AVG: середнє значення з усіх пунктів (місцезнаходжень); Врожайність представлена у % в порівнянні з рослинами, що містять MS-BN1/RF-BN1 як 100%.

Докладний опис винаходу

Даний винахід описує нову комбінацію події чоловічої стерильності MS-B2 та події відновлення фертильності RF-BN1 в рослинах олійного рапсу, зокрема *Brassica napus* та *Brassica juncea*.

Даний винахід базується *inter alia* на неочікуваному відкритті того, що елітна подія RF-BN1, що забезпечує відновлення фертильності, є достатньо ефективною для відновлення фертильності рослинами олійного рапсу *Brassica*, якщо вказана рослина також додатково містить елітну подію MS-B2, що забезпечує чоловічу стерильність. Хоча RF-BN1 ще раніше успішно використовували для відновлення фертильності в рослинах олійного рапсу, що містять елітну подію MS-BN1, не можливо було спрогнозувати чи можна використовувати RF-BN1 для відновлення фертильності в рослинах олійного рапсу, що містять MS-B2. Різна чоловіча стерильність, що містить елітні події, має різні рівні експресії продукту барнази, експресованого трансгенним геном чоловічої стерильності, а тому було неможливо спрогнозувати, що рівні інгібітора барнази, барстар, одержаного за допомогою трансгенного гена відновлення фертильності, в RF-BN1 відповідатимуть експресії барнази в інших окремих подіях чоловічої стерильності. Як зазначено у прикладах нижче, поєднання за даним винаходом дозволяє досягти значно більшого врожаю, ніж при поєднанні тієї ж події чоловічої стерильності MS-B2 з іншими подіями відновлення фертильності.

Більш того, як описано вище, RF-BN1 розташована на С геномі (див. WO 01/31042; див. також, наприклад, [www.agbios.com/dbase.php?action=showProd&data=MS8xRF3](http://www.agbios.com/dbase.php?action=showProd&data=MS8xRF3)). Відповідно, введення RF-BN1 з *B. napus* (aacc) у *B. juncea* (aabb), що не містить С геном, не буде розглядатись спеціалістом в даній галузі однозначно. Однак, матеріали даної заявки передбачають, що RF-BN1 розташовують на А геномі, що дозволяє введення в *B. juncea* шляхом схрещування.

Крім того, польові випробування показали, що присутність MS-B2 збільшує середній врожай (врожай зерна), якщо порівнювати його з ізогенною лінією рослин, що не містять MS-B2.

Таким чином, в одному варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб одержання гібридного насіння з рослин олійного рапсу, такого як *Brassica napus* або *Brassicajuncea*, що включає стадії:

- забезпечення материнської особини рослини олійного рапсу з чоловічою стерильністю, яка містить елітну подію MS-B2, що містить ген чоловічої стерильності;
- забезпечення батьківської особини рослини олійного рапсу з чоловічою фертильністю, що містить елітну подію RF-BN1, що містить ген відновлення фертильності, переважно в гомозиготній формі;
- забезпечення запилення вказаної материнської особини рослини олійного рапсу пилом вказаної батьківської особини рослини олійного рапсу;
- збирання врожаю гібридного насіння зі вказаної материнської особини рослини. Як він тут використовується, термін «ген» стосується будь-якої послідовності ДНК, що містить декілька функціонально пов'язаних фрагментів ДНК, таких як промотор та нетрансльовану ділянку 5' (5' НТД), яка разом з промоторною ділянкою, кодуючою ділянкою (яка може кодувати або не кодувати білок) та нетрансльовану ділянку 3' (3' НТД), що містить сайт поліаденілювання. Зазвичай в клітинах рослин 5' НТД, кодуючи ділянка та 3' НТД транскрибуються в РНК, що у випадку гена, який кодує білок, трансклюється в білок. Ген може містити додаткові фрагменти ДНК, такі як, наприклад, інтрони. Як він тут використовується, генетичний локус - це позиція наданого гена в геномі рослини.

Термін «химерний», коли він стосується гена або послідовності ДНК, використовується для того, щоб зазначити, що ген або послідовність ДНК містить принаймні два функціонально релевантні фрагменти ДНК (такі як промотори, 5' НТД, кодуюча ділянка, 3' НТД, інтрон), що зазвичай не стосуються один одного та походять, наприклад, з різних джерел. Термін «чужий», коли він стосується гена або послідовності ДНК відносно різновиду рослин, використовують для того, щоб показати, що ген або послідовність ДНК не має місце в природі, ані самого різновиду рослин, ані в генетичному локусі різновиду. Термін «чужа ДНК» буде використовуватись тут як така, що стосується послідовності ДНК, коли вона включена в геном рослини в результаті трансформації. Як він тут використовується, термін «трансформуюча ДНК» стосується рекомбінантної молекули ДНК, що використовується для трансформації. Трансформуюча ДНК зазвичай містить принаймні один «ген, що представляє інтерес» (наприклад, химерний ген), здатний забезпечувати трансформовану рослину однією або більше специфічною характеристикою. Термін «рекомбінантна молекула ДНК» використовується в якості прикладу і, таким чином, може включати ізольовану молекулу нуклеїнової кислоти, що може бути ДНК і може бути одержаною за допомогою рекомбінантних або інших процесів.

Використовуваний тут термін «трансген» стосується гена, що представляє інтерес, включеного в геном рослини. Термін «трансгенна рослина» стосується рослини, що містить принаймні один трансген в геномі усіх її клітин.

Чужа ДНК, присутня в рослинах за даним винаходом, переважно матиме два гена, що представляють інтерес, конкретніше - або ген чоловічої стерильності та ген стійкості до гербіцидів, або ген відновлення фертильності та ген стійкості до гербіцидів.

Як він тут використовується, термін «ген чоловічої стерильності» стосується гена, який під час експресії в рослині відтворює рослину, що нездатна створювати фертильний, життєдайний пилок. Прикладом гена чоловічої стерильності є ген, що містить послідовність ДНК, яка кодує барназу, під контролем промотора, що спрямовує експресію в клітинах тапетума. Конкретніше, відповідно до даного винаходу, геном чоловічої стерильності є «ТА29-барназа», описана в матеріалах даної заявки.

Як він тут використовується, термін «ген відновлення фертильності» стосується гена, який під час експресії в рослині, що містить ген чоловічої стерильності, здатний перешкоджати фенотипній експресії гена чоловічої експресії, відновлюючи фертильність в рослині. Конкретніше, вказаний ген відновлення фертильності міститиме ДНК, що кодує білок або поліпептид, здатний попереджати фенотипну експресію гена чоловічої стерильності, під контролем промотора, що спрямовує експресію принаймні в клітини, в яких експресується ДНК з чоловічою стерильністю. Більш конкретно, відповідно до даного винаходу, геном відновлення фертильності є «ТА29-барстар», описаний в матеріалах даної заявки.

Включення рекомбінантної молекули ДНК в геном рослини зазвичай спричиняється трансформацією клітини або тканини (або іншою генетичною маніпуляцією). Конкретний сайт включення визначається випадково або знаходиться в попередньо визначеному положенні (якщо використовується процес спрямованої інтеграції).

Чужа ДНК може характеризуватись місцем та конфігурацією в сайті включення рекомбінантної молекули ДНК в геном рослини. Сайт в геномі рослини, куди було вставлено

рекомбінантну ДНК, також називають «сайтом вставки» або «цільовим сайтом». Вставка трансгена в геном рослини може бути пов'язана з делецією ДНК рослини, що має назву «делеція в цільовому сайті». Термін «фланкуюча ділянка» або «фланкуюча послідовність», як він тут використовується, стосується послідовності, що становить принаймні 20 bp, переважно принаймні 50 bp та до 5000 bp генома рослини, розташованої або безпосередньо вище та суміжно або безпосередньо нижче та суміжно з чужою ДНК. Процеси трансформації, що ведуть до випадкової інтеграції чужої ДНК, призведуть до утворення трансформантів з різними фланкуючими ділянками, особливими та унікальними для кожного трансформанта. Якщо трансген вводять в рослину за допомогою традиційного схрещування, його сайт вставки в геном рослини, або його фланкуюча ділянка зазвичай не змінюються. Як він тут використовується, термін «ділянка вставки» стосується ділянки, що відповідає ділянці, яка становить принаймні 40 bp, переважно принаймні 100 bp, та навіть вище 10000 bp, охопленої верхньою та нижньою фланкуючими ділянками трансгена в (нетрансформованому) геномі рослини, та включає сайт вставки (та можливу делецію в цільовому сайті). Беручи до уваги незначні відмінності спричинені мутаціями в межах різновиду, ділянка вставки зберігатиме принаймні 85 %, краще 90 %, ще краще 95 % та найкраще 100 % ідентичність послідовності з послідовністю, що містить верхню та нижню фланкуючі ділянки чужої ДНК в наданій рослині того різновиду.

Експресія гена, що становить інтерес, стосується того факту, що ген забезпечує одне або більше фенотипне випробування (наприклад, толерантність до гербіциду) на рослині, що, як передбачалось, забезпечуватиметься шляхом введення рекомбінантної молекули ДНК - трансформуючої ДНК - що використовується впродовж трансформації (на основі структури та функції частини або всіх генів, що становлять інтерес).

Термін «подія» визначають як (штучний) генетичний локус, що в результаті генетичної маніпуляції, несе чужу ДНК, що містить принаймні одну копію гена(ів), що становить інтерес. Звичайними аллельними станами події є наявність або відсутність чужої ДНК. Як вони тут використовуються, терміни подія «MS» та подія «RF» стосуються подій, що несуть відповідно трансгени «TA29-барназу» та «TA29-барстар». Подія фенотипно характеризується експресією одного або більше трансгенів. На генетичному рівні подія є частиною генетичної моделі рослини. На молекулярному рівні подія характеризується рестрикційною картою (наприклад, як визначено Саузерн-блоттингом) та/або верхніми та/або нижніми фланкуючими послідовностями трансгена, та/або молекулярною конфігурацією трансгена. Зазвичай трансформація рослини за допомогою трансформуючої ДНК, яка містить принаймні один ген, що становить інтерес, призводить до утворення великої кількості подій, кожна з яких є унікальною.

