(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037898 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.03

(21) Номер заявки
201890328

(22) Дата подачи заявки
2016.07.14

(51) Int. Cl. ***A01H 1/00*** (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01)
A01H 3/04 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ

(31) **62/195,546**
(32) **2015.07.22**
(33) **US**
(43) **2018.06.29**
(86) **PCT/US2016/042217**
(87) **WO 2017/015043 2017.01.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:
Хуан Цзиньтай, Ци Юлинь, Ян Хэпин, Чжан Юаньцзин (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20130007908
US-A1-20110271399
US-A-6072102
US-A1-20110167513
US-B2-7230168

(57) В изобретении предложены новые молекулы рекомбинантной ДНК, композиции и способы селективной регуляции экспрессии транскрибируемой полинуклеотидной молекулы или рекомбинантного белка в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения. В изобретении также предложены трансгенные растения, растительные клетки, части растений, семена и товарные продукты, содержащие такие молекулы ДНК и композиции.

037898 B1

037898 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/195546, поданной 22 июля 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Включение перечня последовательностей

Перечень последовательностей содержится в файле под названием "MONS392WO_ST25.txt", размером 26,3 кБ (измерено в операционной системе MS-Windows), создан 28 июня 2016 года, подается в данном документе и включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Изобретение в целом относится к отраслям сельского хозяйства, селекции растений и молекулярной биологии. Более конкретно, изобретение относится к способам и композициям для селективной регуляции экспрессии белка в мужской репродуктивной ткани трансгенных растений и их применениям.

Уровень техники

Гибридные семена получают путем гибридизации или перекрестного оплодотворения близкородственных растений и могут быть выращены в гибридные растения потомства, обладающие желательной комбинацией признаков, которыми не обладали ни одно из родительских растений. Гибридные растения могут демонстрировать превосходные агрономические характеристики, такие как улучшение размеров растений, урожайности, питательного состава, устойчивости к болезням, устойчивости к гербицидам, устойчивости к стрессам, адаптации к климату и другие желательные свойства. Для эффективного получения гибридных семян требуется, чтобы собственная пыльца растения не могла самоопылить растение. Основным ограничением при получении гибридных семян для многих сельскохозяйственных культур является отсутствие простых, надежных и экономичных методов создания растений, которые являются бесплодными и неспособными к самоопылению.

При получении гибридных семян продуцирование пыльцы и сбрасывание пыльцы может быть предотвращено на женском родительском растении, чтобы облегчить перекрестное опыление женского растения скорее, чем самоопыление. Такое предотвращение может быть достигнуто путем, например, ручного удаления структур, содержащих пыльцу (например, путем ручного или механического удаления соцветия-метелки в кукурузе), использования генетических средств контроля опыления (например, с использованием технологии цитоплазматической мужской стерильности или ядерной мужской стерильности), использования химического средства или любой их комбинации. Это может быть трудоемким и, следовательно, дорогостоящим процессом. В кукурузе, например, удаление соцветия-метелки обычно выполняется в два этапа: машинное удаление соцветия-метелки с последующим ручным удалением соцветия-метелки. Коммерческое получение гибридных семян, использующих исключительно химические гаметоциды, ограничено в основном их общим отсутствием селективности для гамет и их влиянием на другие части растения. Таким образом, способы повышения эффективности получения гибридных семян очень востребованы.

Краткое описание сущности изобретения

Изобретение относится в целом к усовершенствованиям способов селективной регуляции экспрессии белка в мужской репродуктивной ткани трансгенных растений, молекул рекомбинантной ДНК, которые используются в таких способах, а также к трансгенным растениям, клеткам и семенам, содержащим такие молекулы рекомбинантной ДНК. В изобретении предложено улучшение по сравнению с уровнем техники путем обеспечения целевых элементов мужских тканеспецифических миРНК, мтс-миРНК (мтс-миРНК), способных обеспечивать улучшенную селективную регуляцию экспрессии белка, кодируемого транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, и предложены молекулы рекомбинантных ДНК и композиции, содержащие такие целевые элементы мтс-миРНК, и способы использования таких целевых элементов мтс-миРНК для индуцирования мужской стерильности в трансгенных растениях для получения гибридных семян.

