



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130938** (13) **C2**
(51) МПК (2026.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 6/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: a 2019 09048 (22) Дата подання заявки: 12.03.2014 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 25.06.2026 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/785,245 (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: 10.12.2019, Бюл.№ 23 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 24.06.2026, Бюл.№ 25 (62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): a201510007, 12.03.2014	(72) Винахідник(и): Фласінський Станіслав (US), Чжан Дзун (US), Чжао Сулін (US) (73) Володілець (володільці): МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС, 800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America (US) (74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2007/130645 A1 07.06.2007 US 2007/209085 A1, 06.09.2007 US 2012/210463 A1, 16.08.2012 WO 2007/049275 A2, 03.05.2007 WO 2012/112411 A1, 23.08.2012 WO 2012/158535 A1, 22.11.2012 XIONG et al. Concurrent mutations in six amino acids in beta-glucuronidase improve its thermostability, Protein Engineering, Design, and Selection, 08.06.2007, vol. 20, no. 7, P. 319 - 325 ELMAYAN et al. Synthesis of a bifunctional metallothionein/beta-glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels, The Plant Journal, 1994, vol. 6, no. 3, P. 433 - 440 VETTORE et al. The libraries that made SUCEST, Genetics and Molecular Biology, 2001, vol. 24, no. 1-4, P. 1-7 JEONG J.S. et al. Root-Specific Expression of OsNAC10 Improves Drought Tolerance and Grain Yield in Rice under Field Drought Conditions, Plant Physiology, 01.05.2010, vol. 153, no. 1, P. 185-197 XU Y et al. Characterization of a Rice Gene Family Encoding Root-Specific Proteins, Plant Molecular Biology, Springer, Dordrecht, NL, 01.01.1995, vol. 27, no. 2, P. 237 - 248 PUFZZ09TD ZM_0.6_1.0_KB Zea mays genomic clone ZMMBTa0771B18, genomic survey sequence, EMBL, 28.08.2003, Database accession no. CG049384 OR_ABa0263C13.r OR_ABa Oryza ridleyi genomic clone OR_ABa0263C13 3', genomic survey sequence, EMBL, 22.01.2006, Database accession no. DX337374
---	---

(54) РЕГУЛЯТОРНИЙ ЕЛЕМЕНТ РОСЛИН ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується молекули рекомбінантної ДНК, що використовується для модуляції експресії генів у рослинах. Винахід також стосується трансгенної рослини, клітини рослини, частини

UA 130938 C2

рослини, насіння, які містять рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить молекулу ДНК, функціонально пов'язану з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується.

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

ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

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

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

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

СУТЬ ВІНАХОДУ

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

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

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

У ще іншому аспекті в цьому документі нижче наведено трансгенну рослину або її частину, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності

послідовності до будь-якої з SEQ ID № 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. У конкретних варіантах реалізації винаходу трансгенна рослина являє собою рослину-нащадок будь-якого покоління відносно вихідної трансгенної рослини та містить молекулу рекомбінантної ДНК. Трансгенна насіннина, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка породжує таку трансгенну рослину при вирощуванні, також пропонується у винаході.

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

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

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

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

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

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

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

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

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

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

5 SEQ ID №: 31 являє собою нативну кодуючу послідовність β -глюкуронідази *Escherichia coli*.

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

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

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

SEQ ID №: 38 являє собою послідовність інтрону.

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

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

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

25 молекули ДНК відповідно до цього винаходу, та до способів їхнього отримання і застосування. Наступні визначення та способи пропонуються з метою кращого окреслення винаходу і спрямування до фахівців у цій галузі техніки при застосуванні винаходу. Якщо не вказано інше, терміни слід розуміти відповідно до загальноприйнятого використання фахівцями в цій галузі техніки.

30 Молекули ДНК

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

40 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.

45 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

50 відповідними внутрішніми нуклеотидними вставками, делеціями або розривами. Використаний у цьому документі термін "референсна послідовність" відноситься до послідовності ДНК, яка наводиться в SEQ ID №: 1-20.

Використаний в цьому документі термін "відсоток ідентичності послідовностей" або "відсоток ідентичності", або «% ідентичності» являє собою частку ідентичності помножену на 100. "Частка ідентичності" для послідовності ДНК, оптимально вирівняної із початковою послідовністю, являє собою число відповідностей між нуклеотидами при оптимальному вирівнюванні поділене на загальне число нуклеотидів у референсній послідовності, наприклад, на загальне число нуклеотидів всієї повнорозмірної референсної послідовності. Таким чином, в одному варіанті реалізації винахід відноситься до молекули ДНК, яка містить послідовність ДНК, котра при оптимальному вирівнюванні з референсною послідовністю, представленою в цьому документі

як SEQ ID №: 1-20, має щонайменше близько 85 відсотків ідентичності, щонайменше близько 86 відсотків ідентичності, щонайменше близько 87 відсотків ідентичності, щонайменше близько 88 відсотків ідентичності, щонайменше близько 89 відсотків ідентичності, щонайменше близько 90 відсотків ідентичності, щонайменше близько 91 відсотка ідентичності, щонайменше близько 92 відсотків ідентичності, щонайменше близько 93 відсотків ідентичності, щонайменше близько 94 відсотків ідентичності, щонайменше близько 95 відсотків ідентичності, щонайменше близько 96 відсотків ідентичності, щонайменше близько 97 відсотків ідентичності, щонайменше близько 98 відсотків ідентичності, щонайменше близько 99 відсотків ідентичності або щонайменше близько 100 відсотків ідентичності з референсною послідовністю.

Регуляторні елементи

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

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

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

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.

Промотор є корисним в якості регуляторного елемента для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Як використовується в цьому документі термін "промотор" відноситься в загальному розумінні до молекули ДНК, яка бере участь у розпізнаванні та зв'язуванні РНК-полімерази II та інших білків, таких як транс-діючі фактори транскрипції, для ініціації транскрипції. Промотор може походити з 5' нетрансльованої області (5' НТО) гена. В альтернативному варіанті промотори можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання молекулою ДНК. Промотори також можуть бути химерними. Химерні промотори отримують шляхом злиття двох або більше гетерологічних молекул ДНК. Промотори, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID № 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, включаючи їхні фрагменти або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу такі молекули ДНК та будь-які їхні варіанти або похідні, описані в цьому документі, далі визначаються як такі, що мають промоторну активність, тобто здатні діяти як промотор у клітині хазяїна, такого як трансгенна рослина. У ще додаткових конкретних варіантах реалізації винаходу фрагмент може бути визначений як такий, що виявляє промоторну активність, яку має вихідна молекула промотору, з якої він був отриманий, або фрагмент може містити "мінімальний промотор", який забезпечує основний рівень транскрипції та включає ТАТА-бокс або еквівалентну послідовність ДНК для розпізнавання і зв'язування комплексу РНК-полімерази II з метою ініціації транскрипції.

В одному варіанті реалізації винаходу фрагменти забезпечені промоторною послідовністю, описаною в цьому документі. Фрагменти промоторів можуть включати промоторну активність, як

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

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

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.

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

Лідерні послідовності (5' НТО), представлені в SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть складатися з регуляторних елементів або можуть приймати вторинні структури, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. Лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані, відповідно до винаходу, для створення химерних регуляторних елементів, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. На додаток, лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані для створення химерних лідерних послідовностей, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК.

Використаний у цьому документі термін "інтрон" відноситься до молекули ДНК, яка може бути виділена або ідентифікована з геномної копії гена і може бути визначена в загальному

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

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

Використаний у цьому документі термін "3' молекула термінації транскрипції", "3' нетрансльована область" або "3' НТО" відноситься до молекули ДНК, яка використовується під час транскрипції із нетрансльованої області 3' частини молекули мРНК. 3' нетрансльована область молекули мРНК може бути отримана шляхом специфічного розщеплення і 3' поліаденилюванням, також відомим як полі(А)-хвіст. 3' НТО може бути функціонально пов'язана з молекулою ДНК, яка транскрибується, і розташовуватися нижче від неї, і може включати сигнал поліаденилювання та інші регуляторні сигнали, здатні впливати на транскрипцію, процесинг мРНК або експресію генів. Вважають, що полі(А)-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.

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

Із практичної точки зору, як правило, корисно, щоб 3' НТО, використана в експресійній касеті, мала наступні характеристики. 3' НТО повинна бути здатною раціонально та ефективно завершувати транскрипцію ДНК та запобігати наскрізному зчитуванню транскрипту в будь-якій із сусідніх послідовностей ДНК, яка може міститися в іншій експресійній касеті, як і у випадку декількох експресійних касет, які належать одній трансферній ДНК (Т-ДНК), або сусідній хромосомній ДНК, в яку Т-ДНК була вбудована. 3' НТО не повинна призводити до зниження транскрипційної активності наданої промотором, лідером, енхансерами та інтронами, які використовуються для контролювання експресії молекули ДНК. У біотехнології рослин 3' НТО часто використовується для затравки реакцій ампліфікації РНК, яка зворотно транскрибується, виділеної із трансформованих рослин, та використовується для: 1) оцінки транскрипційної активності або експресії експресійної касети, інтегрованої у хромосому рослини; 2) оцінки кількості копій вставок у ДНК рослини; та 3) оцінки зиготності отриманої насінини після розмноження. 3' НТО також використовується в реакціях ампліфікації ДНК, екстрагованої із трансформованих рослин, для визначення інтактності вбудованої касети.

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

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 метилування, аналізу зсуву електрофоретичної мобільності, *in vivo* геномний футпринтинг шляхом лігування-опосередкованої полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інших загальноприйнятих аналізів; або шляхом аналізу подібності послідовностей ДНК, використовуючи відомі мотиви цис-елементів або енхансерних елементів, як цільову послідовність або цільовий мотив, із загальноприйнятими способами порівняння послідовностей ДНК, таких як BLAST. Тонка структура домена енхансеру може бути додатково досліджена шляхом мутагенезу (або заміщення) одного або більше нуклеотидів або іншими загальноприйнятими способами, відомими у цій галузі техніки. Енхансерні елементи можуть бути отримані шляхом хімічного синтезу або шляхом виділення із регуляторних елементів, які включають такі елементи, і вони можуть бути синтезовані з додатковими фланкуючими нуклеотидами, які включають корисні сайти рестрикції для полегшення подальших маніпуляцій. Таким чином, розробка, створення і використання енхансерних елементів, у відповідності до способів, описаних у цьому документі, для модуляції експресії функціонально пов'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються за цим винаходом.

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

Використаний у цьому документі термін "варіант" відноситься до другої молекули ДНК, такої як регуляторний елемент, яка аналогічна за композицією, але не ідентична першій молекулі ДНК, і причому друга молекула ДНК все ще зберігає загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, наприклад, через більшу або меншу, або еквівалентну транскрипційну або трансляційну активність у порівнянні із першою молекулою ДНК. Варіант може бути укороченою або усіченою версією першої молекули ДНК та/або зміненою версією послідовності ДНК першої молекули ДНК, такої як варіант із різними сайтами рестрикції та/або внутрішніми делеціями, замінами та/або вставками. "Варіанти" регуляторного елемента також охоплюють варіанти, які виникають у результаті мутацій, котрі відбуваються під час або в результаті трансформації клітин бактерій та рослин. У цьому винаході послідовність ДНК, наведена в SEQ ID №: 1-20, може бути використана для створення варіантів, які аналогічні за композицією, але не ідентичні послідовності ДНК вихідного регуляторного елемента, хоча все ще зберігають загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, як і вихідний регуляторний елемент. Отримання таких варіантів відповідно до цього

винаходу знаходиться в межах звичайної кваліфікації у цій галузі техніки у висвітленому описі та здійснено в межах обсягу цього винаходу.

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

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

Генетичні конструкції

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

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

Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть бути запропоновані в одному варіанті реалізації винаходу як генетичні конструкції, які складаються із двох граничних областей пухлиноіндукуючої плазміди (Ti), що мають області правої граничної ділянки (RB або AGRtu.RB) і лівої граничної ділянки (LB або AGRtu.LB) Ti -плазміди, ізольованої з *Agrobacterium tumefaciens*, яка містить T-ДНК, яка разом із перенесенням молекул, що забезпечується клітинами *A. tumefaciens*, дозволяє інтеграцію T-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 спектиноміцину або стрептоміцину, 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.

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. 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 pCaMV CN

5 контрольного вектора для перенесення.

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

10 варіанті реалізації винаходу генетичні конструкції відповідно до цього винаходу містять щонайменше один регуляторний елемент, функціонально пов'язаний із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка функціонально пов'язана з 3' НТО.

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

15 за винаходом може бути функціонально пов'язаний із гетерологічним нетрансльованим 5' лідером, таким як один з отриманих із гена білка теплового шоку. В альтернативному варіанті лідер за винаходом може бути функціонально пов'язаним із гетерологічним промотором, таким як 35S промоторний транскрипт вірусу мозаїки цвітної капусти (*Cauliflower Mosaic Virus*).