Як він тут використовується, термін «елітна подія» є подією, що вибирається з групи подій, одержаних шляхом трансформації тією ж трансформуючою ДНК або шляхом зворотнього схрещування з рослинами, одержаними в результаті такої трансформації, на основі експресії та стабільності трансгена та його сумісності з оптимальними агрономічними характеристиками рослини, що його містить. Таким чином, критерієм відбору елітної події є один або більше, переважно два або більше, краще всі з наступних:

а) наявність трансгена не пригнічує інші необхідні характеристики рослини, такі, що стосуються агрономічної поведінки або комерційної цінності рослини;

б) подія характеризується добре визначеною молекулярною конфігурацією, що постійно унаслідковується, та для якої, з метою визначення контролю, можна розробити придатні інструменти діагностики;

с) ген(и), що становить інтерес, демонструє в трансгені правильну, придатну та стабільну просторову та тимчасову фенотипну експресію, як в гетерозиготних (або гемізиготних), так і в гомозиготних умовах події, за комерційно прийнятого рівня в діапазоні умов навколишнього середовища, в яких рослини, що несуть подію, схоже розкриваються при звичайному (нормальному) агрономічному використанні.

Краще, якщо чужа ДНК пов'язана з позицією в геномі рослини, що забезпечує інтрогресію в необхідні комерційні фонові генотипи.

Статус події як елітної підтверджується інтрогресією вказаної елітної події в різні релевантні фонові генотипи та спостереженні відповідності одному, двом або всім критеріям, наприклад, вищезазначеним критеріям а), б) та с).

Крім того, для трансгенів, що кодують чоловічу стерильність та відновлення фертильності, описаних в даній заявці, вибір елітних подій також визначається з огляду на сумісність між цими подіями, а конкретніше, з огляду на те, що потомства, що з'являються завдяки схрещуванню рослини, що несе подію чоловічої стерильності, з рослиною, що несе подію відновлення фертильності, де обидві наявні події мають такі характеристики:

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

та

б) фенотипну експресію при комерційно доступному рівні в такому діапазоні умов навколишнього середовища, в якому рослини, що несуть дві події, схоже розкриваються при звичайному (нормальному) агрономічному використанні.

Таким чином, «елітна подія» стосується генетичного локуса, що містить трансген, який відповідає вищенаведеним критеріям. Рослина, рослинний матеріал або потомство, таке як насіння, можуть містити одну або більше елітних подій в своєму геномі.

Елітна подія MS-B2 детально охарактеризована відповідно до того як її описано в WO 01/31042 (див., зокрема, приклади 1 та 3). Трансформуюча ДНК описана в прикладі 1. Фланкуючі послідовності ДНК рослини після вставки трансгена ізолюють та ідентифікують (див WO 01/31042, зокрема приклади 3.2 та SEQ ID No 1 та 2). Діагностична ПЛР, що дозволяє ідентифікувати елітну подію MS-B2 в біологічному матеріалі, також описана в WO 01/31042, зокрема в прикладі 5. Якщо в рослинах, клітинах, насінні або тканинах *Brassica* присутня елітна подія MS-B2, їх геномний ДНК можна використовувати для розширення фрагмента ДНК, що становить 160-200 bp, зокрема приблизно 183 bp, застосовуючи полімеразну ланцюгову реакцію з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID No 3 та SEQ ID No 4, відповідно. Еталонне насіння задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-850 або PTA-2485. Альтернативною назвою елітної події MS-B2 є MS11.

Елітна подія RF-BN1 детально охарактеризована відповідно до того як її описано в WO 01/41558 (див. зокрема приклади 1b та 4.2.2). Трансформуюча ДНК описана в прикладі 1b. Фланкуючі послідовності ДНК рослини після вставки трансгена ізолюють та ідентифікують (див WO 01/31042, зокрема приклади 4.2.2 та SEQ ID No 5 та 6). Діагностична ПЛР, що дозволяє ідентифікувати елітну подію RF-BN1 в біологічному матеріалі, також описана в WO 01/41558, зокрема в прикладі 5.2. Якщо в рослинах, клітинах, насінні або тканинах *Brassica* присутня елітна подія RF-BN1, їх геномний ДНК можна використовувати для розширення фрагмента ДНК, що становить 195-235 bp, зокрема приблизно 215 bp, застосовуючи полімеразну ланцюгову реакцію з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID No 7 та SEQ ID No 8, відповідно. Еталонне насіння задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730. Альтернативними назвами події RF-BN1 є RF3 або ACS-BN003-6.

Рослини, що містять RF-BN1 або MS-B2, можуть бути одержані, наприклад, з насіння, депонованого в ATCC. Такі рослини можуть далі розмножуватись та/або застосовуватись в звичайній схемі виведення з метою введення елітної події за винаходом в інші сорти аналогічних різновидів рослин. Депоноване насіння належить до різновидів *Brassica napus*. Тим не менш, способи введення алелів або трансгенів, розташованих на А-геномі від *B. napus* до *B. juncea* добре відомі в рівні техніки та включають повторне зворотнього схрещування.

Винахід вперше пропонує рослини, насіння, клітини та тканини *B. juncea*, які містять в своїх ядерних геномах елітну подію RF-BN1, що містить геном відновлення фертильності. Раніше в доступній інформації зазначалось, що елітна подія RF-BN1 присутня на С геномі; однак, згідно інформації, розкритій в даній заявці, вставка RF-BN1 міститься в А геномі, що забезпечує перенесення елітної події до *B. juncea*.

Рослини *Brassica*, що містять MS-B2 та/або RF-BN1, також характеризуються своєю толерантністю до глюфосинату, що в контексті даного винаходу означає те, що рослини є толерантними до гербіциду Liberty™. Толерантність до Liberty™ визначається тим критерієм, що обприскування листя рослин в 3-4 стадії (3V-4V) принаймні 200 г активного інгредієнта на гектар (г.а.і./га), переважно 400 г.а.і./га та можливо до 1600 г.а.і./га, не вбиває рослини. Згідно з дослідженнями ПАТ, рослини, що містять MS-B2 та/або RF-BN1 можуть додатково характеризуватись наявністю в своїх клітинах фосфінотріцин ацетил трансферази (De Block et al, 1987, EMBO J. 6: 2513-2518).

Рослини *Brassica* за даним винаходом можна вирощувати традиційним способом. Наявність гена 35S-bar гарантує те, що вони є толерантними до глюфосинату. Таким чином, бур'ян на полях, де вирощують такі рослини *Brassica*, можна контролювати шляхом застосування гербіцидів, що містять глюфосинат в якості активнаого інгредієнта (таких як, Liberty™).

Польові випробування додатково показали, що присутність MS-B2 в рослинах *Brassica* забезпечує збільшення врожаю насіння або зерна, порівняно з ізогенною лінією рослин без MS-B2. Відповідно, варіантом здійснення даного винаходу є спосіб збільшення врожаю насіння в рослинах олійного рапсу, що включає стадію забезпечення рослини олійного рапсу елітною MS-B2.



Згідно з формулою винаходу нижче, поки чітко не вказано інше, термін «рослина» призначений охоплювати тканини рослин на будь-якій стадії зрілості, а також будь-які клітини, тканини або органи, взяті з або, що походять від будь-якої такої рослини, включаючи без обмежень, будь-яке насіння, листя, стебло, квітки, коріння, одинокі клітини, гамети, культури клітин, культури тканин або протопласти. Клітини рослин, як вони тут використовуються, охоплюють клітини рослин, що не регенеруються.

Термін рослини «*Brassica*», як він тут використовується, стосується рослин сімейства *Brassicaceae*, переважно рослин, що містять А геном. Переважно, рослина *Brassica* належатиме до одного з різновидів *Brassica napus*, *Brassica rapa* (або *campestris*), або *Brassica juncea*. Альтернативно, вказана рослина може належати до різновидів, що виникли в результаті перехресного запилення цих різновидів *Brassica*, таких як *B. napocampestris* або штучного схрещування одного з цих різновидів *Brassica* з іншими різновидами *Cruciferaeae*. Як він тут використовується, термін «олійна рослина» стосується будь-якого різновиду *Brassica napus*, *Brassica rapa* (або *campestris*) або *Brassica juncea*.

Олійні рослини за винаходом також можуть обробляти гербіцидами, включаючи Клопіралід, Диклофоп, Флуазифоп, Глюфосинат, Гліфосат, Метазаклор, Трифлуралін, Етаметсульфурон, Квінмерак, Квізалофоп, Клетодим, Тепралоксидим; фунгіцидами включаючи Азоксистробін, Карбендазим, Флудиоксоніл, Іпродіон, Прохлораз, Вінклозолін або інсектицидами, включаючи Карбофуран, Органофосфати, Піретроїди, Тіаклоприд, Делтаметрин, Імідаклоприд, Клотіанідин, Тіаметоксам, Ацетаміприд, Динетофуран, бета-Цифлутрин, гама- та лямбда- Цигалотрин, тау-Флувалеріат, Етипрол, Спіносад, Спіноторам, Флубендіамід, Ринаксіпір, Ціазіпір або 4-[[6-хлорпіридин-3-іл)метил](2,2-дифторетил)аміно]фуран-2(5H)-он.

Як він тут використовується, термін «що містить» повинен розглядатись як такий, що уточнює наявність наведених ознак, систем, стадій або компонентів, яких вони стосуються, але не попереджує наявність або додавання однієї або більше їх ознак, систем, стадій або компонентів, або груп. Таким чином, наприклад, нуклеїнова кислота або білок, що містить послідовність нуклеотидів або амінокислот, може містити більше нуклеотидів або амінокислот, ніж фактично зазначено, тобто, бути вбудованими в більшу нуклеїнову кислоту або білок. Химерний ген, що містить послідовність ДНК, яка функціонально або структурно визначена, може містити додаткові послідовності ДНК, і т.д.