Експресійні касети також можуть включати кодуєчу послідовність транзитного пептиду, яка кодує пептид, корисний для внутрішньоклітинного спрямування функціонально пов'язаного білка, зокрема, до хлоропласту, лейкопласту або іншої пластидної органели, мітохондрії, пероксисоми, вакуолі або позаклітинного простору. Багато білків, локалізованих у хлоропластах, експресуються генами ядра як попередники і спрямовуються до хлоропласту за допомогою транзитного пептиду хлоропласту (ТПХ). Приклади таких білків, ізольованих із хлоропластів,

25 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 пов'язаного з трансгеном, який кодує нехлоропластні білки.

30 гетерологічного ТПХ, функціонально пов'язаного з трансгеном, який кодує нехлоропластні білки.

Молекула ДНК, яка транскрибується

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

40 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.

"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.

45 "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.

Регуляторний елемент, такий як промотор відповідно до цього винаходу, може бути функціонально пов'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка гетерологічна відносно регуляторного елемента. Використаний у цьому документі термін "гетерологічний" відноситься до комбінації із двох або більше молекул ДНК, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у природі. Наприклад, дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних видів і/або дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних генів, наприклад, різних генів одного і того самого виду, або ж одних і тих самих генів із різних видів. Регуляторний елемент є, таким чином, гетерологічним відносно функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у природі, тобто молекула ДНК, яка транскрибується, зазвичай не

55 буває функціонально пов'язаною із регуляторним елементом.

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

60 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 антисмисловому напрямку. Фахівець у цій галузі техніки

5 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.

Таким чином, в одному варіанті реалізації цього винаходу представляється рекомбінантна

10 молекула ДНК, яка містить регуляторний елемент за винаходом, такий як ті, що запропоновані в SEQ ID №: 1-20, функціонально пов'язаний з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується, для модулювання транскрипції молекули ДНК, яка транскрибується, на бажаному рівні або за бажаним характером, коли генетична конструкція інтегрована в геном клітини трансгенної рослини. В одному варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка

15 транскрибується, містить область гена, яка кодує білок, а в іншому варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, містить антисмислову область гена.

Гени, які представляють агрономічний інтерес

Молекула ДНК, яка транскрибується, може бути геном, який представляє агрономічний інтерес. Використаний у цьому документі термін "ген, який представляє агрономічний інтерес"

20 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

25 хімічних факторів, або може діяти в якості пестицидного агента в раціоні шкідника, який харчується рослиною. В одному варіанті реалізації цього винаходу регуляторний елемент за винаходом включений у генетичну конструкцію таким чином, що регуляторний елемент функціонально пов'язаний з молекулою ДНК, яка транскрибується, котра є геном, який представляє агрономічний інтерес. У трансгенній рослині, яка містить таку генетичну

30 конструкцію, експресія гена, який представляє агрономічний інтерес, може надати корисну агрономічну рису. Корисна агрономічна риса може включати, але не обмежується цими, наприклад, толерантність до гербіцидів, боротьбу з комахами, модифікування врожайності, стійкість до хвороб, стійкість до патогена, модифікування росту і розвитку рослини, модифікований вміст крохмалю, модифікований вміст олії, модифікований вміст жирних кислот,

35 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.

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,

45 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),

50 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), підвищення продукції олій

55 (патенти США № 6495739, 5608149, 6483008 та 6476295), модифікований вміст жирних кислот (патенти США № 6828475, 6822141, 6770465, 6706950, 6660849, 6596538, 6589767, 6537750, 6489461 та 6459018), підвищення продукції 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

60 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).

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

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

Селективні маркери

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

β-глюкуронідаза

Ген β-глюкуронідази (GUS), який виділено з *Escherichia coli* K-12, являє собою один з найбільш широко використовуваних генів для звітів з біотехнології рослин. Ген GUS *E. coli*, uidA, являє собою частину оперона GUS на бактеріальній хромосомі. Його індукують широким спектром β-D-глюкуронідів. Фермент GUS являє собою екзогідролазу, яка каталізує гідроліз β-D-глюкуронідів на D-глюкуронову кислоту та аглікон. *E. coli* живе в травному тракті хребетних, включаючи людину. Хребетні використовують шлях глюкуронування для детоксикації ксенобіотиків та ендегенних сполук, таких як відходи, стероїди, аліфатичні спирти, феноли, карбонові кислоти, цукор та інші різні метаболіти. Глюкуронування залучає до кон'югування з D-глюкуроною кислотою. Це відбувається головним чином у печінці, але також відбувається в інших тканинах та органах, таких як нирки, надниркові залози, шлунково-кишковий тракт. Глюкуронова кислота, може бути використана в *E. coli*, в якості основного джерела вуглецю та енергії. Отже, білок GUS *E. coli* являє собою засіб, за допомогою якого бактерії можуть руйнувати продукти шляхом глюкуронування в травному тракті хребетних з отриманням глюкуронової кислоти в якості джерела вуглецю та енергії. Аглікони, які також вивільняються GUS ферментом, як правило, не розкладаються бактеріями, але використовується для трансферу D-глюкуронової кислоти (Gilissen et al., Transgenic Research, 7: 157-163, 1998).

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

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

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

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

Трансформація клітин

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

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, каліус, корені, бульби, насіння, стебла, листя, паростки, зав'язі та пилок.

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.

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.

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.

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.

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 покоління 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).

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.

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 пилки. 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.

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

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

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

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

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

Таблиця 1

Промоторні та лідерні послідовності RCc3, ізольовані з різних видів трав.

Опис послідовності	SEQ ID №:	Під/вид
P-Cl.RCc3:3	1	<i>Coix lacryma-jobi</i>
L-Cl.RCc3:2	2	<i>Coix lacryma-jobi</i>
P-Ds.RCc3_1:1	3	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_1:1	4	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_2:1	5	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_2:1	6	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_3:1	7	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_3:1	8	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.

Таблиця 1

Промоторні та лідерні послідовності RCc3, ізольовані з різних видів трав.

Опис послідовності	SEQ ID №:	Рід/вид
P-MISgr.RCc3_1:1	9	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3_1:1	10	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-MISgr.RCc3-2:2	11	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3-2:1	12	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-Td.RCc3_1:1	13	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_1:1	14	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_2:1	15	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_2:1	16	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_3:1	17	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_3:1	18	Tripsacum dactyloides
P-So.RCc3:2	19	Saccharum officinarum
L-So.RCc3:2	20	Saccharum officinarum

Приклад 2

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS в трансгенній кукурудзі

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

- 10 Вектори, які використовували в цих експериментах, були сконструйовані з використанням способів клонування, які добре відомі у цій галузі техніки. Отримані вектори, що містять праву граничну область із A. tumefaciens; першу експресійну касету для аналізу промоторної/лідерної послідовності RCc3, функціонально пов'язаної з кодоном модифікованої GUS-кодуючої послідовності, яка містить смисловий інтрон GOI-Ec.uidA+St.LS1.nno:3 (SEQ ID №:29), котра функціонально пов'язана з 5' кінцем 3' НТО із гена S- аденозілметіонін синтетази 1 проса італійського (T-SETit.Ams1-1: 1: 1, SEQ ID №: 159); другу експресійну касету, використану для відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкості к гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) та ліву граничну область із A. tumefaciens. Отримані плазмідні конструкції були використані для трансформації рослин кукурудзи з використанням методів, відомих в цій галузі техніки. Експресія GUS, обумовлена новими промоторами та лідерами RCc3, була зрівняна з експресією, керованою гомологами промоторів та лідерів RCc3 проса італійського та рису. У таблиці 2 наведені позначення плазмід, промоторні та лідерні послідовності RCc3, і SEQ ID №.
- 20

Таблиця 2

Бінарні плазмідні конструкції для трансформації рослин та RCc3-асоційовані промоторні/лідерні послідовності.

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

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

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

Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил-β-D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях рН, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить рН для кількісного вимірювання 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. Середні значення експресії були надані в пмоль/мкг 4-MU білка/год.

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

Приклад 3

Енхансери, які походять від регуляторних елементів.

Енхансери походять із промоторних елементів, запропонованих у цьому винаході, таких, які представлені в SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19. Ці енхансерні елементи можуть містити один або більше цис регуляторних елементів, які у разі, коли вони функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором, можуть підвищувати або модулювати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, або забезпечувати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, в конкретному типі клітин або органі рослини, або у конкретній часовій точці у розвитку або циркадному ритмі. Енхансери створюють шляхом видалення ТАТА-боксу або функціонально подібних елементів та будь-якої послідовності ДНК, яка знаходиться нижче, із промоторів, що дозволяє ініціювати транскрипцію з промоторів, описаних у цьому документі, як описано вище, в тому числі їхніх фрагментів, з яких видалені ТАТА-бокс або функціонально подібні елементи та послідовність ДНК, яка знаходиться нижче від ТАТА-боксу.

Енхансерні елементи можуть бути отримані з промоторних елементів, описаних у цьому документі, і клоновані з використанням способів, відомих у цій галузі техніки, таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором. Енхансерні елементи також можуть бути клоновані таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом, отриманим з організму іншого роду, або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, отриманими з організмів іншого роду або організму того самого роду, які функціонально пов'язані з промотором, отриманим з організму того самого або іншого роду, в результаті чого утворюється химерний регуляторний елемент. Експресійний вектор з геном GUS для трансформації рослин створений із використанням способів, відомих у цій галузі техніки, подібно генетичним конструкціям, описаним у попередніх прикладах, в яких кінцеві рослинні експресійні вектори містять праву граничну область з *A. tumefaciens*;, першу експресійну касету для тестування регуляторного або химерного регуляторного елемента, яка містить регуляторний або химерний регуляторний елемент, функціонально пов'язаний з інтроном, отриманим із білка теплового шоку HSP70 з *Z. mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID №: 38) або з будь-яким з інтронів, представлених у цьому документі, або з будь-яким іншим інтроном, функціонально пов'язаним із кодуючою послідовністю GUS, яка або має інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 32) або не має інтрону (CR-Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat), SEQ ID №: 31), котра функціонально пов'язана з 3' НТО нопалінсинтази з *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID №: 39) або з 3' НТО із гена білка перенесення ліпідів рису (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID №: 40), другу касету для селекції трансгена, використану для

відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкість до гербіциду гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) або, в альтернативному варіанті, до антибіотика канаміцину (під контролем промотору актину 1 рису) і ліву граничну область з *A. tumefaciens*. Отримані плазмідні вектори використовують для трансформації рослин кукурудзи або інших рослин цього роду за допомогою способів, описаних раніше, або інших способів, які відомі у цій галузі техніки. В альтернативному варіанті клітини протопластів, отримані з кукурудзи або інших рослин роду, трансформують за допомогою способів, відомих у цій галузі техніки, для проведення аналізу транзиторної експресії

Експресія гена GUS під контролем регуляторного елемента, який містить один або більше енансерів, оцінюється при випробуваннях рослин зі стабільною трансформацією або із транзиторною експресією для визначення впливу енансерного елемента на експресію трансгена. Модифікації одного або більше енансерних елементів або дуплікація одного або більше енансерних елементів здійснюється на основі емпіричних досліджень та кінцевої регуляції експресії генів, яка спостерігається при використанні композиції кожного регуляторного елемента. Зміна відносних позицій одного або більше енансерів у кінцевому 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 в межах рослини кукурудзи або рослини іншого роду.

Приклад 4

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

Промотори рослин часто експресують на рівнях, які нижче нормального рівня виявлення багатьох кількісних аналізів, але їх характеристики експресії можуть бути дуже цінними для експресії певних трансгенів. Раніше в біотехнології рослин промотори, які давали високу конститутивну експресію були бажаними та їх використовували для регуляції транскрипції молекул ДНК, які відповідали за конкретну ознаку, що вимагає високу конститутивну експресію, таку як стійкість до гербіцидів або стійкість до комах. Ці висококонститутивні промотори часто створюють з геномів вірусів рослин, а не геномів рослин, наприклад, промотори 35S, отримані з вірусу мозаїки цвітної капусти та вірусу мозаїки ранника. Примітно, що в деяких випадках, висока конститутивна експресія генів певних молекул ДНК, які транскрибуються, може призвести до негативних наслідків, таких як сайленсінг трансгенів off-phenotypes або yield drag. Наприклад, високий рівень експресії гена GUS в трансгенних рослинах цукрової тростини в яких використовуються два різних промотора убіквітину, отримані з цукрової тростини, а також з кукурудзи, призводить до посттранскрипційного сайленсінга гена GUS (Wei et al., J. Plant Physiol. 160: 1241-1251, 2003).

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

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

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

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

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

Таблиця 3

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

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

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

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

Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил-β-D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресціює при високих значеннях рН, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить рН для кількісного вимірювання 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.

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

Таблиця 4

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

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

Таблиця 5.

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

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

Таблиця 6.

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

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

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

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

Приклад 5

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

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

Також було побудовано дві плазмідні для використання при ко-трансформації та нормуванні даних, з використанням способів, відомих в цій галузі техніки. Кожна плазміда містила специфічну послідовність, що кодує люциферази, під контролем конститутивної послідовності

EXP. Рослинний вектор pMON19437 містить експресійну касету з конститутивним промотором, функціонально пов'язаним з 5' інтроном, (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK: 1: 1, SEQ ID №: 41), функціонально пов'язаним з 5' кодуючою послідовністю люциферази світляка (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE: 1: 3, SEQ ID №: 42), функціонально пов'язаної з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39). Рослинний вектор pMON63934 містить експресійну касету з конститутивною послідовністю EXP (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID №: 44), функціонально пов'язаною з 5' кодуючою послідовністю люциферази ренілі морської (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0: 0: 1, SEQ ID NO: 43), функціонально пов'язаною з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39).