Наступні приклади описують характеристики рослин олійного рапсу, що мають елітні події MS-B2 та RF-BN1.

Поки не вказано інше, всі методики з рекомбінантною ДНК здійснюють згідно зі стандартними протоколами, описаними в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY та в томах 1 та 2 Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Стандарти матеріали та способи для роботи з рослинами на молекулярному рівні описані R.D.D. Croy в роботі *Plant Molecular Biology Labfax* (1993), опублікованій BIOS Scientific Publications Ltd (UK) та Blackwell Scientific Publications, UK.

В описі та прикладах є посилання на такі послідовності:

SEQ ID No 1:	5' фланкуюча послідовність MS-B2
SEQ ID No 2:	3' фланкуюча послідовність MS-B2
SEQ ID No 3:	олігонуклеотидний праймер 1 для детекції MS-B2
SEQ ID No 4:	олігонуклеотидний праймер 2 для детекції MS-B2
SEQ ID No 5:	5' фланкуюча послідовність RF-BN1
SEQ ID No 6:	3' фланкуюча послідовність RF-BN1
SEQ ID No 7:	олігонуклеотидний праймер 1 для детекції RF-BN1
SEQ ID No 8:	олігонуклеотидний праймер 2 для детекції RF-BN1
SEQ ID No 9:	плазмідний рTHW118
SEQ ID No 10:	плазмідний рTCO113

Вищенаведений опис винаходу призначений для ілюстрації, а не обмеження. Різноманітні зміни або модифікації в описаних варіантах здійснення можуть бути здійснені фахівцем в даній галузі без відходження від суті або об'єму винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Короткий опис MS-B2 та RF-BN1

##### 1.1. Елітна подія MS-B2

Елітна подія MS-B2 була одержана шляхом опосередкованої агробактеріями трансформації рослин *B. napus* з химерною ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотора тапетума (рTCO113).

- Плазмідний рTCO113 по-суті походив від проміжного вектора рGSV1. Сам вектор рGSV1 походить від рGSC1700 (Cornelissen and Vandewielle, 1989), але містить штучну Т-ділянку, що складається з лівої та правої граничних послідовностей TL-ДНК з рТіВ6S3 та клонуючі сайти з мультилінкерами, що забезпечують вставку химерних генів між граничними повторами Т-ДНК.
- 5 Вектор рGSV1 має ген барстар на основі плазміді з регуляторними сигналами для експресії в *E. coli*.

Повний опис ДНК, що міститься між граничними повторами рTCO113, наведений в Таблиці 1 (SEQ ID No 10):

Таблиця 1. Нуклеотидні позиції ДНК, що містяться між граничними повторами T-ДНК рТСО113

Нуклеотидні позиції	Орієнтація	Опис та посилання
1-25		Правий граничний повтор від TL-ДНК з рТiB6S3 (Gielen <i>et al.</i> (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).
26-53		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
54-90		Залишкова послідовність з TL-ДНК в правому граничному повторі
91-97		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
309-98	Проти годинникової стрілки	Нетрансльований кінець 3' з гена TL-ДНК 7 (3'g7) рТiB6S3 (Velten and Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese <i>et al.</i> (1983) The EMBO Journal 3: 835-846).
310-331		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
883-332	Проти годинникової стрілки	Кодуюча послідовність гена стійкості до білафосу ( <i>bar</i> ) <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson <i>et al.</i> (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). N-термінальні два кодони кодуючої ділянки дикого типу <i>bar</i> замінені кодонами ATG та GAC, відповідно.
2609-884	Проти годинникової стрілки	Промотор з гена маленької субчастинки atS1A рибулозо-1,5-біфосфаткарбоксилази з <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbers <i>et al.</i> (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759).
2610-2659		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
2920-2660	Проти годинникової стрілки	Фрагмент 260 bp TaqI з нетрансльованого кінця 3' гена синтази нопаліна (3'nos) з T-ДНК рТiТ37 та такий, що містить сигнали поліаденілювання рослини (Depicker <i>et al.</i> (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573).
2921-2936		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
3032-2937		Нетрансльована ділянка 3' нижче від <i>барнази</i> , що кодує послідовність <i>B. amyloliquefaciens</i>
3368-3033	Проти годинникової стрілки	Кодуюча ділянка гена <i>барнази</i> з <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202: 913-915).
4878-3369	Проти годинникової стрілки	Ділянка промотора специфічного до пиляків гена TA29 з <i>Nicotiana tabacum</i> . Промотор містить 1,5 kb послідовності вище початкового кодона ATG (Seurinck <i>et al.</i> (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403).
4879-4924		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
4925-5215	За	Промотор гена синтази нопаліна з T-ДНК рТiТ37

	годинниковою стрілкою	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (PNos). Нуклеотидна послідовність промотора PNos описана Depicker <i>et al...</i> (1982) в Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.
5216-5217		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
5218-5490	За годинниковою стрілкою	Кодуюча ділянка гена барстар <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202: 913-915).
5491-5530		Послідовність з нетрансльованого кінця 3' гена барстар <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
5531-5554		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
5555-5766	За годинниковою стрілкою	Нетрансльований кінець 3' гена TL-ДНК 7 (3'г7) TiB6S3 (Velten and Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese <i>et al...</i> (1983) The EMBO Journal 3: 835-846).
5767-5773		Послідовність, що походить від синтетичного полілінкера
5774-5810		Залишкові послідовності з TL-ДНК в правому граничному повторі
5811-5840		Послідовність, що походить від синтетичного полілінкера
5841-5865		Лівий граничний повтор від TL-ДНК з pTiB6S3 (Gielen <i>et al..</i> (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).

Фланкуючі послідовності виділяли відповідно до того, як описано в WO 01/31042.

Права фланкуюча ділянка (5')

- 5 Фланкуючу ділянку 5' розширили як са. фрагмент 415 bp, повна послідовність якого була визначена (SEQ ID No 1). Послідовність між нуклеотидом 1 і 234 відповідає ДНК рослини, а послідовність між нуклеотидом 235 і 415 - Т-ДНК.

Ліва фланкуюча ділянка (3')

- 10 Вказану фланкуючу ділянку 3' розширили як са. фрагмент 416 bp, повна послідовність якого була визначена (SEQ ID No 2). Послідовність між нуклеотидом 1 і 193 відповідає Т-ДНК, а послідовність між нуклеотидом 194 та 416-ДНК рослини.

Ідентифікація MS-B2 за допомогою ПЛР

Відповідно до WO 01/31042, MS-B2, що містить біологічний матеріал, може бути ідентифікована застосовуючи описаний в документі протокол ідентифікації за допомогою ПЛР.

- 15 Наступні праймери, що специфічно розпізнають чужу ДНК та фланкуючу послідовність MS-B2, можуть бути застосовані:

B01: 5'-gAA.ATC.CAT.gTA.AAg.CAg.CAg.gg-3' (SEQ ID No. 3)

(ціль: ДНК рослини)

B02: 5'-gCT.Tgg.ACT.ATA.ATA.CTT.gAC-3' (SEQ ID No. 4)

(ціль: Т-ДНК)

Очікуваними розширеними фрагментами реакції ПЛР є:

- 20 для пари праймерів B01-B02 183 bp (елітна подія MS-B2)

1.2. Елітна подія RF-BN1

Елітна подія RF-BN1 була одержана шляхом опосередкованої агробактеріями трансформації рослин В. парус з химерною ДНК, що містить ген барнази під контролем промотора TA29 (pTHW118).

Плазмідний рTHW118 також по-суті походив від проміжного вектора рGSV1 (описаного вище). Повний опис ДНК, що міститься між граничними повторами рTHW118 наведений в таблиці 2 (SEQ ID No. 9).

Таблиця 2. Т-ДНК плазмідного рTHW118

Нуклеотидні позиції	Орієнтація	Опис та посилання
1-25		Правий граничний повтор від TL-ДНК з рTiB6S3 (Gielen <i>et al</i> (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).
26-53		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
54-90		Залишкова послідовність з TL-ДНК в правому граничному повторі
91-97		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
309-98	Проти часової стрілки	Нетрансльований кінець 3' з гена TL-ДНК 7 (3'r7) рTiB6S3 (Velten and Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998; Dhaese <i>et al.</i> (1983) The EMBO Journal 3: 835-846).
310-330		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
883-331	Проти часової стрілки	Кодуюча послідовність гена стійкості до біалафосу ( <i>bar</i> ) <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson <i>et al...</i> (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). N-термінальні два кодони кодуючої ділянки дикого типу <i>bar</i> замінені кодонами ATG та GAC, відповідно.
2608-883	Проти часової стрілки	Промотор з гена маленької субчастинки atS1A рибулозо-1,5-біфосфаткарбоксилази з <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbers <i>et al...</i> (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759).
2609-2658		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
2919-2659	Проти часової стрілки	Фрагмент 260 bp TaqI з нетрансльованого кінця 3' гена синтази нопаліна (3'nos) з Т-ДНК рTiT37 та такий, що містить сигнали поліаденілювання рослини (Depicker <i>et al...</i> (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573).
2920-2940		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
2941-2980		Нетрансльована ділянка 3' нижче від <i>барстар</i> , що кодує послідовність <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
3253-2981	Проти часової стрілки	Кодуюча ділянка гена <i>барстар</i> з <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202: 913-915).
4762-3254	Проти часової стрілки	Ділянка промотора специфічного до пиляків гена TA29 з <i>Nicotiana tabacum</i> . Промотор містить 1,5 kb послідовності вище початкового кодона ATG (Seurinck <i>et al...</i> (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403).
4763-4807		Послідовності, що походять від синтетичного полілінкера
4808-4832		Лівий граничний повтор від TL-ДНК з рTiB6S3 (Gielen <i>et al</i> (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).

Фланкуючі послідовності виділяли відповідно до того, як описано в WO 01/41558.

Права фланкуюча ділянка (5')

Фланкуючу ділянку 5' розширили як са. фрагмент 1077 bp, повна послідовність якого була визначена (SEQ ID No 5). Послідовність між нуклеотидом 1 і 881 відповідає ДНК рослини, а послідовність між нуклеотидом 882 і 1077 - Т-ДНК.

Ліва фланкуюча ділянка (3')

Вказану фланкуючу ділянку 3' розширили як са. фрагмент 1500 bp, повна послідовність якого була визначена (SEQ ID No 6). Послідовність між нуклеотидом 1 та 166 відповідає Т-ДНК, а послідовність між нуклеотидом 167 та 1441 -ДНК рослини.

Ідентифікація RF-BN1 за допомогою ПЛР

- 5 Відповідно до WO 01/41558, RF-BN1, що містить біологічний матеріал, може бути ідентифікована застосовуючи описаний в документі протокол ідентифікації за допомогою ПЛР.

Для того, щоб ідентифікувати матеріал рослини, що містить RF-BN1, використовують наступні праймери, що специфічно розпізнають трансген і фланкуючу послідовність RF-BN1:

BNA03: 5'-TCA.TCT.ACg.gCA.ATg.TAC.CAg-3' (SEQ ID 7)  
(ціль: трансген)

BNA04: 5'-Tgg.ACC.CCT.Agg.TAA.ATg.CC-3' (SEQ ID 8)  
(ціль: ДНК рослини)

Очікуваними розширеними фрагментами реакції ПЛР є:

Для пари праймерів BNA03-BNA04: 215 bp (елітна подія RF-BN1)

- 10 Приклад 2. Ідентифікація генома, на якому розташований локус RF-BN1, та введення в *Brassica juncea*

- Для того, щоб визначити де знаходиться локус RF-BN1 - чи на А геномі, чи на С геномі *Brassica napus* - проаналізували спільне успадкування або зчеплення RF-BN1 з відомими маркерами на геномі *Brassica* в 4 різних популяціях *B. napus* BC1, що розщеплюються, одержаних в результаті схрещування донорської лінії, що містить трансген RF-BN1 в гомозиготному стані, з рекурентною батьківською особиною, що не містить трансгена. Для утворення генетичних маркерів використовували спосіб поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP). Аналіз AFLP адаптували від Vos et al. (1995, NAR 23:4407-4414, EP0534858 та US 6,045,994). Для того, щоб ідентифікувати зв'язані з RF-BN1 маркери AFLP, здійснювали масовий сегрегаційний аналіз (BSA) відповідно до Michelmores et al. (1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828-9823).

- Усі генетичні маркери AFLP, що показали різну ампліфікацію між пулами RF-BN1 позитивних рослин (що містять видимий маркер AFLP) та RF-BN1 негативних рослин (де аналогічний маркер є невидимим) були проаналізовані на принаймні 46 окремих зразках популяції BC1, де вказаний маркер AFLP при проведенні аналізу BSA показав потенційне зчеплення. Залишили лише ті маркери, що показали значну косегрегацію з маркером RF-BN1 ПЛР, потенційні інші маркери, що не відповідали цьому критерію, були відкинуті з аналізу BSA як псевдо позитивні. Аналіз груп зчеплення здійснювали використовуючи версію Joinmap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips (2001) JoinMap Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps, Plant Research International, Wageningen, The Netherlands), застосовуючи дані, одержані від маркерів AFLP, які залишили, та дані щодо маркерів RF-BN1 ПЛР, що виникли на окремих рослинах для кожної популяції BC1 окремо. Оскільки 4 окремі карти навколо локуса RF-BN1 показали багато спільного, ці 4 карти BC1 можна було поєднати в одну карту, що показувала б ділянку навколо локуса RF-BN1, із застосуванням аналогічного програмного забезпечення, уможливорюючи місцеву локалізацію локуса RF-BN1.

- Потім одержану місцеву карту ділянки RF-BN1 порівнювали з генетичною еталонною картою, що представляє всі хромосоми *B. napus*. Для такої хромосомної карти вже були визначені номери хромосом відповідно до Sharpe et al. (1995, Genome 38:112-1121) та Parkin et al. (1995, Genome 38:1122-1131). N01-N10 є А геномними хромосомами, а N11-N19 - С геномними. Було виявлено дуже чіткий взаємозв'язок між картою ділянки RF-BN1 та хромосомою N07 еталонної карти, яка, як відомо, є А геномною хромосомою. RF-BN1 розміщена на А геномі *B. napus*.

- Подію RF-BN1 вводили за допомогою повторного зворотнього схрещування різновидів рослин Drakkar, що містять подію RF-BN1, в таку культуру як *Brassica juncea*.

- 45 Через принаймні 4 покоління прискорених зворотніх схрещувань рослини *B. juncea* проаналізували і виявили, що:

а) Наявність чужих ДНК не послаблювала інші необхідні характеристики рослини, такі як ті, що стосуються її агрономічної поведінки або комерційної цінності;

б) подія характеризувалася добре визначеною молекулярною конфігурацією, що постійно унаслідувалась; та

с) ген(и), що становить інтерес, в чужому ДНК демонстрував правильну, придатну та стабільну просторову та тимчасову фенотипну експресію, як в гетерозиготних (або гемізиготних), так і в гомозиготних умовах події, за комерційно прийнятного рівня в діапазоні умов навколишнього середовища, в яких рослини, що несуть подію, схоже розкриваються при звичайному (нормальному) агрономічному використанні. Більш того, рослини проаналізували з точки зору їхніх агрономічних характеристик та поведінки у порівнянні з різновидами дикої *Brassica juncea*.

Широкомаштабні випробування в польових умовах показали, що RF-BN1 в *Brassica juncea* призвели до одержання рослин, що показали адекватну експресію генів, що становлять інтерес, в чужих ДНК, тобто фенотип з чоловічою стерильністю, у поєднанні з оптимальними агрономічними характеристиками. Таким чином, незважаючи на те, що спочатку RF-BN1 виявили в *B. napus*, було несподівано виявлено, що вона також є в *Brassica juncea*. Більш того, RF-BN1 можна було ефективно застосовувати для відновлення фертильності в рослинах *B. juncea*, що містять MS-B2.

Приклад 3. Агрономічна поведінка рослин з MS-B2/RF-BN1

Проводили польові випробування над рослинами олійного рапсу *Brassica*, що містять події MS-B2/RF-BN1, та рослинами, що містять MS-B2 та інші події-відновлювачі, разом з ізогенними нетрансгенними контрольними перевірками. Відповідні дані щодо врожаю підсумовані в наведених нижче таблицях. Слід зауважити, що в аналіз, для обчислення середнього значення, значущості і т.д. були включені дані польових випробувань над додатковими лініями рослин.

Стане ясно, що врожай, одержаний від ліній рослин, що містять MS-B2 та RF-BN1, значно вищий від врожаю, одержаного від ліній рослин, що містять MS-B2 та інші події-відновлювачі, такі як RF-BN2.

Крім того, стане зрозуміло, що врожай, одержаний від ліній рослин, що містять MS-B2, вищий від врожаю, одержаного від ізогенних, нетрансгенних ліній рослин.

Таблиця 3. Польові випробування на географічному положенні 1

Опис варіабельності		Врожайність(9) кг	Врожайність(9) кг
Походження		Середнє значення	% перевірки
MS-B2 BC4		1458.95	102.31

Ізогенна лінія		1529.45	107.26
Ізогенна лінія		1552.57	108.88
Ізогенна лінія (75% щільність насіння)		1560.60	109.44
Ізогенна лінія (50% щільність насіння)		1560.93	109.46
Ізогенна лінія (50% щільність насіння)		1573.65	110.35
Ізогенна лінія (75% щільність насіння)		1581.22	110.89
MS-B2 BC4		1886.26	132.28
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1468.76	103.00
MS-B2 BC4 x RF-BN2		1013.52	71.08
Ms11 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1486.27	104.23
Ms11 BC4 x RF-BN2+ BC4		1017.70	71.37
Ms11 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1522.29	106.75
Ms11 BC4 x RF-BN2+ BC5		1183.72	83.01
Ms11 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1565.97	109.82
Ms11 BC4 x RF-BN2+ BC5		1172.28	82.21
<b>Середнє значення</b>		1403.99	98.46
<b>Середнє значення за перевіркою</b>		1425.99	100.00
<b>Значущість</b>		<b>**</b>	<b>**</b>
<b>P.p.d.s. 5%</b>		362.98	25.45
<b>P.p.d.s. 1%</b>		479.76	33.64
<b>P.p.e.s. 5%</b>		486.84	34.14
<b>P.p.e.s. 1%</b>		548.55	38.47
<b>C.V.</b>		20.50%	20.50%
<b>залишкове стандартне відхилення</b>		289.36	20.29
<b>проаналізовані повтори</b>		4	4

Таблиця 4. Польові випробування на географічному положенні 2

Опис варіабельності		Врожайність(9)	Врожайність (9)
		кг	кг
Походження		Середнє значення	% перевірки
MS-B2 BC4		1573.12	93.52
Ізогенна лінія (50% щільність насіння)		1671.86	99.39
Ізогенна лінія (75% щільність насіння)		1689.03	100.41
Ізогенна лінія		1692.71	100.63
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1776.16	105.59
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4		1285.16	76.40
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		1716.48	102.04
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5		1255.13	74.61
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2		1973.41	117.31
<b>Середнє значення</b>		1586.57	94.32
<b>Середнє значення за перевіркою</b>		1682.17	100.00
<b>Значущість</b>		<b>**</b>	<b>**</b>
<b>P.p.d.s. 5%</b>		186.23	11.07



<b>P.p.d.s. 1%</b>	247.68	14.72
<b>P.p.e.s. 5%</b>	274.69	16.33
<b>P.p.e.s. 1%</b>	326.83	19.43
<b>C.V.</b>	8.28%	8.28%
<b>залишкове стандартне відхилення</b>	131.68	7.83
<b>проаналізовані повтори</b>	4	4