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

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

Таблиця 7

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

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середня RLUC	Середня GUS/FLUC	Середня GUS/RLUC
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	5328064,75	105434	253107,5	50,73	21,15
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149,5	5,23	2,28
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	2883555,75	129947,5	309268,5	22,33	9,45
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	1093785	124864,75	306178,75	8,70	3,55
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	2613839,75	128887,25	301412,75	20,45	8,83
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	2370706,25	149383,5	370443,75	15,95	6,53
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	7506585,75	150939,25	368035,5	50,15	20,88
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	4447254,25	155356,25	364604,5	28,78	12,40
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1100118,75	153451	316691,5	7,13	3,48

pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	3062045	143684,5	332394,5	21,55	9,45
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10 L-SETit.Rcc3-1:1:2	21 22	147483	129834,25	300917,25	1,15	0,50
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	184905,25	171440,75	386387,25	1,08	0,50

Таблиця 8

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

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середня RLUC	Середня GUS/FLUC	Середня GUS/RLUC
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	185142,3	18310	34502,5	10,18	5,43
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	16306,5	17008	31233	0,98	0,53
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	101603,8	19201,25	43298	5,23	2,33
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	29196	14483,5	34700,75	2,03	0,88
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	87232	18411,75	44755,75	4,80	1,95
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	510761,5	19093,75	41948,5	26,98	12,30
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	884517,8	23881,75	55790	37,23	16,18
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	91634,5	18385	43509,5	5,03	2,18
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	50257,25	18716,75	34489	2,65	1,45
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	508345,3	22335,25	51655,75	22,98	10,13
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10 L-SETit.Rcc3-1:1:2	21 22	8123	17750,75	37872,25	0,45	0,23
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	336095,3	17709,5	40179,5	19,65	8,63

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

Приклад 6

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS у трансгенній кукурудзі.

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

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

pMON264206. Якісний та кількісний аналіз експресії GUS проводили, як описано в Прикладі 2. Рослини аналізували на V4, V7 та VT стадіях розвитку. На R₁ і R₃ показаний відбір проб. Таблиця 9 показує середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи.

5

Таблиця 9

Середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	V4 лист	V4 корінь	V7 лист	V7 корінь	VT лист	VT корінь	VT квітка / пильники	R1 качани/ маточк ові стовпч ики	R3 21ДПЗ зародо к	R3 21ДПЗ ендоспе рм
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L- Cl.RCc3:2	1 2	25,15	61,31	20,71	42,64	35,96	95,19	298	125,12	21,97	186,52
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	48,34	36,81	42,49	125,25	69,76	55,44	277,93	58	67,08	115,71
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	28,31	51,18	59,2	149,2	70,93	158,32	214,47	120,72	141,85	164,68
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	67,1	327,4 4	85,02	365,51	161,6 5	202,17	787,25	103,63		
pMON264186	P- MISgr.RCc3_1:1 L- MISgr.RCc3_1:1	9 10	38,66	40,25	39,7	139,98	105,2 4	308,24	406,38	239,35	118,54	196,48
pMON264187	P-MISgr.RCc3- 2:2 L- MISgr.RCc3-2:1	11 12	25,9	193,2 5	42,13	291,5	48,02	549,37	87,89	41,83		
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	283,86	238,3 1								
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	51,82	653,3 8								
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	42,49	55,87	41,49	197,51	117,7 7	282,63	1182,96	938,3	815,36	1240,92
pMON264166	P-So.RCc3:2 L- So.RCc3:2	19 20	34,11	215,8 6	125,91	855,23	79,33	237,25	347,99	177,13		

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

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

Таблиця 10

Показники співвідношення експресії корінь / лист для стабільно трансформованих рослин кукурудзи.

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середнє корінь / лист		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	2,44	2,06	2,65
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	0,76	2,95	0,79
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	1,81	2,52	2,23
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	4,88	4,30	1,25
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	1,04	3,53	2,93
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	7,46	6,92	11,44
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	0,84		
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	12,61		
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1,31	4,76	2,40
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	6,33	6,79	2,99

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

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

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

Кожен з гомологів RCc3 промотора продемонстрував патерни експресії в стабільно трансформованій кукурудзі, які не можуть бути передбачені в силу того, що отримані з гомологічних генів, особливо при використанні для трансформації гетерологічних видів, таких як

кукурудза. Більшість промоторів продемонстрували більш високу експресію в корені по відношенню до листа в деяких точках або на стадіях V4, V7 або VT, або на всіх етапах аналізу. Слід зазначити, що величина експресії широко відрізнялася між промоторами. Унікальні властивості експресії кожного з гомологів RCc3 промотора роблять деякі з них більш відповідним для певних типів експресії молекули ДНК, яка транскрибується. Наприклад, експресія молекули ДНК, яка транскрибується, може мати вирішальне значення для засвоєння поживних речовин у ґрунті та яка найкраще експресується в більш пізній стадії розвитку, коли рослина збирається почати розмноження та виробництво насіння, може отримати найбільшу вигоду з таким промотором, як P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11), який збільшує експресію в корені на стадії VT.

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

<110> Monsanto Technology LLC

<120> РЕГУЛЯТОРНІ ЕЛЕМЕНТИ РОСЛИН ТА ЇХНЄ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> MONS:331WO

<150> 61/785245

<151> 2013-03-14

<160> 44

<210> 1

<211> 1500

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 1

```
gttgacgtcg gaagtgtacc gaatacaaca ccaacagggc tagaacgccc ggagagcgag 60
gttcagttc aacctgctga gacagcaggg accctggcta aaccgacgaa aaccgatcta 120
gagaccggtt tagatcgatc tagggtttcg ggctcctgtg ttgataactc tagaactcct 180
cccggaaga ccgtagggg agaagcacgt agaggttgct ctaggaccag caaggccgcc 240
tagaacgccg tcaagtctcg tcgggagacg gcgcgaacag caaggtagaa ggaagaggg 300
gtaaaagggt agtagattga tttgatcga ttgggtcgg atgcctcaat cggccatgat 360
cctctcatat atatagagg ggctggctt atccaatag gaaacatctc cggatacgat 420
ctccaagctt cctatccgga ctctatcaac atatagaatt caatccggac gtgacaaggt 480
aaccctgatt tcgccgatcc ttggatcgac cagatcggtc taatgggctt tatcagccca 540
tactgatcaa caaatcgtcc ttacaagaga aggatccaca tacttagcgt cggactcagc 600
aatcatcaca accataaggc ctccaaccag ggccacctgg tcggacataa catgagtgat 660
cggaaaccca aatgatcag gccattcaa cttagaaca ctgatctctc aaaagacaaa 720
ttcgacctta atattacagg ccgaataact ttctaaatt cattttatc tgtgacactt 780
ttgagtgtca acagatgtct ttctttgca aatattccct ttttatttc taccattag 840
ttactttggc ccttccatt cattgtatgt aaaagtggat actaaagcta acgcaacaag 900
aacaataata aatagatccg gggtagacg tccccacgga tattttacta aaatatcttc 960
tcacagatc tagaaaatcc tcgggcccta tccatatagg gtggtatcac atccatatac 1020
ttatagtagg acagatgagg agatttttt accctcaatt ctaaaattca tactttaat 1080
taaaggaatt taactcagga ccagagcggg gtcgagagag ccatatatgt aacaaaata 1140
cctattagtt tagggcagca gcaataaac cattattcct ttgtccctt attccgtctc 1200
cagctagcta aaagtgtac atatgattaa tcacgacat cgtgcatgca attgcagga 1260
aagtgaagg agcagccagg tgtatacag tctgtagggt tcgctgaca tcgatcacat 1320
ggatatgcat gcatccaaa cacacgtacg tacacttgct ggtgcatgcc ttatgaaatg 1380
gaatactaca cgcagtcca caagttaagc acgcacaggc acacacacag agagacacag 1440
ttgctcgctc aatgcaattg gctggcttat aaataccacc gaagagaacc atcctaaaga 1500
```

<210> 2

<211> 86

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 2

```
acacaccggg agcgattcga tcctcagaa gagctactgc tagctagcta gagctatcat 60
ctgatcgga gcagcaatat aattca 86
```

<210> 3
 <211> 594
 <212> ДНК
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.
 5 <400> 3
 accaacaagc atcatgacaa tggcagcaaa gcattcgtca gagacgacca acaagcatca 60
 cgacactggc ggcaaagcat atcaaaacaa tgtaatgaga tacaatattg ttcataaag 120
 aagcctacct gcatgacct ttctaacaaa ctcaaatga taagggccat gctctgttcg 180
 10 gtgacaacct tcaaggcatc tactttgcca gaatttagct ttgttattac cagcttgta 240
 ttagtctta ctatccagtc tcgaacaact tgggcgccct ttgtctcacc atacctctac 300
 atactgccct ccttgatcaa cacaacattc ttcaacccaa tcccttgga tttgcgcatg 360
 ttacaagggt caaaacagcc agcccatatt gcaagtact aaactaaact atggcca 420
 tgcagcaatc ttgactgcta gtactgtccg gcattatc tgaacaagt ccagatcacc 480
 catctcatca cagtcacatg cattcggtt cagggaacc gtaacacac caccaactag 540
 15 tcagcattgc accaatcttc ctccataa atgcagcaac aatcgagcga cacc 594
 <210> 4
 <211> 88
 <212> ДНК
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.
 20 <400> 4
 aacaccacga accatcacag gcacttatag caacaatcaa gttattctg ccttgtgcac 60
 tcgtggcga gtagtaatac atagcaaa 88
 <210> 5
 <211> 1500
 25 <212> ДНК
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.
 <400> 5
 ttgccggcct gtgtgatgtt gcgccccac caaccttga tttgcctgc tgcctgtca 60
 gccaacggtt ggtagtccac cctctcaaa cgtcgaccg aagtctgtc gactccaga 120
 30 gaaaatattg tatgtaacat atactattac tactacagct gaacacgtaa caatgatc 180
 ttatttgtt atgccgaaag caccgtgcta aagaccacct atcgccctgg ttgggatcga 240
 ggccctgtct ctagccggt tgcacagac gtgtgcgtgc atcgcatgac tggcatgta 300
 gttgtggtc ataaataatg tctaacaata ttaaggaat tcctagtatg cgtgggac 360
 atttttgat gttggtctt gcggcaggtc tcacccatgc atgacggatt gagaacaagg 420
 35 gagactggac cagcatgtaa aagataatga tgaaggcgag ccattgtgac ggtgtaccg 480
 gacaggcaga cgcgggcaaa catcgaagag ggagatagcg tgcgtgctaa tgtttgtg 540
 gctcgcattg tcaatgactc atacagattt cggtagctg ctaaaatcat tcagctgtc 600
 ggcaagcatg ggccaacaa tctagcaaca atccatgtt gccatgatg caatagggaag 660
 taatagaatc cacttagctt ctatgtccta cctggatcct cctttattt atagcatat 720
 40 attttgtgt agtggaggca cacatcttta ttttcatgg ataattttt gttatgtga 780
 tatctgtcca aataaataac gtacgtgtcc ttcaatctta gactccaggt agattgatca 840
 atgtagtgtt ctccatatt ccttttgtt ttgtgtgcc atgtctcaag catgcatgtg 900
 gaatgaaaag ctggaagctt ggcatcaatt gcctaaggag ccataccata aattaaacca 960
 ttgtctgata tggccacaat tttttaaca agctatgcca tagtcattca tgtgccacg 1020
 45 ttgtgaatc gcctcaatta cgtgtggaac atgatggtt tttaacaac acttggtgat 1080
 ttctattctg gcctactctt gcatctagga tcgtgtgtt agccatgtgc acatatttag 1140
 ctactagta gcaaaggcat gactgagttg ctgatgggt tacaataacc agcataagta 1200
 ttcaataat tgaagtgaag cactgtcatg aacatatgag aaaacttaca ttataattg 1260
 cttggctaga tgaacaccta gctgattcct tggcgacgac aacatccctc ctgttccat 1320
 50 actttctaa taattattt tctcccaaaa agtccatgc gctagcatca atgaagaaat 1380
 ataagaaaaa tctcatatc cacatagtaa atagagcatt atcggttcca ttaggaatc 1440
 acctgggag cacctgttg ctcaatcaca ctataatac caccatata ctgttcaag 1500
 <210> 6
 <211> 104
 55 <212> ДНК
 <213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.
 <400> 6
 agaaccatca cagacatacg ctacacgcac cctgtacgaa caaccaacct agctagctac 60
 ctactgaaaa cacacataag ctgttaggc agcatatcat agca 104
 60 <210> 7