Таблиця 5. Польові випробування на географічному положенні 3

<b>Опис варіабельності</b>		<b>VIGAB</b>	<b>Врожайність (9)</b>	<b>Врожайність (9)</b>
		<b>1-9</b>	<b>кг</b>	<b>кг</b>
<b>Варіабельний код</b>				
<b>Походження</b>		<b>Значення</b>	<b>Значення</b>	<b>% перевірки</b>
MS-B2 BC4		4.91	1914.55	102.88
MS-B2 BC4		4.94	1932.70	103.85
MS-B2 BC4		4.89	1952.49	104.92
Ізогенна лінія		7.34	1783.81	95.85
Ізогенна лінія (50% щільність насіння)		7.33	1784.18	95.87
Ізогенна лінія		7.31	1786.08	95.98
Ізогенна лінія (75% щільність насіння)		7.37	1792.20	96.30
Ізогенна лінія (50% щільність насіння)		7.33	1811.31	97.33
MS-B2 BC4		4.90	1946.01	104.57
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		5.56	2066.72	111.06
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4		5.23	1690.12	90.82
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC4		5.19	1719.02	92.37
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5		5.22	1742.14	93.61
MS-B2 BC4 x RF-BN2+ BC5		5.20	1755.62	94.34
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		5.98	1954.28	105.01
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2		6.27	1965.55	105.62
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		6.01	1996.10	107.26
MS-B2 BC4 x RF-BN1+ accBC3		5.51	2062.47	110.83
MS-B2 BC4 x RF-BN1 RF-BN1 BC5F2		5.55	1921.95	103.28
<b>Середнє значення</b>		5.93	1853.67	99.61
<b>Середнє значення за перевіркою</b>		6.91	1860.98	100.00
<b>Значущість</b>		<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>
<b>P.p.d.s. 5%</b>		0.42	140.25	7.54
<b>P.p.d.s. 1%</b>		0.55	185.37	9.96
<b>P.p.e.s. 5%</b>		0.56	188.11	10.11
<b>P.p.e.s. 1%</b>		0.63	211.95	11.39
<b>C.V.</b>		5.67%	6.17%	6.17%
<b>залишкове стандартне відхилення</b>		0.34	113.87	6.12
<b>проаналізовані повтори</b>		4	4	4

Таблиця 6. Підсумок польових випробувань

	СЕРЕДНЄ ЗНАЧЕННЯ (N=7)	
	ВРОЖАЙНІСТЬ (G)	
ПОХОДЖЕННЯ	NTR	1 APP
MS-B2 X RF-BN1	108.1%	113.7%
ІЗОГЕННА НЕТРАНСГЕННА ЛІНІЯ	100%	104.5%
MS-B2	114.1%	112.1%
RF-BN1	95.1%	92.3%
CV		
РІВЕНЬ СТАНДАРТНОГО ВІДХИЛЕННЯ		10.6%

Приклад 4. Агрономічна поведінка рослин *B. napus* з MS-B2/RF-BN1 у порівнянні з рослинами *B. napus* з MS-BN1/RF-BN1

5 Польові випробування здійснювали в 5 місцях (4 реплікації/повні ділянки) для того, щоб підтвердити відновлення та оцінити толерантність до гербіцида та агрономічну поведінку гібридів *B. napus* з MS-B2/RF-BN1 в порівнянні з гібридами, що містять MS-BN1/RF-BN1, в тому ж генетичному фоні.

10 Врожайність та активність визначали без спрею на основі глюфосинату або за допомогою одноразової (B) або дворазової (C) обробки при традиційному застосуванні глюфосинату Liberty®).

Результати підсумовані у Фігурі 1. Активність гібридів, що містять MS-B2/RF-BN1, завжди вища за активність MS-BN1/RF-BN1 - чи то без обробки (A), чи то з одноразовою обробкою (B) чи дворазовою обробкою глюфосинатом амонію.

15 В цілому, гібриди з MS-B2/RF-BN1 були схильними квітнути (починати та закінчувати) та дозрівати раніше, ніж гібриди з MS-BN1/RF-BN1.

Врожайність також визначали для польових випробувань описаного вище типу A, B, C і підсумовували результати у Фігурі 2. Гібриди з MS-B2/RF-BN1 мають на 2-5% вищий показник врожайності ніж гібриди з MS-BN1/RF-BN1.

20 Також помітили, що відновлення щодо MS-B2/RF-BN1 було повним з огляду на всі генотипи та місцезнаходження.

Як висновок, винахід спрямований на варіанти здійснення, описані в наступних пронумерованих параграфах.

1. Спосіб одержання гібридного насіння з рослин олійного рапсу, що включає стадії:

25 а. забезпечення материнської особини рослини олійного рапсу з чоловічою стерильністю, що містить елітну подію MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850;

б. забезпечення батьківської особини рослини олійного рапсу з чоловічою фертильністю, що містить елітну подію RF-BN1, переважно в гомозиготній формі, причому еталонне насіння, що 30 містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730;

с. забезпечення запилення вказаної материнської особини рослини олійного рапсу пилком вказаної батьківської особини рослини олійного рапсу;

д. збирання врожаю гібридного насіння зі вказаної материнської особини рослини.

35 2. Спосіб відповідно до параграфу 1, в якому вказані рослини олійного рапсу належать до різновидів *Brassica napus* або *Brassica juncea*.

3. Рослина олійного рапсу, що містить в своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850 та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване 40 в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

4. Рослина олійного рапсу відповідно до параграфу 3, причому вказані рослини олійного рапсу належать до різновидів *Brassica napus* або *Brassica juncea*.

5. Клітина або тканина, або насіння рослини олійного рапсу відповідно до параграфу 3.

45 6. Пара рослин олійного рапсу для застосування при одержанні гібридного насіння, де одна з вказаних рослин олійного рапсу містить елітну подію MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850, а інша з цих рослин олійного рапсу містить елітну подію RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

7. Геномна ДНК рослини олійного рапсу відповідно до параграфу 2.

8. Рослина або клітина рослини *Brassica juncea*, що містить елітну подію RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

5 9. Насіння рослини *Brassica juncea* відповідно до параграфу 5, що містить елітну подію RF-BN1, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA-730.

10 10. Рослина або клітина відповідно до параграфу 8, яка додатково містить елітну подію MS-B2, причому еталонне насіння, містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850.

11. Застосування елітної події MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850, для збільшення врожаю насіння в трансгенній рослині олійного рапсу.

15 12. Застосування відповідно до параграфу 11, в якому вказаною рослиною олійного рапсу є *Brassica juncea*.

13. Спосіб збільшення врожаю рослин олійного рапсу, що включає стадію забезпечення вказаної рослини олійного рапсу елітною подією MS-B2, причому еталонне насіння, що містить вказану елітну подію, задепоноване в ATCC під номером депонування ATCC\_PTA 2485 або ATCC\_PTA-850.

20 14. Спосіб одержання гібридного насіння та гібридних рослин *B. juncea*, що включає а. щільну посадку рослин *B. juncea*, що містять елітну подію MS-B2, з рослинами *B. juncea*, що містять елітну подію RF-BN1;

б. забезпечення перехресного запилення рослин;

с збирання врожаю насіння з рослин *B. juncea*, що містять елітну подію MS-B2.

25 15. Застосування рослини *B. juncea*, що містить елітну подію RF-BN1 для одержання потомств-рослин або насіння.

16. Застосування RF-BN1 для відновлення чоловічої фертильності по відношенню до рослини *B. juncea*, що містить MS-B2.

17. Геномна ДНК *B. juncea*, що містить RF-BN1.

30 18. Геномна ДНК відповідно до параграфу 17, що додатково містить MS-B2.

19. Клітина рослини, рослина або насіння *B. juncea*, яка містить в своєму геномі послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 5 та послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 6, що додатково містить послідовність, що кодує інгібітор барстар, між вказаними послідовностями.

35 20. Клітина рослини, рослина або насіння відповідно до параграфу 19, що додатково містить в своєму геномі послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 1 та послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 2, що додатково містить послідовність, що кодує інгібітор барнази, між вказаними послідовностями.

21. Спосіб одержання гібридного насіння та гібридних рослин *B. napus*, що включає

40 а. щільну посадку рослин *B. napus*, що містять елітну подію MS-B2, з рослинами *B. napus*, що містять елітну подію RF-BN1;

б. забезпечення перехресного запилення рослин;

с. збирання врожаю насіння з рослин *B. napus*, що містять елітну подію MS-B2.

22. Геномна ДНК *B. napus*, що містить RF-BN1, і яка додатково містить MS-B2.

45 23. Клітина рослини, рослина або насіння *B. napus*, що містить в своєму геномі послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 5 та послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 6, що додатково містить послідовність, що кодує інгібітор барстар, між вказаними послідовностями, а також послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 1 та послідовність з нуклеотидною послідовністю SEQ ID No 2,

50 що додатково містить послідовність, що кодує інгібітор барнази, між вказаними послідовностями.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; БАЙЄР КРОПСАЄНС НВ

<120> ГІБРИДНІ РОСЛИНИ *BRASSICA* ТА СПОСОБИ ЇХ ОДЕРЖАННЯ

&lt;130&gt; BCS 13-2007

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; Патент, версія 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 415

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; гранична фланкуюча ділянка 5' елітної події MS-B2

&lt;400&gt; 1

```

gtcagagtttg gtgttcatga ttttgggttt tgactcttca ccattacata ttgaaactct      60
tacggatgag aacaactcac aagcattaat catgttcata taaatatatg tacattatac      120
gtatatatac acgtatacaa atagtagcga agaaatccat gtaaagcagc agggggcacc      180
atggttttcaa gtattatata attataatta taattatggg aggatgtaca tggccgataa      240
gaaaaggcaa tttgtagatg ttaattccca tcttgaaaga aatatagttt aaatatttat      300
tgataaaata acaagtcagg tattatagtc caagcaaaaa cataaattta ttgatgcaag      360
tttaaattca gaaatatttc aataactgat tatatcagct ggtacattgc cgtag          415

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 416

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; гранична фланкуюча ділянка 3' елітної події MS-B2

&lt;400&gt; 2