<211> 1407

<212> ДНК

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

<400> 7

5 atcttcaaga tgctgtaatc gatttcttga gtcaaatatt ttgttttcat attatttagg 60
 gagtttttca tatggacaat acataaaaaat atatatgcag tgcaagttat tttgtttac 120
 ttattcaatt tatccgttca atcccctaaa caaaatttta cctaaacta ttttatttg 180
 tccaatctac accctaatta tttttctctt tttatttctc tgtgtctgag ttaaattttg 240
 acttcaaatt ttatgaatag atgcaaaaaca tgatgcttta tgctaaaaat ttttactaag 300
 10 aaattttctt tgttatgttc atagggtcaag aatatttaat atgaaattga tcttacatat 360
 ataaaactgt acaaaaagta atcatgaaaa aaattaatat attgttcta acatagagca 420
 ttatgtataa gtcaactgac aaaatttgaa attaaaactc agcttgcatg tgaagaaaca 480
 aaaaaagaga aatctaatta ggggttagatt ggaccaaata aaatagtta agggggggta 540
 aaatgagcca aattttgttc aaggggttaa gtggatcaag taaatagatg aggggggtaa 600
 15 aatggacttt ttcaacaat taacctcatc tatagaaggg taggtgcatc tcagttcgaa 660
 aaataagatg catttgatc tgaaaaatc aatttccct cacacccca aatggaaatt 720
 gtcgtcacta ctacagataac taatgaaagt agactcttat tgtgatgac caaaagggtc 780
 ctgtgattgg aatttcgtcc acactatctt cacaacatcg taatgagata taatattgtt 840
 ccaccagaaa gcctacctgc atgggtcatt ctaataacca actcaaaaaa tggtaaatga 900
 20 catgctcttt tagtgaaaaa cttaaggaa cctagcttgc caaaatttat cttgtcatt 960
 aacaactcag ttcaacat ccagctcaca acaattcac tttttttt gcgggtaaaa 1020
 caacttcact ttacatgttg ccaaatgaa cacaacagtc acgtccatt gaggtacct 1080
 gcaactggg catcctttgt ctgtacctc tacatatctt tgcctctgat caacacaaca 1140
 ttctaaacc catttcttg gcattgccc atgttacaag gcgcaaaaaca accaaccat 1200
 25 atggcaatt actaaactaa actatgctga tcaatgcag caatcttgat cgctagtact 1260
 gtccagcatt acatctgaaa caagtcaga taccatct catcacagtc acatgcatcc 1320
 atggcacgg gaaccgtta cacacaccac caactaatcg gcattgctcc aatcttcta 1380
 taaatcacgc aacgatcagg cgagaca 1407

<210> 8

30 <211> 90

<212> ДНК

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

<400> 8

ataccaatc acacacagtg ttagcacta gcaaccgagg tatttctgag agctttgtgc 60
 35 ccttctgtg gtcgagtaat tagtagcaa 90

<210> 9

<211> 583

<212> ДНК

<213> *Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*

40 <400> 9

tctgctagat gcaacgagct ggaagccagg cctgggacaa ctggttgatg ggcgtgggg 60
 tcatcaaca gagattagct tatccattt tatgtagatg tgccatgtat gcatatgtt 120
 tggataatg gtgactcgtg aggaagcccg tgcacatgtt ttggaatgat ttctgccacc 180
 gatcgagaa ttcaaaataa ggcgagcaca tcatgtttc gttaaataa taaacggtag 240
 45 attgaaataa tgattccagc tagcactata tattgtatt ctacgttaat aattttatat 300
 attgcataag ggtcctcta attcatgcat cactagtagc tagcacgttg agtgatttg 360
 gcatggttc tcaactgtc tcccctgtat cctgatcgat ctctcctca taactggcac 420
 atcccaggac aaccaggcaa cgctcaaac acacatgcgt tgctgattat ccacgtgca 480
 tgatgcagc agccaatcac taaagcatca cctccacac catcgttcag ctataaaac 540
 50 cctgccaac tgcgtgagag gaccatcca aagcacaaga gca 583

<210> 10

<211> 61

<212> ДНК

<213> *Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*

55 <400> 10

cgaagtgcag cactaaagca ccatttctg ctacaccgt ttagtaata atccatcacc 60
 a 61

<210> 11

<211> 1500

60 <212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 11

ttgtgagaca aaaacactgt tgcggctggg aataagccgg ctgataagtt caagcgaaca 60
 ggctgtactt tagtgcttct atttgaacca ttggttctca ctctggctat gcaattgtgc 120
 5 attctcactc tggcttataa tttttcttg ctagtaata gttttgaaa taatgggagc 180
 aaccacttca gttataatat aatgtttgta tgtataatg ggagcaatca ctctgggtta 240
 ttgttgcttg ttataccat gcaggctgca ttatattaat tgcttagttc ctcttggtt 300
 gtatgtgact atgagatgtt tgtgacctct acaggaagtg aagggaagag gattcctgct 360
 ggtttcaaca gacatagcaa gcaaaggggt tgcttctctg attgtgtatc tagatcacag 420
 10 tagtgtgaat gtgcaccaag caaaacttaa attaggtgct ctatccatgt acattaagcc 480
 tagctgtatc aaaaaaaatt cgggtgtatc tgcgtaatat tggatgtata tataagattc 540
 tggcattgga atttataatt tttttgtt ttaattcat tatcacagac gcgtgttgg 600
 cgtgcgcgtc tgtcataagg tgcgtcaca gacgcgttt gactatacgc gtctgtgata 660
 ggggtactac agacgcgtct ttactccacc agtctgtctt ataacctaat cgcagacgcg 720
 15 tgtttgata acgcagacgc ttattggtaa cagcgcgtctg tagaagaaac ttattacaga 780
 cactgttata agcgcgtctg tgatgtgtct taacacgcgt ctgtaattgtg gatttattac 840
 atagtatcgc gcccatatga acgaatgatc gatctaggcc caaagttagt gtatgaaatg 900
 ttcatttacc ttcaatgcg gtttctcaaa aaaaaacgtt ccaatgctaa aaaaaacat 960
 aggaattata tagttttgct gtggcttagt aacttcgtcc aatcgtgcta gtttaattg 1020
 20 tatatacctg taccatgcta ttctctggc ctgtgtctt gcgcatccat tattaatgac 1080
 cagccacgc cagcattca ttctaatca ccagttgctt gacatccaat gtccttcca 1140
 ctacttgcgc acaccgtctg atactccaag atcccaagct aagataacac ccagtgatca 1200
 tatatataaa aacaaacgcc agtgcgagcc tggccatttg cggagccaac cgaagccgtg 1260
 caaaaaatat tcgataccgt atcagggaaa acactagtta tacgaggtag gcaataatcc 1320
 25 atgtttcaaa aaaaacaggt aggcaataat ccagatcgga ctcttctaa ccgggttcac 1380
 atgcataat gaatatgatg gccgggttca catgaacgct agatatcgtg ctagtagtg 1440
 caccgatttc ttaatccga ggctggacta taagtacccc tggtaacacc gtgatcaaag 1500

<210> 12

<211> 98

30 <212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 12

catcgcaaac aagctgctaa tcacttctca agagctctct aactacatta attagctaga 60
 gtgatccgcg aggtagctgg ctgtgatcg agcaatac 98

35 <210> 13

<211> 740

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 13

40 aaatggatga aacaacttgg accaatcaga gatggccacg tcagctcccg atcgtcgtaa 60
 ccgaccaaac ccgatcgata acggtttagg ctccaataca ccgtcggtag caccgggtcg 120
 ctatcatctg cccccgtccc aacgctattg gtatcgctcg cccttatatc ggtcggtagc 180
 ccagtcacc gtcggggcca atcgtccct gtcgtcgcg ctctgtcgg taccgatcgc 240
 caaaaacgcc acgtcaacgg cactgcggtta ccgaccgccg ctggcaccgg ccttagcggg 300
 45 ccacacgacc gatcgtgtt gtacggacgt agaggtgaat catgcgattg aatttctgct 360
 agaggaaagt tatcatctta ttatctcaa cctctctcc tacggctgga tccgacgaaa 420
 atttaccctg gacggtgcca gtaacaattg caggtctcac tcactgtgta aatccagcaa 480
 taaaacacga aggaatatac gtgatctggc cagaacatgc aagagaataa tacagtagtg 540
 ttagagtacg aaacctacac gattcaacga attaataat ggggtcacgt tcacgggtat 600
 50 gctcgcgcac gtccaaaatc caacgacatt ttataagcg gcatgatcca gacgggccag 660
 ctcgagcacc acatggcgtg gctccatctc gcatcccca tcaccgctat aaataccatt 720
 ggccatgcac acccgactc 740

<210> 14

<211> 91

55 <212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 14

ccacacagca caagcagcag cagcagcagc agctcgatcg aactagctta gctactacgt 60
 gcgcgtgcaa caagcagctc gatcgatcg c 91

60 <210> 15

<211> 903
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 15
 5 actataattt tcatagagac catttctccc tccataccat ttaaaaaatt caaacaaaaa 60
 atatctataa gtggccctag gttaagaaaa gtgccagtgg aaatgcatct ttattgacgg 120
 tttcttgta tctattgcca gtaaaaatca tatatttaca ttggcgattc ttgaagcat 180
 accgtcatga caaatctgat ttctattgac agaatgctta agagaatcgc tattggtcat 240
 ttagtgcag catttaattg gtatgttagt ctatgaaata gggaagtggg atttgtatt 300
 10 gagagatatt gtttcattct tagttttacg acaccttga tgatgtagca gcgctggaaa 360
 gagtgttatg aaattcctat tgagaatagc ctacaggtc aacagcatac ttttaaaatt 420
 aaaccagaga tataccaaac ttcagtttct acgatataat atttttctac ctcataagtt 480
 ataatacgtg gtacctcctt tttttatat cctttatta aggacggtag agaacgtcct 540
 ctactcgtat gttgtacacc accggtaacg caattaagta aaacatgcat gtcaagtagt 600
 15 aagtatataa gttggcaact caccagatgg caggagtcct gacctcac cggtagcta 660
 tagctcttgt tacgtgaatt cagcatgatt gctcaactg cttctgtatt tccacatggg 720
 ggagaattgt catactccc cctaacaact ggcgctcca gagacaacca tgcaatgacc 780
 aaaccgatcg aatcacacat gctttgcagc attcatgtac caatgctgcc aagcacgaaa 840
 gcatctcctt ctccgctcca tccatgctca gctataaaaa ccatgccaaag caccctgtga 900
 20 aaa 903
 <210> 16
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 25 <400> 16
 gcatcccaaa gcacacaaga gcacgcagtg cagcactcaa gcacttctg ctactgcac 60
 accgtacca 69
 <210> 17
 <211> 1500
 30 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 17
 aaaaggcact ttctcaaga aacagagtta gagatcaaac caaagtgcta gaaacattgt 60
 aataggtagt tgcaacatat ttaaagggtc aaacctcaca gtttaccct ttctacaaa 120
 35 gttgcattc ctggcctcgt ttaagcttat ttgacttag aatcttcaaa ttgtgctcga 180
 ttgaaccttt actcatatac tttagcaaca agttagtcca agatgtgtg ttggacattc 240
 aatcaccaaa acttatggaa atgggcta atgcccattc ctttcatgg tacaattgt 300
 ttcacagat taagcagaag ctatatcaa cacggcgctt ctacaacagc ttatcagtt 360
 agttgcttct cagaatgaaa ggtaataaac ataagctgct ttctactaga tccttagata 420
 40 agttgctttt ttaacaagca gctctgccaa gcagggccat agtgccatgt tgtaggctgg 480
 tcgctttccc gagccatatg aaggctcgtg gtccatgtgg ctgaaattaa agttgatagg 540
 cccatcgga ccaatggtca attagaggcc caaaattgt gagtcaaatt ttcatttaca 600
 ctccacgct agtaaacgaa aacatatata gtacctatat atcgatttt ttttctggt 660
 gtcttagaaa ctctgcca taatcatgct agtttaatt gtatactgc acaaagctat 720
 45 tcctctggcc ttggttctt gcgctgcat gctgtttat ggatgattgc agccacgcca 780
 cgcattcatt ctcaatcacc attgcttga catctaatt cctctgcacc acttgccac 840
 gctacacacc gtctgatagc ccaggatccc aagctaaaat aacacccaat gatcatgtga 900
 aaacaagtga cagtgcgagc cagcccatgc agcgatctg gccatttgc gagccaaccg 960
 aagccgtgca caaaatattc gataccgtat aaggggaaac actagtata cgaggtaggc 1020
 50 aaatataatc ctcttctaa ccggcgcccg ggttcacatg catatatgat ggccgccagc 1080
 cgggttcaca tgatgaacgc tatgtgctt agtgcacgat ttattaatct cccgaggctg 1140
 tactataaat acatcggtaa tactgtgatc aaagcatcgc aaagaagatc tctaagactg 1200
 tctccagcaa cgctctctat atctatcctc tatactgtc cttacagtc tcctctaaaa 1260
 gattccatcc tctatatctc ctctctcc aacaacggcc tctaaatcac gtctctata 1320
 55 cgcaaatacc tatattagag acatttttaa tttttaatt ttgtacata cgtatttgc 1380
 atactctcaa atgtattgta catattttag tttgtctaaa ccggtgttt aaagtattca 1440
 aatggataga ggagaggaga gagaaactct atatattag gatccagcag cgtctctaa 1500
 <210> 18
 <211> 172
 60 <212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 18
 attagagga ccgttagag gacgtgctg gagggagtag aggacgacag cgttcttaa 60
 aatttagagt acaggatact ttagaggacc tgctggaggc agtctaaca ctcatttgg 120
 5 ctagagagag tgatcgcgag gtagctagct ggcttgtagt cgatcgagca aa 172
 <210> 19
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> *Saccharum officinarum*
 <400> 19
 caaattaaag ttgataggcc catcggaaga aatgatcaat gtaaggccca aaatttgtgt 60
 ctgaaatgtt cgtttacatt ttaagctaa ataaaaacat aggaattata tagtttgct 120
 ggtggcttag aaacttcgtc caaaatatta aaaaaaaga aaagaaactt cgtccaaaat 180
 ggtgcttagt ttaatttga tacctgcacc atgctattcc tctggccttg tcttttgcg 240
 15 catctatcca tgcatttga tgatcgagc cagccacgc aattcattct taatcccat 300
 ttgcttgaca tccaatgtcc tctacaccac cacttgcgca ccctacacac cggccatttg 360
 atacgccaag atcccaagct gaaataacac ccaatgatca tatgaaaaca agcgtgagtg 420
 cgagcctgcc catgcagcga tcttgccat ttgcggagcc aaccgaagcc cgtgcacaaa 480
 atattcgaga ccgtataagg gaaaacacta gttatacgca atgtccacaa taatccagat 540
 20 cgactcttc taaccgggtt cacatgaacg ctgttggtcc tagtcaccg atttctaaa 600
 tccaaggct cgactataaa taccctgtgt atttcaccg tgatc 645
 <210> 20
 <211> 86
 <212> ДНК
 25 <213> *Saccharum officinarum*
 <400> 20
 aaagcatcgc aaacaagcta aagagctctc taactacatt gattagagtg atctgcgcta 60
 gaaggaggct agcttgtagt cgagca 86
 <210> 21
 30 <211> 1563
 <212> ДНК
 <213> *Setaria italica*
 <400> 21
 agaccagca acctaccgag ggggtaccg aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60
 35 gatcaggaac ttgaagggtga actcgaacac acgatttaga caagtcggg ctgcttatgc 120
 cgcataatac cccatgtcat gtgtgttggg tggattgtat tgattgatca gatatttga 180
 gggggccctg cctgcctta tattgccc atgcccaggc agggctacag gtcggtgtt 240
 gtacaagagt actagtggg ttgaccagc gagtctact ctaattgcta caagtagttt 300
 cctaattcct gactagtctt gtccgccac gtagaccacg acgtcttgca ctagtctct 360
 40 gtgttgata catcttggtg tacagtccga tattgttaga ctatccaagc tcccagtag 420
 gcccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggtcagtac tatccttatc 480
 tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagttaagc tcgtaacca ccaatatttg 540
 gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgtacc caccaatatt tctgtgcata 600
 gagatctctt aggcataaaa ttagcagtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660
 45 caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgataca tgtcatgctc 720
 cgaacaaata ttatgggta cccgaaagggt taatttttg tagtattat gagggggagg 780
 ggggctgtga cgaaaaaaat aacttagcta agcgtaatg gcttaaaaac atacaatgtt 840
 gttccagcat caagcctacg tgatcattc acaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900
 50 ttcttttag tgcaaaactt aaggacacct acctgcaaa acttagctt gttaccaga 960
 atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020
 tcatgcatga tttctttaa taagtatcga gcaatatggt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080
 acctctattg tctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tgggtcaagg gggctcaagc 1140
 cccctacct ctccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattcttaa accatttct 1260
 55 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
 aaactatgat ccacatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
 ctgtatcgt agtactgtcc ggcattatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440
 acagtcacat gcattcatgg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
 caacactctt cctctataa atgcagcgag cgggggacac cataaaccat cacaggcact 1560
 60 tag 1563