```

ctacggcaat gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc      60
atcaataaaw ttatgttttt gcttggacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa      120
tattttaaact atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc ttttcttatt      180
gaccatgtac atcctaccat aattataatt ataattatat aatactgaaa ccattggtgcc      240
ccctgctgct ttacatggat ttctccgcta ctatttgtat acgtgtatat ataccgtata      300
atgtacatat atttatatga acatgattaa tgcttgtagg ttgttctcat ccgtaagagt      360
ttcaatatgt aatggtgaag agtcaaaacc caaaatcatg aacacccaaa ctcgat          416

```

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> олігонуклеотидний праймер 1 для детекції MS-B2

<400> 3  
 gaaatccatg taaagcagca ggg 23

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> олігонуклеотидний праймер 2 для детекції MS-B2

<400> 4  
 gcttggaacta taataacttga c 21

<210> 5  
 <211> 694  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> фланкуюча ділянка 5' RF-BN1

<400> 5  
 ggttttcgga ggtccgagac gagttcaaaa atacatttta cataatatat ttttcatata 60  
 tatatatata tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct 120  
 tcaccsaaaat ttatataaact aaaattttta aatcatgaac aaaaagtatg aatttgtaat 180  
 ataaatacaa agatacaaat ttttgattga aatattggta gctgtcaaaa aagtaaactct 240  
 tagaatttaa attaactata gtaaactata tattgaaaat attataaatt tttatcaaatt 300  
 tctcataaat atataaaaata aatctaactc atagcatata aaaagaagac taatgtggat 360  
 caaaatattt acagtttttt agaagtagaa tctttatagt tttattttaa atatagcaaa 420  
 aatgatcaca aacctagtta cttaaccag aagtccaatt caaaatcaaa taaaaataaa 480  
 aatctatcta aaaaaatatg ttaactacca tgcaaaagta tttttttttg taattagaaa 540  
 ccctgaaatt tgtacaaaac ttggaccctt aggtaaatgc ctttttcattc tcgcgataag 600  
 aaaaggcaat ttgtagatgt taattcccat ctgaaagaa atatagttaa aatattttatt 660  
 gataaaataa caagtcaggt attatagtcc aagc 694

<210> 6  
 <211> 1279  
 <212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> фланкуюча ділянка 3' RF-BN1

<400> 6