<210> 22
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> *Setaria italica*
 5 <400> 22
 cgatcaagtt aattttgttt ctgctttgtg cgcctgtgtt ccagtaatta cttccgtgt 60
 agcaaaa 67
 <210> 23
 <211> 1528
 10 <212> ДНК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 23
 ggaagctaac tagtcacggc gaatacatga cgacatcggc ctacaacgca caactcttg 60
 gcataaaagc ttcaatttca atgccctat ctggaagccc taggcgccgc gcaaatgtaa 120
 15 aacattcgct tcgcttggtt tttatccaa aatagagtat ggacctcga cagattggca 180
 acccggtgggt aatcgaaaaat ggctccatct gccctttgt cgaaggaatc aggaaacggc 240
 cctcacctcc tggcggagtg tagatatgtg aaagaatcta ggcgacactt gcagactgga 300
 caacatgtga acaaataaga ccaacgttat ggcaacaagc ctgcagccta ctcaagtgtt 360
 gggaggccac cgcattgtcc aacgaagcgc caaagaaagc ctgcagact ctaatgctat 420
 20 tagtcgccta ggatatttgg aatgaaagga accgcagagt tttcagcac caagagcttc 480
 cgggtggctag tctgatagcc aaaattaagg aggatgccaa aacatgggtc ttggcgggcg 540
 cgaaacacct tgataggttg ctacctttt aacatgttcg ggccaaaggc cttgagacgg 600
 taaagtttc tatttgcgt tgcgcatgta caattttatt cctctattca atgaaattgg 660
 tggctcactg gttcattaaa aaaaaaagaa tctagcctgt tcgggaagaa gaggatttta 720
 25 ttcgtgagag agagagagag agagagagag agaggagag agaaggagga ggaggatttt 780
 caggctcgc attgccaac ctctgcttct gttggccaa gaagaatccc aggcgcccat 840
 gggctggcag ttaccacgg acctacctag cctaccttag ctatctaagc gggccgacct 900
 agtagctacg tgcctagtgt agattaaagt tggcgggcca gcaggaagcc acgtgcaat 960
 ggcattccc cctgtccttc gcgtacgtga aaacaaaccc aggtaagctt agaattctt 1020
 30 tgcccgttgg actgggacac ccaccaatcc caccatgcc ccatattcct ccggtctcgg 1080
 ttcattgtat gtctctctt gtgtgatcac ggagcaagca ttctaaacg gcaaaagaaa 1140
 atcaccaact tgctcacgca gtcacgtgc accgcgcgaa gcgacgccc ataggccaag 1200
 atcgcgagat aaaataacaa ccaatgatca taaggaaaca agcccgcgat gtgtcgtgtg 1260
 cagcaatctt ggtcatttgc gggatcgagt gcttcacggc taaccaaata ttcggccgat 1320
 35 gatttaacac attatcagc tagatgtacg tacgatttgt taattaatct acgagccttg 1380
 ctaggcagg tgttctgcca gccaatccag atcgccctcg tatgcacgct cacatgatgg 1440
 cagggcaggg ttcacatgag ctctaacggt cgattaatta atcccggggc tcgactataa 1500
 atacctcct aatcccatga tcaaaacc 1528
 <210> 24
 40 <211> 99
 <212> ДНК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 24
 atctcaagca gcctaactcat ctccagctga tcaagagctc ttaattagct agctagtgt 60
 45 tagctgcgt tgtgatcgt cgatctcggg tacgtagca 99
 <210> 25
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(27)
 <223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_1.
 <400> 25
 55 cagcacgttg gcgcacacgc ccagctt 27
 <210> 26
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>

```

<221> misc_feature
<222> (1)...(27)
<223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_1.
<400> 26
5  gcacaccgcs gcctcsaggt cgacgag 27
  <210> 27
  <211> 27
  <212> ДНК
  <213> Штучна послідовність
10 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (1)...(27)
  <223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_2.
  <400> 27
15  aggttgatgc cgagsatgtt gsccttg 27
  <210> 28
  <211> 28
  <212> ДНК
  <213> Штучна послідовність
20 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (1)...(28)
  <223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_2.
  <400> 28
25  cttgccgcag trgttgagga kgaggctg 28
  <210> 29
  <211> 2001
  <212> ДНК
  <213> Штучна послідовність
30 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (1)...(2001)
  <223> Кодон-модифікована послідовність GUS з інтроном, який вирізається
  <400> 29
35  atggtgaggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60
  ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
  gagtctaggg ccattcgccgt gcccggttc ttcaacgacc agtcgccga cgccgacatc 180
  cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatccgaa gggctgggcg 240
  ggccagcgca tcgtgctccg cttgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
40  aatcaggagg taagttctg ctctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 360
  gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 420
  gctttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 480
  aaatttgttg atgtgcaggt gatggagcac cagggcggtt acaccccggt cgaggccgac 540
  gtgacgccgt acgtgatcgc cgggaagtcc gtccgcatca ccgtctcgt gaacaatgag 600
45  ctgaactggc agaccatccc gcctggcatg gtcacaccg acgagaacgg caagaagaag 660
  cagtcctact tccacgactt ctcaactac gctggcatcc accgctccgt gatgctctac 720
  accactccca acacctgggt ggacgacatc accgtgttca cccacgtggc ccaggactgc 780
  aaccacgcct ccgtggactg gcaagtcgtt gccaacggcg acgtcagcgt cgagctgcgc 840
  gacgccgacc agcaagtcgt tgccaccggc cagggcacca gcggcaccct ccaagtcgtc 900
50  aaccctcacc tctggcagcc tggcgagggc tacctctacg agctgtgcgt caccgccaag 960
  agccgactg agtgcgacat ctaccctctc cgcgtcggca tcaggagcgt cgctgtcaag 1020
  ggcgagcagt tcctcatcaa ccacaagcct ttctacttca ctggtttcgg ccgccacgag 1080
  gacgctgacc tgaggggcaa gggtttcgac aacgtcctga tggccacga ccacgctctg 1140
  atggactgga tcggtgcaa cagctacagg accagtcact acccgtagcg tgaggagatg 1200
55  ctggactggg ctgacgagca cggtatcgtc gtgatcgacg agactgctgc ggtcggtttc 1260
  aacgtgtctc tgggcattgg ttcgaggct gggaacaagc cgaaggagct gtactctgag 1320
  gaagctgtca acggcgagac tcagcaagct catctccagg cgattaagga gctgattgcc 1380
  agggacaaga accatccgtc tgcgtgatg tggctattg cgaatgagcc ggacaccaga 1440
  ccgcaagggg cgcgtgaata cttcgcgccg ctggcggagg cgactcgcaa actggaccca 1500
60  acccgcccaa tcacgtgcgt caatgtcatg ttctgcgacg cccatacggg tacgatctcg 1560

```

gacctgttcg atgttctttg tctcaatcgg tactatgggt ggtatgttca gagcggggat 1620
cttgagacgg cggagaaggt tcttgagaag gaactcctgg cgtggcaaga gaagctccat 1680
cagccgatca ttatcacgga gtacggggtt gacacacttg cgggccttca cagtatgtac 1740
acagatatgt ggtcggagga ataccagtgt gcatggttg atatgtacca tcgtgtcttc 1800
5 gaccgggttt cagcgggtgt cggcgaacaa gtctggaact tcgcagactt cgccacgagc 1860
caaggggatac tgcgggtagg aggggaacaag aagggaatct tcacacggga tcggaagccc 1920
aagtcagcag ccttcctgtt gcagaagcga tggacaggaa tgaacttcgg agaaaagcca 1980
cagcaaggcg gaaagcagtg a 2001
<210> 30
10 <211> 1812
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1)...(1812)
<223> Кодон-модифікована послідовність GUS.
<400> 30
atggtgaggg ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60
ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgt ggtgggagtc cgccctccag 120
20 gagtctaggg ccatcgccgt gccgggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatccgaa gggctgggcg 240
ggccagcgca tcgtgtccg cttcgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
aatcaggagg tgatggagca ccagggcgggt tacacccgt tcgaggccga cgtgacgccg 360
tacgtgatcg ccgggaagtc cgtccgcatc accgtctgcg tgaacaatga gctgaactgg 420
25 cagaccatcc cgcctggcat ggtcatcacc gacgagaacg gcaagaagaa gcagtctac 480
ttccagact tttcaacta cgctggcatc caccgctccg tgatgtcta caccactccc 540
aacacctggg tggacgacat caccgtggtc acccagctgg cccaggactg caaccacgcc 600
tccgtggact ggcaagtcgt tgccaacggc gacgtcagcg tcgagctgcg cgacgccgac 660
cagcaagtcg ttgccaccgg ccagggcacc agcggcacc tccaagtcgt caaccctcac 720
30 ctctggcagc ctggcgaggg ctacctctac gagctgtgcg tcaccgcaa gagccagact 780
gagtgcgaca tctacctct ccgcgtcggc atcaggagcg tcgtgtcaa gggcgagcag 840
ttctcatca accacaagcc ttctacttc actggttcg gccgccacga ggacgctgac 900
ctgaggggca aggggttcga caacgtcctg atggtccacg accacgtct gatggactgg 960
atcggtgcca acagctacag gaccagtcac tacccgtacg ctgaggagat gctggactgg 1020
35 gctgacgagc acggtatcgt cgtgatcgac gagactgtc cgtcgggtt caacctgtct 1080
ctgggcattg gtttcgagc tgggaacaag ccgaaggagc tgtactctga ggaagctgtc 1140
aacggcgaga ctacgaagc tcatctccag gcgattaagg agctgattgc cagggacaag 1200
aaccatccgt ctgtcgtgat tgggtctatt gcgaatgagc cggacaccag accgcaaggg 1260
gcgcgtgaat acttcgcgcc gctggcggag gcgactcgca aactggaccc aaccgtcca 1320
40 atcacgtgcg tcaatgtcat gttctgcgac gccatacgg atacgatctc ggacctgttc 1380
gatgttctt gtctaatcg gtactatggg tggatgttc agagcgggga tcttgagacg 1440
gcggagaagg ttcttgagaa ggaactcctg cgtggcaag agaagctcca tcagccgac 1500
attatcacgg agtacggggt tgacacactt cggggccttc acagtatga cacagatatg 1560
tggcggagg aataccagtg tgcattggtg gatatgtacc atcgtgtct cgaccgggtt 1620
45 tcagcgggtg tcggcgaaca agtctggaac ttcgcagact tcgccacgag ccaagggata 1680
ctgcgggtag gaggaacaa gaagggaatc ttacacggg atcggaagcc caagtcagca 1740
gccttctgt tgcagaagcg atggacagga atgaacttcg gagaaaagcc acagcaaggc 1800
ggaaagcagt ga 1812
<210> 31
50 <211> 1812
<212> ДНК
<213> Escherichia coli
<400> 31
atggtccgtc cttagaaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
55 ttcatgtcg atcgcaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
gaaagccggg caattgtgt gccaggcagt ttaacgac agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgtcgcg ttctgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcagggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgcacgccg 360
60 tatgtattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420

cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480
 tccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgacgcg taatgtctta caccacgccg 540
 aacacctggg tggacgatat caccgtggtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg 600
 tctgttgact ggcaagtggt ggccaatggt gatgtcagcg ttgaactgcg tgatgcggat 660
 5 caacaggtgg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtggg gaatccgcac 720
 ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat gaactgtgcg tcacagcaa aagccagaca 780
 gagtgtgata tctacccgct tcgctcggc atccggtcag tggcagtga gggcgaacag 840
 ttctgatta accacaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac 900
 ttgctggca aaggattcga taactgtctg atggtgcacg accacgcatt aatggactgg 960
 10 attggggcca actcctaccg tacctgcgac tacccttacg ctgaagagat gtcgactgg 1020
 gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgctg ctgtcggctt taactctct 1080
 ttaggcattg gtttgaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140
 aacggggaaa ctacgaagc gcacttacag gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200
 aaccaccaa gcgtggtgat gtggagtatt gccaacgaac cggatacccg tccgaaggt 1260
 15 gcacgggaat atttcgcgc actggcgga gcaacgcgta aactcgacc gcgcgtccg 1320
 atcactgcg tcaatgtaat gttctgcgac gtcacaccg ataccatcag cgatctctt 1380
 gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga ttggaaacg 1440
 gcagagaagg tactggaaaa agaactctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500
 atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560
 20 tggagtgaag agtatcagtg tgcattgctg gatattgat accgcgtctt tgatcgctc 1620
 agcgccgtcg tcggtgaaca ggtatggaat ttgcgcgatt ttgcgacct gcaaggcata 1680
 ttgcgcgttg gcggaacaa gaaagggatc ttactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740
 gctttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaactcgt gtgaaaaacc gcagcaggga 1800
 ggcaacaat ga 1812
 25 <210> 32
 <211> 2001
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2001)
 <223> Химерна кодуєча послідовність, яка складається з нативної GUS-кодуєчої
 послідовності E. coli з інтроном, який вирізається.
 <400> 32
 35 atgtccgct ctgtagaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
 ttcagtctg atcgcaaaa ctgtggaat gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgatc agttcgccga tgcatatt 180
 cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcaagctt ttataccgaa aggttgggca 240
 ggccagcgtg tctgtgctcg ttctgatcg gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat 300
 40 aatcaggaag tgatggagca tcaggcgccg tatacgccat ttgaagccga tgcagccg 360
 tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag ttctgcttc tacctttgat atatatata 420
 taattatcat taattagtag taatataata ttcaaatat tttttcaa ataaaagaat 480
 gtagtatata gcaattgctt ttctgtagt tataagtgtg tatattttaa ttataact 540
 ttctaata tgacaaaat ttgtgtagt gcaggtatca ccgtttgtg gaacaacgaa 600
 45 ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
 cagtctact tccatgattt cttaactat gccggaatcc atcgacgcg aatgctctac 720
 accacgccga acacctgggt ggacgatac accgtggtga cgcattgcg gcaagactgt 780
 aaccacgcgt ctgttactg gcaggtggtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt 840
 gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta cggggacttt gcaagtgggt 900
 50 aatccgcacc tctggcaacc ggtggaaggt tatctctat aactgtcgt cacagccaaa 960
 agccagacag agtgtgatat ctacccgctt cgcgtcgga tccggtcagt ggcagtgaag 1020
 ggcaacagt tctgattaa ccacaaaccg ttacttcta ctgctttg tctcatgaa 1080
 gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgt aactgtcga tgggtcacga ccacgcatta 1140
 atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctgcatt accctacgc tgaagagatg 1200
 55 ctgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgat aaactgctg tgcggctt 1260
 aactctct taggcattgg ttccaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcga 1320
 gaggcagtc acggggaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
 cgtgacaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggataccgt 1440
 ccgaaggtg cacgggaata ttgcgcga ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg 1500
 60 acgcgtccga tcactgcgt caatgtaat ttctgcgacg ctacaccga taccatcag 1560

gatctcttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
 ttggaacgg cagagaagg actgga meta gaactctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
 cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgtag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
 accgacatgt ggagtgaga gtatcaggt gcatggctgg atatgtatca ccgctcttt 1800
 5 gatcgctga gcgccgtctg cggtaacag gtatggaatt tcgccgatt tgcgacctg 1860
 caaggcatat tgcgcttg cggtaacaag aaagggatct tactcgcga ccgcaaaccg 1920
 aagtcggcgg ctttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaactcgg tgaaaaaccg 1980
 cagcaggag gcaacaatg a 2001
 <210> 33
 10 <211> 435
 <212> ДНК
 <213> *Setaria italica*
 <400> 33
 ggcgccctt gagaagaagc tttggctg ctgcgctat catgtttgt ggcttctgtg 60
 15 ttgtattct tgatctccc ctgctatca ttgtattgt actgcctaa taagtggtag 120
 ttgtagggt attactgtgt ctggtattt acctagagg ggaattatt tctgctatt 180
 ctggtttgc tgttatgta atggtaacc aaagaatgaa gctgcaggct acttgagaa 240
 ggaaggggac ctgctgctt ctatctgtc atgcgtgatt actgaacag tcctgatgat 300
 ctattaatgt tcttgggtca gtgcaagtgt ttggttagc tccaacagg agtggttatg 360
 20 ttggtgaag cagcaatggc cgactgtatg ttttgggtga agctgcaacc tgctgtgct 420
 aactgaacat gcaga 435
 <210> 34
 <211> 2219
 <212> ДНК
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2219)
 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії (EXP).
 30 <400> 34
 attatggcca attattatc ggccctgtcc tggcaggatg agttagtag tgtagctaat 60
 ttgtaggca atgggttga gtaggcca taaatgtgca ggtttacatt tggtagcat 120
 gttagtcat aactcctac actccattt ttgtacgtc gcgatgttc aaccagaaca 180
 gattatgtt cctgggact gtaaatctt tcatcgtcc atccaatga acttgcaaga 240
 35 gattcgtgt agcaaccaaa attgctctgt cctcccaaa aagcattgcc tctggatct 300
 ttccgatcaa gatcagaac cctatatgta ttgtcttat gttcgtgtt gggcgttgg 360
 ttctgtcac cctaaactt ctctgttgg taccagata aatacaaat cggctggtg 420
 gtgaaaaaac cgcctacgaa cactggttc acctataag actactgcac tgttctagc 480
 aggttattt ttctctctg ttttatatt ccaatgata catattaatg ttatcgagc 540
 40 tatgatcta taaatttga catgcttcaa tttttctaa aaactgaat aacagtatg 600
 aaaacctagg ttgatgttc aaatgaact attaacatt ttacgttga acagtacatc 660
 gcgaatggca tattatttg ttgatttat tctaaacacc taaaatgga attgaaaac 720
 gggctctaag ttgagagaa gtttaagggt aatagtatt taaacactc aagttgaga 780
 tccaaaataa ttaactctc acctatcac tcaatcaag ttgttatca gttatgcca 840
 45 tgcacatga tcgctggtt gttattcac ctattttc ctatgtatct actactattg 900
 cgtaaatct aaatattaga tgacatgaa actaaatct ttgaaagat taataggata 960
 cccgcggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgtgaatct aactattgt aaatattgat 1020
 atattttca gaaatgttg attagtct gtgaaatgt gaaccgatat ctctgatag 1080
 gattaatgg gcttaaagct tccactagc gtgtgcatg gcgaaaaaaa atcttgcca 1140
 50 agtggtactc cgtcgggcc acacgccaca agtctcccg gccctgctc gcccttatt 1200
 ccatcgtag ccgcacacgg cgcgccacca gtggcgccg ggatgcgct catctcccg 1260
 gcggccacct cgcgcggtt agatttcct gggcccccct cgcggtaccg tcacatatt 1320
 ttggcgctc ttctctgct cccctctct cccgaaccg agataccacc gactcgagc 1380
 ctgaacacaa gcaacaagc agtgatccc gaccgacct ctccgttagc cgctcactc 1440
 55 gccctctgc ttgttactg ccacgttct ctgaatgct tctgtgtg ttgattgcta 1500
 gagtgttta gctggatcta gaattacat ctgaaatct gttctgctg tctgattac 1560
 ttgccctct tttagcagc aaaatatagg gacatgtag tacgaaacg agatagaacc 1620
 tacacagcaa tacgagaaat gtgaattg gtgcttagc gtattattt aagcacatg 1680
 tgggttata gggcacttg attcagaagt ttgctgtaa ttaggcaca ggctcctac 1740
 60 tacatgggtc aatagtatag ggattcatat tataggcag actataataa ttgttctc 1800

tgacagagctt attatttggc aaaattagat attcctattc tgttttgtt tgtgtgctgt 1860
 taaattgtta acgcctgaag gaataaatat aaatgacgaa attttgatgt ttatctctgc 1920
 tcctttattg tgaccataag tcaagatcag atgcactgtg tttaaattatt gttgtctgaa 1980
 gaaataagta ctgacagat ttgatgcat tgatctgctt gttgttgta acaaaattta 2040
 5 aaaataaaga gtttcctttt tgttgctctc ctacccctc gatggtatct agtatctacc 2100
 aactgacact atattgcttc tctttacata cgtatcttgc tcgatgcctt ctccctagtg 2160
 ttgaccagtg ttactcacat agtctttgct catttcattg taatgcagat accaagcgg 2219
 <210> 35
 <211> 2224
 10 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2224)
 15 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії (EXP).
 <400> 35
 attatggcca attatttattc ggcctggtcc tggcaggatg agttagtag tagtaccta 60
 ttgtaggca atgggtttga gtaggcca taaatgtgca ggtttacatt tggttgcca 120
 gttagtcat aactcctac acttcattt ttgtacgtcg gcgatgtttc aaccagaaca 180
 20 gattatgttt ccttgggact gtaaatttct tcatcgctcc atccaatga acttgcaaga 240
 gattcgtgtt agcaaccaaa attgctctgt ccttcccaa aagcattgcc tctggatctt 300
 ttccgatcaa gatcagaac cctatatgta ttgttctat gttctgctgt gggctggttg 360
 ttctgtcac cctaaactt ctctgttgg taccagata aatacaaat cggtggttg 420
 gtagaaaaac cgcctacgaa cactggttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480
 25 aggttattt ttctctctgt ttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540
 tatgatcta taaattgtga catgctcaa tttttctaa aaactgaat aacagtatgt 600
 aaaacctagg ttgatgttc aaatgaactt attaacatt ttacgttga acagtacatc 660
 gcgaatggca tattatttg ttgcattat tctaaacacc taaaatgga attgaaaac 720
 gggctctaag ttgagagaa gtttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
 30 tccaaaataa ttaactctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcca 840
 tgatcatgta tcgctggtt gttattcac ctcatctcg ctatgtatct actactattg 900
 cgtaacttc aaatattaga tgacatgta actaaaatct ttgaaagat taataggata 960
 cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgtgaatct aactattgt aaatattgat 1020
 atattttca gaaatgttg atttagctt gtgaaatgt gaaccgatat ctctgatag 1080
 35 gattaatgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttgcca 1140
 agtgttact cgtcgggcc acacgccaca agtctcccg gccctcgtc gcccttacc 1200
 ccactgtacc cgcacacgg cgcgccaca gtggcgccg ggatgcgct catctcccg 1260
 gcggccacct cgcgcggtt agattccct gggccccct cgcggtaccg tcacatatt 1320
 ttggcgctc ttctctcg cccctctct cccgaaccg agataccacc gagtcggcag 1380
 40 ctgaacacaa gcaacaagca agtgatccg gaccggacc accgtctcg gtacgcgctc 1440
 actccgccct ctgctttgt tactgccagc ttctctgaa tgctctctg tgtggtgatt 1500
 gctgagagt gtttagctg atctagaatt acactctgaa atcgtgttct gcctgtgctg 1560
 attactgcc gtcctttgta gcagcaaat ataggacat ggtagtacga aacgaagata 1620
 gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta attggtgct tagcggatt tatttaagca 1680
 45 catgttggtg ttataggga ctggattca gaagttgct gtttaattag gcacaggctt 1740
 catactacat ggtcaatag tatagggtt catattatag gcgatactat aataattgt 1800
 tcgtctgag agcttattat tgccaaaat tagatattcc tattctgtt ttgtttgt 1860
 gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaat acgaaattt gatgtttatc 1920
 tctgtcctt tatttgacc ataagtaag atcagatgca ctgtttta atattgtt 1980
 50 ctgaagaaat aagactgac agtatttga tgcattgac tgcgtgtt ttgtaacaaa 2040
 atttaaaaat aaagagttc cttttgtt ctctcttac ctctgatgg tatctagat 2100
 ctaccaactg aactatatt gcttctctt acatacgtat ctgctcgat gccttctccc 2160
 tagtgtgac cagtgttact cacatagct ttgctcatt cattgtaatg cagataccaa 2220
 gcgg 2224
 55 <210> 36
 <211> 2966
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <221> misc_feature