```

ggggggttttt ttttttgatc aataactttg ttggggcttat ggtcgataag cgtgcgcatg      60
tctgatggta catgctaaat gctatatattc tgttttaaagt gttaaaatca ttttctgatg      120
gaactaaatc cagttttaag agtaactgac aagtacaatt aagcacaaca ataaaatagt      180
agtaattggc atctttgatt gttaaatatc aaacaataaa gttcaaaaaa aaataccaac      240
ccaataatga agacttggcg gagacagtgc cgtgcgaagg ttttcggagg tccgagacga      300
gttcaaaaat acattttaca taatatattt ttcatatata tatatatata taacattcaa      360
aagtttgaat tattacataa acgtttttcta aattttcttc accaaaattt tataaactaa      420
aatttttaaa tcatgaacaa aaagtatgaa ttgtaatat aaatacaaag atacaaattt      480
ttgattgaaa tatttggtagc tgtcaaaaaa gtaaatctta gaatttaaat taactatagt      540
aaactatata ttgaaaatat tataaatttt tatcaaatc tcataaatat ataaaataaa      600
tctaactcat agcatataaa aagaagacta atgtggatca aaatatctac agtttttttag      660
aagtagaatc tttatagttt tttttaaaat atagcaaaaa tgatcacaaa cctagttact      720
ttaaccagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaaa tctatctaaa aaaatatggt      780
aactaccatg caaaagtatt tttttttgta attagaaacc ctgaaatttg taaaaaactt      840
ggacccttag gtaaattccc tagaaagtat cctattagcg tcgacaaaact gttgctcata      900
tttttctctc cttactttat atcatacact aatataaaaa gatgatctaa ttaattattc      960
atttccatgc tagctaattc aagaaaaaga aaaaaaactt attatctaaa cttatattcg      1020
agcaacacct cggagataac aggatatatg tcattaatga atgcttgaac tcatctcgcg      1080
aactcatctc gcatcgctta tagccacaaa gatccaaccc ctctcttcaa tcatatatca      1140
gtagtacaat acaaatagat attgtgagca catatgccgt ctagtactga tgtgtatatg      1200
tagaggagcc gcaaagtgtt agtcaactcca acaaatgagc atgaccacgc atcttctgat      1260
gatgtacagc cgtccctttt                                     1279

```

<210> 7

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 1 для детекції RF-BN1

<400> 7

tcactctacgg caatgtacca g 21

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Штучина

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 2 для детекції RF-BN1

<400> 8

tggaccscta ggtaaagcc

20

<210> 9  
 <211> 4832  
 <212> ДНК  
 <213> Штучина

<220>

<223> Плазміда рТНВ118

<400> 9

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg	60
gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccac ttgaaagaaa tatagtttaa	120
atattttattg ataaaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaattttatt	180
gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg	240
tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt	300
agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg	360
gggcgggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccggtg	420
cttgaagccg gccgcccga gcatgcgcg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg	480
cacgctcggg tcgttgggga gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc	540
cagggacttc agcagggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg	600
ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgctgacct tccagggggc	660
cgcgtaggcg atgccggcga cctcgcgcgc cacctcggcg acgagccagg gatagcgctc	720
ccgcagacgg acgaggctgt ccgtccactc ctgcgggtcc tgcggctcgg tacggaagtt	780
gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatgggtgag accgccggca tgtccgcctc	840
ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgtcg ttctgggtcc attgttcttc tttactcttt	900
gtgtgactga ggtttggtct agtgctttgg tcatctatat ataagataa caacaatgag	960
aacaagcttt ggagtgatcg gagggctcag gatacatgag attcaagtgg actaggatct	1020
acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca	1080
aaggcctaag gagagggtgt gagaccctta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt	1140

ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aattgtgtga tgggtggagtg 1200  
 gtgcttgctc attttacttg cctgggtggac ttggcccttt ccttatgggg aatttatatt 1260  
 ttacttacta tagagctttc ataccttttt ttaccttgg atttagttaa tatataatgg 1320  
 tatgattcat gaataaaaat gggaaatfff tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta 1380  
 ggtgaaactg tggaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgcct tttactagaa 1440  
 ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa 1500  
 acagaactat gtttaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt 1560  
 tacaacaagt cataagccca acaagtttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa 1620  
 aatattacaa atcataagcc caacaaagtt attgatcaaa aaaaaaaaaac gcccaacaaa 1680  
 gctaaacaaa gtccaaaaaa aactttctca gtctccatct tcctttatga acattgaaaa 1740  
 ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctcctacat 1800  
 cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtaccttttc cgttgcaatg atattgatag 1860  
 tatgtttgtg aaaactaata gggttaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttggtccaa 1920  
 gattttccga gagctttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat 1980  
 caccaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaaat 2040  
 gaaaacgtat gaatgttatt agtaaagggt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca 2100  
 gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtggt ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat 2160  
 atatatataa tgctttacaa cacttggatt tttttttgga ggctggaatt tttaatctac 2220  
 atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat 2280  
 atatgtgttc gtgtatattt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat 2340  
 atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata 2400  
 tagtgcattt tttctaacia ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag 2460  
 taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa 2520  
 attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac 2580  
 cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtacccgga attcgagctc 2640  
 ggtacccggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga taatttatcc 2700  
 tagtttgccg gctatatattt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg cgggactcta 2760  
 atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgtaattat tacatgctta 2820  
 acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt 2880  
 aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga ccaagcttgc 2940  
 gggtttggtg ttccatattg ttcatctccc attgatcgta ttaagaaagt atgatggtga 3000



tgctgcagcc ttccgctttc gcttcacgga aaacctgaag cacactctcg gcgccatttt	3060
cagtcagctg cttgctttgt tcaaactgcc tccattccaa aacgagcggg tactccaccc	3120
atccggctcag acaatcccat aaagcgcca ggttttcacc gtagtattcc ggaagggcaa	3180
gctccttttt caatgtctgg tggaggctgc tgatacttct gatttgttcc ccgttaatga	3240
ctgctttttt catcggtagc taattttctt aagtaaaaac tttgatttga gtgatgatgt	3300
tgtactgtta cacttgcacc acaagggcat atatagagca caagacatac acaacaactt	3360
gcaaaaactaa cttttgttgg agcatttoga ggaaaatggg gagtagcagg ctaatctgag	3420
ggtaacatta aggtttcatg tattaatttg ttgcaaacat ggacttagtg tgaggaaaaa	3480
gtacaaaaat tttgtctcac cctgatttca gttatggaaa ttacattatg aagctgtgct	3540
agagaagatg tttattctag tccagccacc caccttatgc aagtctgctt ttagcttgat	3600
tcaaaaactg atttaattta cattgctaaa tgtgcatact tcgagcctat gtcgctttaa	3660
ttcgagtagg atgtatatat tagtacataa aaaatcatgt ttgaatcatc tttcataaaag	3720
tgacaagtca attgtccctt cttgtttggc actatatcca atctgttaat gcaaattatc	3780
cagttatact tagctagata tccaattttg aataaaaata gctcttgatt agtaaaccgg	3840
atagtgacaa agtcacatat ccatcaaact tctggtgctc gtggctaagt tctgatcgac	3900
atgggggttaa aattttaaatt gggacacata aatagcctat ttgtgcaaat ctccccatcg	3960
aaaatgacag attgttacat ggaaaacaaa aagtcctctg atagaagtcg caaagtatca	4020
caattttcta tcgagagata gattgaaaga agtgcaggga agcggttaac tggaacataa	4080
cacaatgtct aaattaattg cattcgctaa ccaaaaagtg tattactctc tccgggtccac	4140
aataagttat tttttggccc tttttttatg gtccaaaata agtgagtttt ttagatttca	4200
aaaatgattt aattattttt ttactacagt gcccttgag taaatggtgt tggagtatgt	4260
gtagaaatg tttatgtgaa gaaatagtaa aggttaatat gatcaatttc attgctattt	4320
aatgttaaaa tgtgaatttc ttaatctgtg tgaaaacacc aaaaaatcac ttattgtgga	4380
ccggagaaaag tatataaata tatatttggg agcgactaaa aataaaacttt tctcatatta	4440
tacgaacctt aaaacagcat atggtagttt ctagggaatc taaatcacta aaattaataa	4500
aagaagcaac aagtatcaat acatatgatt tacaccgtca aacacgaaat tcgtaaatat	4560
ttaatataat aaagaattaa tccaaatagc ctcccaccct atkacttaaa ctaaaaataa	4620
ccagcgaatg tatattatat gcataattta tatattaaat gtgtataatc atgtataatc	4680
aatgtataat ctatgtatat ggtagaaaa agtaaacaat taatatagcc ggctatttgt	4740
gtaaaaatcc ctaatataat cgcgacggat ccccggaat tccggggaag cttagatcca	4800

tggagccatt tacaattgaa tatatcctgc cg

4832

<210> 10

<211> 5865

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> Т-ДНК плазміди pC0113

<400> 10

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg	60
gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttta	120
atattttattg ataaaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaattttatt	180
gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg	240
tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt	300
agctcatcgg gggatcctag aacgcgtgat ctcatatctc ggtgacgggc aggaccggac	360
ggggcggtac cggcaggctg aagtccagct gccagaaacc cagtcatgc cagttcccgt	420
gcttgaagcc ggccgccgcg agcatgccgc ggggggcata tccgagcgcc tcgtgcatgc	480
gcacgctcgg gtcgttgggc agccgatga cagcgaccac gctcttgaag ccctgtgcct	540
ccagggactt cagcagggtg gtgtagagcg tggagcccag tcccgtccgc tgggtggcggg	600
gggagacgta cacggtcgac tcggccgtcc agtcgtaggc gttgcgtgcc ttccaggggc	660
ccgcgtaggc gatgccggcg acctcgcctt ccacctcggc gacgagccag ggatagcgt	720
cccgcagacg gacgaggtcg tccgtccact cctgcgggtc ctgcggctcg gtacggaagt	780
tgaccgtgct tgtctcgatg tagtggttga cgatggtgca gaccgccggc atgtccgcct	840
cgggtggcacg gcggatgtcg gccgggcgtc gttctgggtc cattgttctt ctttactctt	900
tgtgtgactg aggtttggtc tagtgctttg gtcacttata tataatgata acaacaatga	960
gaacaagctt tggagtgatc ggaggggtcta ggatacatga gattcaagtg gactaggatc	1020
tacaccgttg gattttgagt gtggatatgt gtgagggtta ttttacttgg taacggccac	1080
aaaggcctaa ggagaggtgt tgagaccctt atcggcttga accgctggaa taatgccacg	1140
tggaagataa ttccatgaat cttatcggtt tctatgagtg aaattgtgtg atgggtggagt	1200
ggtgcttgct cattttactt gcctgggtgga cttggccctt tccttatggg gaatttatat	1260
tttacttact atagagcttt catacctttt ttttaccttg gatttagtta atatataatg	1320
gtatgattca tgaataaaaa tgggaaatgt ttgaatttgt actgctaaat gcataagatt	1380
aggtgaaact gtggaatata tatttttttc atttaaaagc aaaatttgcc ttttactaga	1440
attataaata tagaaaaata tataacattc aaataaaaat gaaaataaga actttcaaaa	1500

aacagaacta tgtttaatgt gtaaagatta gtgcacatc aagtcacctg ttacaatatg	1560
ttacaacaag tcataagccc aacaaagtta gcacgtctaa ataaactaaa gagtccacga	1620
aaatattaca aatcataagc ccaacaaagt tattgatcaa aaaaaaaaaa cgcccaacaa	1680
agctaaacaa agtccaaaaa aaacttctca agtctccatc ttcctttatg aacattgaaa	1740
actatacaca aaacaagtca gataaatctc tttctgggccc tgtcttccca acctcctaca	1800
tcacttccct atcggattga atgttttact tgtacctttt ccgttgcaat gatattgata	1860
gtatgtttgt gaaaactaat agggttaaca atcgaagtca tggaatatgg atttgggtcca	1920
agattttccg agagctttct agtagaaagc ccatcaccag aaatttacta gtaaaataaa	1980
tcaccaatta ggtttcttat tatgtgcaa attcaatata attatagagg atatttcaaa	2040
tgaaaacgta tgaatgttat tagtaaatgg tcaggtaaga cattaaaaaa atcctacgtc	2100
agatattcaa ctttaaaaaat tcgatcagtg tggaattgta caaaaatttg ggatctacta	2160
tatatatata atgctttaca acacttggat ttttttttgg aggctggaat ttttaatcta	2220
catatttggt ttggccatgc accaactcat tgttttagtgt aatactttga ttttgtcaaa	2280
tatatgtggt cgtgtatatt tgtataagaa tttctttgac catatacaca cacacatata	2340
tatatatata tatatattat atatcatgca cttttaattg aaaaaataat atatatatat	2400
atagtgcatt ttttctaaca accatatatg ttgcgattga tctgcaaaaa tactgctaga	2460
gtaatgaaaa atataatcta ttgctgaaat tatctcagat gttaagattt tcttaaagta	2520
aattctttca aatttttagct aaaagtcttg taataactaa agaataatac acaatctcga	2580
ccacggaaaa aaaacacata ataaatttga atttcgaccg cggtagcccg aattcgagct	2640
cggtagcccg ggatcttccc gatctagtaa catagatgac accgcgcgcg ataatttatc	2700
ctagtttgcg cgctatatatt tgttttctat cgcgtattaa atgtataatt gcgggactct	2760
aatcataaaa acccatctca taaataacgt catgcattac atgttaatta ttacatgctt	2820
aacgtaattc aacagaaatt atatgataat catcgcaaga ccggcaacag gattcaatct	2880
taagaaactt tattgcaaaa tgtttgaacg atctgcttcg gatcctctag agccggaaag	2940
tgaaattgac cgatcagagt ttgaagaaaa atttattaca cactttatgt aaagctgaaa	3000
aaaacggcct ccgcaggaag ccgttttttt cgttatctga tttttgtaaa ggtctgataa	3060
tggtccgttg ttttgtaaatt cagccagtcg cttgagtaaa gaatccggtc tgaatttctg	3120
aagcctgatg tatagttaat atccgcttca cgccatgttc gtccgctttt gcccgaggat	3180
ttgccttccc tgtttgagaa gatgtctccg ccgatgcttt tccccggagc gacgtctgca	3240
aggttccctt ttgatgccac ccagccgagg gcttgtgctt ctgattttgt aatgtaatta	3300

tcaggtagct	tatgatatgt	ctgaagataa	tccgcaaccc	cgtcaaacgt	gttgataacc	3360
ggtagcatgg	tagctaattt	ctttaagtaa	aaactttgat	ttgagtgatg	atgttgact	3420
gttacacttg	caccacaagg	gcataatag	agcacaagac	atacacaaca	acttgcaaaa	3480
ctaacttttg	ttggagcatt	tcgaggaaaa	tggggagtag	caggctaata	tgagggtaac	3540
attaagggtt	catgtattaa	tttggtgcaa	acatggactt	agtgtgagga	aaaagtacca	3600
aaattttgtc	tcacctgat	ttcagttatg	gaaattacat	tatgaagctg	tgctagagaa	3660
gatgtttatt	ctagtccagc	caccacactt	atgcaagtct	gcttttagct	tgattcaaaa	3720
actgatttaa	tttacattgc	taaatgtgca	tacttcgagc	ctatgtcgct	ttaattcgag	3780
taggatgtat	atattagtag	ataaaaaatc	atgtttgaat	catctttcat	aaagtgacaa	3840
gtcaattgtc	ccttcttggt	tggcactata	ttcaatctgt	taatgcaaata	tatccagtta	3900
tacttagcta	gatatccaat	tttgaataaa	aataagctct	gattagtaaa	ccgatagtg	3960
acaaagtcac	atatccatca	aacttctggt	gctcgtggct	aagttctgat	cgacatgggg	4020
ttaaaattta	aattgggaca	cataaatagc	ctatttgtgc	aaatctcccc	atcgaaaatg	4080
acagattgtt	acatggaaaa	caaaaagtcc	tctgatagaa	gtcgcaaagt	atcacaattt	4140
tctatcgaga	gatagattga	aagaagtgca	gggaagcgg	taactggaac	ataacacaat	4200
gtctaaatta	attgcattcg	ctaaccaaaa	agtgtattac	tctctccgg	ccacaataag	4260
ttattttttg	gccctttttt	tatggtccaa	aataagtgag	tttttttagat	ttcaaaaatg	4320
atttaattat	ttttttacta	cagtgccctt	ggagtaaagt	gtgttgaggt	atgtgttaga	4380
aatgtttatg	tgaagaaata	gtaaagggtta	atatgatcaa	tttcattgct	atttaattgt	4440
aaaatgtgaa	tttcttaata	tgtgtgaaaa	caacaaaaaa	atcacttatt	gtggaccgga	4500
gaaagtatat	aaatatatat	ttggaagcga	ctaaaaataa	acttttctca	tattatacga	4560
acctaaaaac	agcatatggt	agtttctagg	gaatctaaat	cactaaaatt	aataaaagaa	4620
gcaacaagta	tcaatacata	tgattttacac	cgtcaaacac	gaaattcgta	aatatttaata	4680
ataataaaga	attaatccaa	atagcctccc	acctataaac	ttaaactaaa	aataaccagc	4740
gaatgtatat	tatatgcata	atttatatat	taaatgtgta	taatcatgta	taatcaatgt	4800
ataatctatg	tatatgggtta	gaaaaagtaa	acaattaata	tagccggcta	tttgtgtaaa	4860
aatccctaata	ataatcgcg	cggatccccg	ggaattccgg	ggaagcttag	atccatgcag	4920
atctgatcat	gagcggagaa	ttaagggagt	cacgttatga	cccccgccga	tgacgcggga	4980
caagccggtt	tacgtttgga	actgacagaa	ccgcaacgat	tgaaggagcc	actcagccgc	5040
gggtttctgg	agtttaataga	gctaagcaca	tacgtcagaa	accattattg	cgcgttcaaa	5100
agtcgcctaa	ggtcactatc	agctagcaaa	tatttcttgt	caaaaatgct	ccactgacgt	5160