<222> (1)...(2966)

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

<400> 36

5 ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgttctca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggccgatt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga 300
10 aacctcctcg gattccattg cccagctatc gtgacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atcggaaagt aactagtcac 540
ggcgaataca tgacgacatc ggcctacaac gcacaacttc ttggcataaa agcttcaatt 600
15 tcaatgcccc tatctggaag ccctaggcgc gcgcgaaatg taaaacattc gcttcgcttg 660
gcttggtatc caaaatagag tatggacctc cgacagattg gcaacccgtg ggtaatcgaa 720
aatggctcca tctgccctt ttgtgaagga atcaggaaac ggccctcacc tcttggcgga 780
gtgtagatat gtgaaagaat ctaggcgaca ctgcagact ggacaacatg tgaacaaata 840
agaccaacgt tatggcaaca agcctcgacg ctactcaagt ggtgggaggc caccgcatgt 900
20 tccaacgaag cgccaaagaa agccttcag actctaagc tattagtcgc ctaggatatt 960
tggaatgaaa ggaaccgcag agttttcag caccaagagc ttccgggtgc tagtctgata 1020
gccaaaatta aggaggatgc caaaacatgg gtcttgccgg gcgcgaaaca cttgatagg 1080
tggcttacct ttaacatgt tcgggcaaaa ggccttgaga cggtaaagt ttctatttgc 1140
gcttgcgcat gtacaatttt attcctctat tcaatgaaat tgggtgctca ctggttcatt 1200
25 aaaaaaaaaa gaatctagcc tgttcgggaa gaagaggatt ttattcgtga gagagagaga 1260
gagagagaga gagagaggga gagagaagga ggaggaggat ttcaggctt cgcattgcc 1320
aacctctgct tctgttgcc caagaagaat cccaggcgc catgggctgg cagttacca 1380
cggacctacc tagctacct tagctatcta agcgggcca cctagtagct acgtgcctag 1440
ttagattaa agttggcggg ccagcaggaa gccacgctgc aatggcatct tcccctgtcc 1500
30 ttcgcgtacg tgaacaaaaa cccaggtgaa cttagaatct tcttgcctgt tggactggga 1560
caccaccaa tcccaccatg ccccgatatt cctccggtct cgggtcatgt gatgtcctct 1620
cttgtgtgat cagggagcaa gcattcttaa acggcaaaag aaaatcacca acttgctcac 1680
gcagtcacgc tgcaccgcgc gaagcgacgc ccgataggcc aagatcgca gataaaataa 1740
caaccaatga tcataaggaa acaagcccgc gatgtgtcgt gtgcagcaat ctgggtcatt 1800
35 tgcgggatcg agtgcttcac ggtaaccaa atattcgcc gatgatttaa cacattatca 1860
gcgtagatgt acgtacgatt tgtaattaa tctacgagcc ttgctagggc aggtgttctg 1920
ccagccaatc cagatcgccc tcgtatgcac gtcacatga tggcaggga gggttcacat 1980
gagctctaac ggtcgattaa ttaatcccg ggctcgacta taaatactc cctaatacca 2040
tgatcaaaac catctcaagc agcctaata tctccagctg atcaagagct cttaattagc 2100
40 tagctagtga ttgctgcgc ttgtgatcga tcgatctcgg gtacgtagca cggaccggac 2160
cgaccgtctt cggtagcgc tcactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg 2220
aatgctctct tgtgtgggta ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg 2280
aaatcgtgtt ctgcctgtgc tgattactg ccgtccttg tagcagcaaa atataggac 2340
atggtagtac gaaacgaaga tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg 2400
45 cttagcggta tttatttaag cacatgttgg tttataggg cacttggtt cagaagtttg 2460
ctgttaattt aggcacaggc ttcatctac atgggtcaat agtataggga ttcatattat 2520
aggcgatact ataataattt gttcgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt 2580
cctattctgt tttgtttgt gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa 2640
tgacgaaatt ttgatgttta tctctgtcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg 2700
50 cactgtttt aaatattgtt gtctgaagaa ataagtactg acagtattt gatgcattga 2760
tctgctgtt tgtgttaaca aaatttaaaa ataaagagtt tccttttgt tgctctcctt 2820
acctctgat ggtatctagt atctaccaac tgacactata ttgcttctt ttacatacgt 2880
atctgtctg atgccttct cctagtgttg accagtgtta ctacatagt ctttgctcat 2940
ttcattgtaa tgcagatacc aagcgg 2966
55 <210> 37
<211> 2005
<212> ДНК
<213> Zea mays subsp. mexicana
<400> 37
60 gtcgtgccc tctctagaga taaagagcat tgcattgtcta aagtataaaa aattaccaca 60

tattttttg tcacacttat ttgaagtga gtttatctat ctctatacat atatttaaac 120
 ttactctac aaataatata gtctataata ctaaaataat attagtgtt tagaggatca 180
 tataaataaa ctgtagaca tggctaaag gataattgaa tatttgaca atctacagt 240
 ttatctttt agtgtgcatg tgatctctct gttttttg caaatagctt gacctatata 300
 5 atacttcatc cattttatta gtacatccat ttaggattta gggttgatgg ttctataga 360
 ctaattttta gtacatccat ttattcttt ttagtctcta aatttttta aactaaaact 420
 ctattttagt tttttatta ataatttaga tataaaatga aataaaaataa attgactaca 480
 aataaaacaa atacccttta agaaataaaa aaactaagca aacattttc ttgttcgag 540
 tagataatga caggctgttc aacgccgtcg acgagtcta cggacaccaa ccagcgaacc 600
 10 agcagcgtcg cgctgggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtag ctgcctctgg 660
 acccctctcg agagtccgc tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 720
 gcgtggcgga gcggcagacg tgaggcggca cggcaggcgg cctctctc ctctcacggc 780
 accggcagct acgggggatt ctttccac cgctcctcg ctttccctc ctgcccgc 840
 gtaataaata gacacccct ccacacctc ttcccaac ctggtgtcg ttggagcgc 900
 15 acacacacgc aaccagatct ccccaaatc cagccgtcgg cacctcgcct tcaaggtacg 960
 ccgctcatcc tccccccc cctctctcta cttctctag atcggcgatc cgttccatgg 1020
 ttagggcccg gtatgtctac ttctgtcat gttgtgta gagcaaacat gttcatgtc 1080
 atgtttgta tgatgtggtc tgggtggcg gtcgttctag atcggagtag gatactgtt 1140
 caagctacct ggtggattta ttaatttgt atctgtatgt gtgtgccata catctcata 1200
 20 gttacgagtt taagatgatg gatgaaata tcatctagg ataggatatac atgttgatgc 1260
 gggtttact gatgcatata cagagatgct ttttctcg ctgtgtgtg atgatatgt 1320
 ctggttggtc ggtcgttcta gatcggagta gaatactgt tcaactacc tgggtgatt 1380
 attaaaggat aaagggtcgt tcatagtcgg agtagaatac tgttcaaac tacctggtg 1440
 atttataaa ggtatctgt atgtgtcct acatctcat agttacgagt ttaagatgat 1500
 25 ggatggaaat atcgtatctag gataggata catgttgatg cgggtttac tgatcatat 1560
 acagagatgc tttttcgc ttggtgtga tgatgtggtc tgggtggcg gtcgttctag 1620
 atcggagtag aatactgtt caactacct ggtggattta ttaatttgt atctttatgt 1680
 gtgtgccata catctcata gttacgagtt taagatgatg gatgaaata ttgatctagg 1740
 ataggatatac atgttgatgt gggtttact gatgcatata catgatggca tatgcggcat 1800
 30 ctattcatat gcttaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgtttataa 1860
 ttatttgat ctgatatac ttgatgatg gcatatgcag cagctatatg tggattttt 1920
 agccctgcct tcatacgta tttattgct tggtagtgt tctttgtcc gatgtcacc 1980
 ctgtgttg gtgatacttc tgcag 2005
 <210> 38
 35 <211> 804
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa
 <400> 38
 accgtctcg gtacgcgctc actccgcct ctgccttgt tactgccacg ttctctgaa 60
 40 tgctctctg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
 atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta attggtgct 240
 tagcgttatt tatthaagca catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgct 300
 gtttaattag gcacaggctt catactacat ggtcaatag tatagggatt catattatag 360
 45 gcgatactat aataattgt tctgtcgag agcttattat ttgcaaaat tagatattcc 420
 tattctgtt ttgttgtgt gctgttaa attgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaattt gatgttatc tctgtcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
 cttgtttta atattgtgt ctgaagaaat aagtactgac agtatttga tgcattgatc 600
 tgctgttg ttgaacaaa atttaaaat aaagagttc cttttgtg ctctcttac 660
 50 ctctgatgg tatctagat ctaccaactg acactatatt gcttcttt acatacgtat 720
 ctgtcgtat gcctctccc tagtgtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcatt 780
 cattgtaatg cagataccaa gcgg 804
 <210> 39
 <211> 253
 55 <212> ДНК
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 39
 gatgttcaa acattggca ataaagttc ttaagattga atcctgttc cggctctgcg 60
 atgattatca tataattct gttgaattac gtaagcatg taataataa catgtaatgc 120
 60 atgacgttat ttatgagatg ggttttatg attagagtc cgcaattata catttaatac 180

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg gcgtgtcatct 240
atgttactag atc 253
<210> 40
<211> 300
5 <212> ДНК
<213> *Oryza sativa*
<400> 40
attaatcgat cctccgatcc ctaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
tatatatata ccccttcgca cgtactata ctatgtttg tcatacatat atatgtgtcg 120
10 aacgatcgat ctactactga tatgatatga ttgatccatc agcctgatct ctgtatcttg 180
ttattgtat accgtcaaat aaaagtttct tccactgtg ttaataatta gctactctca 240
tctcatgaac cctatatata actagttaa tttgtgtca attgaacatg atgatcgatg 300
<210> 41
<211> 1446
15 <212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(1446)
20 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії.
(ЕХР).
<400> 41
gggtccgattg agactttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaggagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
25 catcattgag ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgtccaac cactgtctca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagactttc aacaaagggt aatatccgga 300
aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
gaagggtgct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
30 tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc caccacgag ggagcatcgt gaaaaaagaa 480
gacgttccaa ccacgtctc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
gatgacgac aatccacta tccttcgca gacccttct ctatataagg aagttcattt 600
catttgaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgcg 660
tactccgcc ctctgcctt ttactgcca cgtttctctg aatgctctt tgtgtggtga 720
35 ttgtgagag tggtttagct ggatctagaa ttactctg aaatcgtgtt ctgcctgtgc 780
tgattactg ccgtcctttg tagcagcaaa atataggac atggtagtag gaaacgaaga 840
tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggta ttatttaag 900
cacatgttg tttataggg cacttgatt cagaagttg ctgtaattt aggcacaggc 960
ttcactac atgggtcaat agtataggga tcatattat aggcgatact ataataattt 1020
40 gtctgtctg agagcttatt atttgccaaa attagatatt cctattctgt tttgtttgt 1080
gtgtgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgtta 1140
tctctgtcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg cactgtttt aaatattgtt 1200
gtctgaagaa ataagtactg acagtattt gatgcattga tctgtgtt ttgtgtaaca 1260
aaatttaaaa ataaagagtt tccttttgt tgctctctt acctcctgat ggtatctagt 1320
45 atctaccaac tgacactata ttgtctctt ttacatacgt atctgtctg atgcctctc 1380
cctagtgtg accagtgtta ctacatagt cttgtctcat ttattgtaa tgcagatacc 1440
aagcgg 1446
<210> 42
<211> 1653
50 <212> ДНК
<213> *Photinus pyralis*
<400> 42
atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
accgtggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg cctgtgttcc tggacaatt 120
55 gctttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgt 240
tgacgtgaaa actctctca attcttatg ccggtgttg gcggttatt tatcgagatt 300
gcagttgcgc ccggaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
tcgcagccta ccgtagtgtt ttttccaaa aaggggttgc aaaaaattt gaacgtgca 420
60 aaaaaattac caataatca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccaggga 480

tttagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatcagat 540
 ttgtaccag agtccttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttctctgga 600
 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgctgcgt cagattctcg 660
 catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttaagtgtt 720
 5 gttccattcc atcacgggtt tggaatgtt actacactcg gatattgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgtatag attgaagaa gagctgttt tacgatccct tcaggattac 840
 aaaattcaaa gtgcgttgc agtaccaacc ctatttcat tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggagc acctcttcg 960
 aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatctc cagggatagc acaaggatat 1020
 10 ggggtcactg agactacatc agctattctg attacaccg agggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggtg aagttgttcc atttttgaa gcgaaggtg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgctgggag ttaacagag aggcgaatta tgtgcagag gacatgatg tatgtccgg 1200
 tatgtaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttctca tagttgaccg ctgaagtct 1320
 15 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc ccgctgaat tggatcgat attgtacaa 1380
 caccacaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtctccg acgatgacgc cgggaactt 1440
 cccgcccggt ttgtgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtt gttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
 20 aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa 1653
 <210> 43
 <211> 936
 <212> ДНК
 <213> Renilla reniformis
 25 <400> 43
 atggctcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg 60
 tgggtcgtc gcaagcaaat gaacgtgctg gactcctca tcaactacta tgattccgag 120
 aagcacgccg agaacgccgt gatcttctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtg 180
 aggcacgtcg tgcctacatc cgagcccgtg gctagatgca tcatcctga tctgatcgga 240
 30 atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatgcc tcttgatca ctacaagtac 300
 ctaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaagaaaa tcatcttctt gggccacgac 360
 tggggggctt gtctggcctt tctactacc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
 gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gactcctgg acgagtggcc tgacatcgag 480
 gaggatatcg cctgatcaa gacgaagag ggcgagaaaa tgggtcttga gaataactc 540
 35 ttcgtcgaga ccatgtccc aagcaagatc atcggaac tggagcctga ggagtcgtc 600
 gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctctggcct 660
 cgcgagatcc ctctgttaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720
 aacgcctacc ttcgggcccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctgg 780
 ttcttttca acgtattgt cgaggagct aagaagtcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
 40 gtgaagggcc tccactcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900
 agcttcgtgg agcgctgct gaagaacgag cagtaa 936
 <210> 44
 <211> 675
 <212> ДНК
 45 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(675)
 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії. (EXP).
 50 <400> 44
 ggtccgatgt gagactttt aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgtgccaa 180
 agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttcaa ccacgtctc 240
 55 aaagcaagtg gattgatgt atgggtccgag gtgagactt tcaacaaagg gtaatatccg 300
 gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
 aggaaggttg ctctacaaa tgcatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 cctctgccga cagtggctcc aaagatggac cccaccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct tcaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 60 gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagaccctc ctctatataa ggaagttcat 600

ttcatttgga gaggaacccat ctccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
gacaacacac cataa 675

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Рекомбінантна молекула ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, яка складається з:

а) послідовності ДНК, яка щонайменше на 95 відсотків ідентична всій довжині SEQ ID NO:11, де послідовність має промоторну активність;

10 б) послідовності ДНК, яка містить SEQ ID NO:11; і

с) фрагмента, що містить щонайменше 500 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:11, де фрагмент має промоторну активність;

де вказана послідовність функціонально зв'язана з гетерологічною транскрибованою полінуклеотидною молекулою.

15 2. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, де вказана послідовність ДНК щонайменше на 97 відсотків ідентична всій довжині послідовності ДНК SEQ ID NO:11, де послідовність має промоторну активність.

3. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, де гетерологічна транскрибована полінуклеотидна молекула містить ген, що становить агрономічний інтерес.

20 4. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 3, де ген, що становить агрономічний інтерес, зумовлює у рослин толерантність до гербіцидів.

5. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 3, де ген, що становить агрономічний інтерес, зумовлює у рослин стійкість до шкідників.

6. Клітина трансгенної рослини, що містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, яка складається з:

25 а) послідовності ДНК, яка щонайменше на 95 відсотків ідентична всій довжині SEQ ID NO:11, де послідовність має промоторну активність;

б) послідовності ДНК, яка містить SEQ ID NO:11; і

30 с) фрагмента, що містить щонайменше 500 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:11, де фрагмент має промоторну активність;

де вказана послідовність функціонально зв'язана з гетерологічною транскрибованою полінуклеотидною молекулою.

7. Клітина трансгенної рослини за п. 6, де вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину однодольної рослини.

35 8. Клітина трансгенної рослини за п. 6, де вказана клітина трансгенної рослини являє собою клітину дводольної рослини.

9. Трансгенна рослина або її частина, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, вибрану з групи, яка складається з:

40 а) послідовності ДНК, яка щонайменше на 95 відсотків ідентична всій довжині SEQ ID NO:11, де послідовність має промоторну активність;

б) послідовності ДНК, яка містить SEQ ID NO:11; і

с) фрагмента, що містить щонайменше 500 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:11, де фрагмент має промоторну активність;

45 де вказана послідовність функціонально зв'язана з гетерологічною транскрибованою полінуклеотидною молекулою.

10. Трансгенна рослина за п. 9, де вказана трансгенна рослина являє собою однодольну рослину.

11. Трансгенна рослина за п. 9, де вказана трансгенна рослина являє собою дводольну рослину.

50 12. Трансгенна рослина за п. 10, де вказана однодольна рослина вибрана з групи, яка складається з кукурудзи (*Zea mays*), рису (*Oryza sativa*), пшениці (*Triticum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum spp.*), проса, африканського проса (*Pennisetum glaucum*), проса пальчастого (*Eleusine coracana*), проса звичайного (*Panicum miliaceum*), мишію італійського (*Setaria italica*), вівса (*Avena sativa*), тритикале, жита (*Secale cereale*), пальчатки (*Digitaria*), цибулі (*Allium spp.*), ананаса (*Ananas spp.*), газонної трави, цукрової тростини (*Saccharum spp.*), пальми (*Arecaceae*), бамбука (*Bambuseae*), бананів (*Musaceae*), імбирних (*Zingiberaceae*), лілій (*Lilium*), нарцисів (*Narcissus*), ірисів (*Iris*), амарилісів, орхідей (*Orchidaceae*), каннів, дзвоників (*Hyacinthoides*) і тюльпанів (*Tulipa*).

60 13. Трансгенна рослина за п. 11, де вказана дводольна рослина вибрана з групи, яка складається із сої (*Glycine max*), дикої сої (*Glycine soja*), бавовни (*Gossypium*), томатів (*Solanum*

lycopersicum), перцю (*Piper*), гарбуза (*Cucurbita*), гороху (*Pisum sativum*), люцерни (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолі (*Phaseolus*), нуту (*Cicer arietinum*), соняшника (*Helianthus annuus*), картоплі (*Solanum tuberosum*), арахісу (*Arachis hypogaea*), кіноа, гречки посівної (*Fagopyrum esculentum*), ріжкового дерева (*Ceratonia siliqua*), буряка (*Beta vulgaris*), шпинату

5 (*Spinacia oleracea*) і огірка (*Cucumis sativus*).
14. Рослина-нащадок трансгенної рослини за п. 9 або її частина, де рослина-нащадок або її частина містить молекулу рекомбінантної ДНК за п. 1.

15. Трансгенне насіння з трансгенної рослини за п. 9, де насіння містить вказану молекулу рекомбінантної ДНК за п. 1.

10 16. Спосіб отримання трансгенної рослини, який включає:

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

б) регенерацію трансгенної рослини з трансформованої клітини рослини.

```
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATGGTGAGGCCCGTTGAGACCCCGACTAGGGAGATCAAGAAGCTGGACGGCCTCTGGGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATGGTCCGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCTCCCTCGACCGTGAGAACTGCGGCATCGACCAGCGCTGGTGGGAGTCCGCCCTCCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAA
***
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GAGTCTAGGGCCATCGCCGTGCCCCTTCCTTCAACGACAGTTTCGCCGACGCCGACATC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTAAACGATCAGTTTCGCCGATGCAGATATT
**
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CGCAACTACGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAGGTTCATCCCGAAGGGCTGGGCG
CR-Ec.uidA-1:1:4 CGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTGGGCA
**
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GGCCAGCGCATCGTCTCCGCTTCGACGCCGTGACCCACTACGGCAAGGTCTGGGTGAAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GGCCAGCGTATCGTGTGCGTTTCGATGCGGTCACTCATTACGGCAAGGTGTGGGTCAAT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AATCAGGAGGTGATGGAGCACCAGGGCGGTTACACCCCGTTTCGAGGCCGACGTGACGCCG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTGAAGCCGATGTACGCCG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TACGTGATCGCCGGGAAGTCCGTCGCGATCACCGTCTGCGTGAACAATGAGCTGAACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGG
**
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGACCATCCCGCCTGGCATGTCATCACCGACGAGAACGGCAAGAAGAAGCAGTCTCTAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTAC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCCACGACTTCTTCAACTACGCTGGCATCCACCGCTCCGTGATGCTCTACACCACTCCC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCCATGATTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACACCTGGGTGGACGACATCACCGTGGTCACCCACGTGGCCAGGACTGCAACCACGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGATGTGCGCGAAGACTGTAACCACGCCG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TCCGTGGACTGGCAAGTCGTTGCCAACGGCGACGTGAGCGTCGAGCTGCGCGACGCGGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TCTGTTGACTGGCAGGTGGTGCCAAATGGTGATGTGAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGAT
**
```

Фіг. 1а

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGCAAGTCGTTGCCACCGGCCAGGGCACCAGCGGCACCCTCCAAGTCGTCAACCCTCAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCAC TAGCGGACTTTGCAAGTCGTGAATCCGCAC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTCTGGCAGCCTGGCGAGGGCTACCTCTACGAGCTGTGCGTCACCGCCAAGAGCCAGACT
CR-Ec.uidA-1:1:4 CTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GAGTGCAGACATCTACCCCTCTCCGCGTCGGGCATCAGGAGCGTCGCTGTCAAGGGCGAGCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCCTCATCAACCACAAGCCTTTCTACTTCACTGGTTTCGGCCGCCACGAGGACGCTGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCCTGATTAAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGAGGGGCAAGGGTTTCGACAACGTCCTGATGGTCCACGACCACGCTCTGATGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGTGGCAAGGATTTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCGGTGCCAACAGCTACAGGACCAGTCACTACCCGTACGCTGAGGAGATGCTGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATTGGGGCCAACTCTACCTACCTCGCATACCCCTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCTGACGAGCAGGATCGTCGTGATCGACGAGACTGCTGCGGTGCGTTTCAACCTGTCT
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAATGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGGGCATTGGTTTCGAGGCTGGGAACAAGCCGAAGGAGCTGTACTCTGAGGAAGCTGTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGGCAACAAGCCGAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACGCGGAGACTCAGCAAGCTCATCTCCAGCGGATTAAGGAGCTGATTGCCAGGGACAAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACGGGGAAGCTCAGCAAGCGCACTTACAGCGGATTAAGGAGCTGATAGCGCGTGACAAA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACCATCCGTCTGTCTGATGTGGTCTATTGCGAATGAGCCGGACACCAGACCGCAAGGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACCACCCAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGCGTGAATACTTCGCGCGCTGGCGGAGGCGACTCGCAAACTGGACCCAAACCGTCCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCACGGGAATATTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAACTCGACCCGACGCGTCCG
*****

```

Fig. 1b

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCACGTGCGTCAATGTATGTTCTGCGACGCCCATACGGATACGATCTCGGACCTGTTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GATGTTCTTTGTCTCAATCGGTACTATGGGTGGTATGTTTCAGAGCGGGGATCTTGAGACG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GATGTGCTGTGCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAGCGCGGATTTGGAAACG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGGAGAAGGTTCTTGAGAAGGAACCTCGCGTGGCAAGAGAAGCTCCATCAGCCGATC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCTGGCAGGAGAAATGCATCAGCCGATT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATTATCACGGAGTACGGGGTTGACACACTTTCGCGGCCCTTACAGTATGTACACAGATATG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCATCACGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TGGTCGGAGGAATACCAAGTGTGCATGGTTGGATATGTACCATCGTGTCTTCGACCGGGTT
CR-Ec.uidA-1:1:4 TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCAGCTCTTTGATCGCGTC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TCAGCGGTTGTGCGGCAACAAGTCTGGAACCTTCGACAGACTTCGCCACGAGCCAAGGGATA
CR-Ec.uidA-1:1:4 AGCGCCGTCGTGCGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCGATTTTTCGACCTCGCAAGGCATA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGCGGTTAGGAGGGAACAAGAAGGAATCTTCACACGGGATCGGAAGCCCAAGTCAGCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGCGTTGGCGGTAAACAAGAAAGGATCTTCACTCGCAGCCGCAAAACCGAAGTCGGCG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCCTTCCTGTGCAAGCGATGGACAGGAATGAACCTTCGGAGAAAAGCCACAGCAAGGC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACCTTCGGTGAAAACCGCAGCAGGGA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GGAAAGCAGTGA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GGCAACAATGA
*****

```

Fig. 1c