```

tccataaatt cccctcggta tccaattaga gtctcatatt cactctcaat ccaaaccatg 5220
aaaaaagcag tcattaacgg ggaacaaatc agaagtatca gcgacctcca ccagacattg 5280
aaaaaggagc ttgcccttcc ggaatactac ggtgaaaacc tggacgcttt atgggattgt 5340
ctgaccggat ggggtggagta cccgctcggt ttggaatgga ggcagtgtga acaaagcaag 5400
cagctgactg aaaatggcgc cgagagtgtg cttcagggtt tccgtgaagc gaaagcggaa 5460
ggctgcgaca tcaccatcat actttcttaa tacgatcaat gggagatgaa caatatggaa 5520
acacaaaccc gcaagcttgg tctagaggat ccccgatga gctaagctag ctatatcatc 5580
aatttatgta ttacacataa tatcgactc agtctttcat ctacggcaat gtaccagctg 5640
atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat ttatgttttt 5700
gcttggacta taatacctga cttgttattt tatcaataaa tatttaaaact atatttcttt 5760
caagatggga attaacatct acaaattgcc ttttcttatt gaccatgtac atcgagctct 5820
ccccagatct gcatggagcc atttacaatt gaatatatcc tgccg 5865

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рослина *Brassica napus* або *Brassica juncea*, що містить в своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, та де елітну подію MS-B2 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, з одержанням фрагмента 183 bp; та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6, та де елітну подію RF-BN1 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8, з одержанням фрагмента 215 bp.
- 10 2. Клітина або тканина, або насіння рослини за пунктом 1, де вказана клітина або тканина або насіння містить в своєму ядерному геномі принаймні одну копію елітної події MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, та де елітну подію MS-B2 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, з одержанням фрагмента 183 bp; та принаймні одну копію елітної події RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5, та SEQ ID NO: 6, та де елітну подію RF-BN1 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8, з одержанням фрагмента 215 bp.
- 15 3. Пара рослин *Brassica napus* або *Brassica juncea* для застосування для одержання гібридного насіння, в якій одна з вказаних рослин *Brassica napus* або *Brassica juncea* містить елітну подію MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, та де елітну подію MS-B2 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, з одержанням фрагмента 183 bp; а інша з цих рослин *Brassica napus* або *Brassica juncea* містить елітну подію RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6, та де елітну подію RF-BN1 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8, з одержанням фрагмента 215 bp.
- 20
- 25
- 30
- 35

4. Геномна ДНК рослини *Brassica napus* або *Brassica juncea* за пунктом 1, де вказана геномна ДНК містить елітну подію MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, і містить елітну подію RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6.

5. Рослина або клітина рослини *Brassica juncea*, що містить елітну подію RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6, та де елітну подію RF-BN1 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8, з одержанням фрагмента 215 bp.

6. Насіння з рослини *Brassica juncea* за пунктом 5, що містить елітну подію RF-BN1, причому елітна подія RF-BN1 містить чужорідну ДНК, що містить ген барстар під контролем TA29 промотору, SEQ ID NO: 5 та SEQ ID NO: 6, та де елітну подію RF-BN1 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8, з одержанням фрагмента 215 bp.

7. Рослина або клітина за пунктом 5, яка додатково містить елітну подію MS-B2, причому елітна подія MS-B2 містить чужорідну ДНК, що містить ген барнази під контролем специфічного промотору тапетуму, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, та де елітну подію MS-B2 можна ідентифікувати в полімеразній ланцюговій реакції з двома праймерами, що мають нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4, з одержанням фрагмента 183 bp.

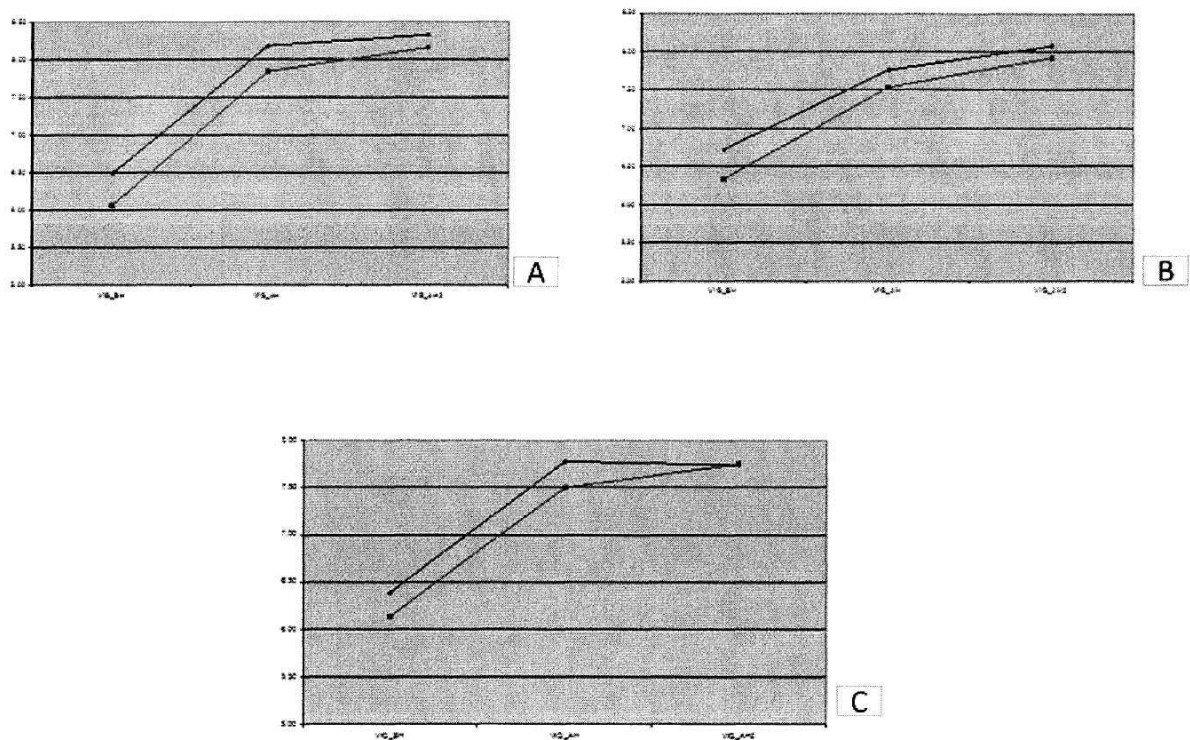
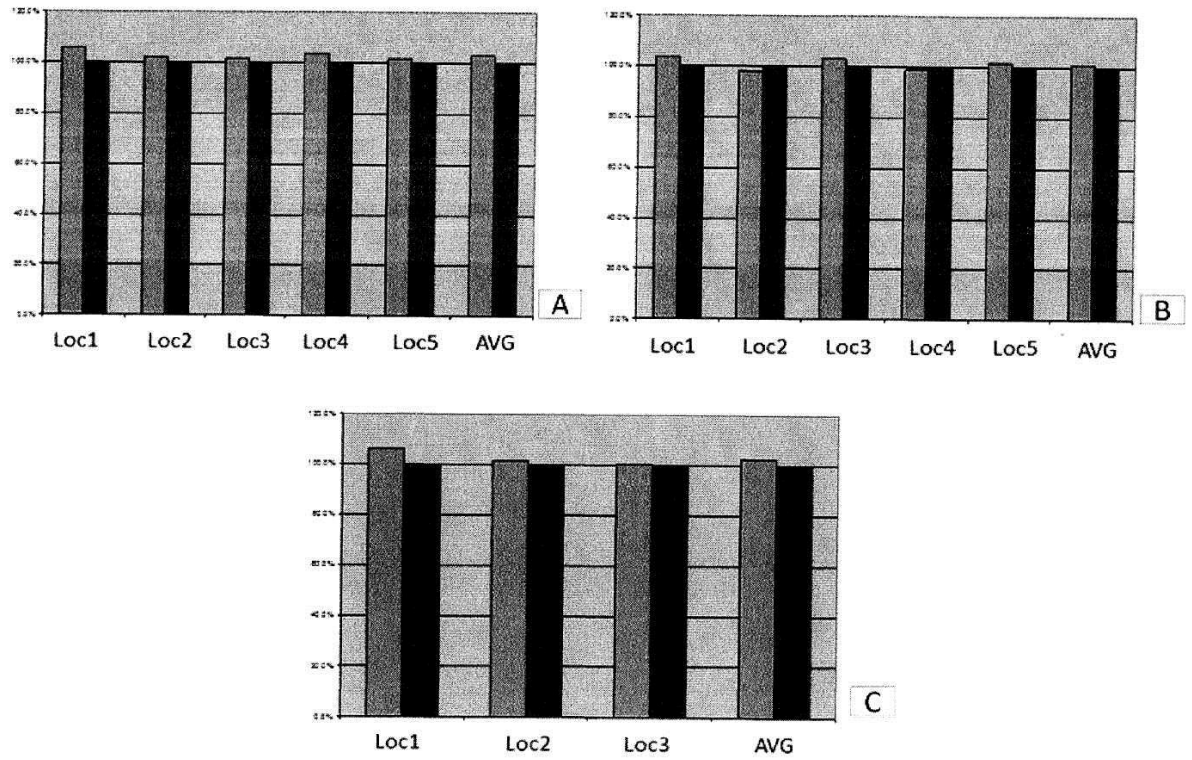


Fig. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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