В одном аспекте изобретения предложена молекула рекомбинантной ДНК, содержащая целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В одном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК включен в 3'-нетранслируемую область, функционально связанную с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В другом варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК расположен между гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой и функционально связанной полиаденилирующей последовательностью, которая является частью 3'-нетранслируемой области. В одном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-16, 23-92 и их комплементарных цепей. В другом варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула обеспечивает растению устойчивость к гербицидам, например устойчивость к вегетативному гербициду. В дополнительном варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула не обеспечивает репродуктивной устойчивости к гербицидам у мужского растения. В другом варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула является глифосат-толерантной 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазой (EPSPS).

В другом аспекте изобретения предложена конструкция рекомбинантной ДНК, содержащая целевой элемент мтс-миРНК по изобретению, функционально связанная с гетерологичной транскрибируемой

полинуклеотидной молекулой.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ получения молекулы рекомбинантной ДНК, включающий функциональное связывание по меньшей мере одного целевого элемента мтс-миРНК с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В одном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-16, 23-92 и их комплементарных цепей.

В другом аспекте данное изобретение относится к трансгенному растению, содержащему целевой элемент мтс-миРНК по изобретению. В одном варианте реализации трансгенное растение содержит целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В дополнительном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-16, 23-92 и их комплементарных цепей. В еще одном варианте реализации трансгенное растение получают путем трансформации растения с молекулой рекомбинантной ДНК или конструкцией ДНК, содержащей по меньшей мере один целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В дополнительном аспекте изобретения предложены семена, клетка или часть такого трансгенного растения. В одном варианте реализации растение представляет собой однодольное растение. В другом варианте реализации растение представляет собой растение кукурузы (Zea mays).

В дополнительном аспекте изобретения также предложен способ селективной регуляции экспрессии белка в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения путем экспрессии в трансгенном растении молекулы рекомбинантной ДНК, которая содержит целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой.

В одном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-16, 23-92 и их комплементарных цепей. В другом варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула обеспечивает растению устойчивость к гербицидам, например устойчивость к вегетативному гербициду. В дополнительном варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула не обеспечивает репродуктивной устойчивости к гербицидам у мужского растения. В другом варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула является глифосат-толерантной EPSPS.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу индуцирования мужской стерильности в трансгенном растении, включая стадию нанесения гербицида на трансгенное растение, которое имеет в своем геноме молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, которая обеспечивает трансгенному растению устойчивость по меньшей мере к первому гербициду, при этом гербицид наносят до или одновременно с развитием мужской репродуктивной ткани трансгенного растения, тем самым вызывая мужскую стерильность в трансгенном растении. В одном варианте реализации гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула обеспечивает вегетативную устойчивость к гербицидам, но не обеспечивает репродуктивной устойчивости к гербицидам у мужского растения. В другом варианте реализации трансгенное растение представляет собой растение кукурузы. В дополнительном варианте реализации применение гербицида предотвращает, по меньшей мере, развитие пыльцы, сбрасывания пыльцы или экструзию пыльников в обработанном трансгенном растении. В другом варианте реализации стадия развития мужской репродуктивной ткани, в течение которой применяется гербицид, представляет собой стадию, выбранную из группы, состоящей из V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 и V14 стадий развития кукурузы. В другом варианте реализации гербицид выбран из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-кофермента А карбоксилазы (ACC), ингибиторов ацетолактат-синтазы (ALS), ингибиторов фотосистемы II (PSII), ингибиторов протопорфириногеноксидазы (PPO), ингибиторов 4-гидроксифенилдиоксигеназы (HPPD), ингибиторов 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS), ингибиторов глутаминсинтетазы (GS) и синтетических ауксинов. В другом варианте реализации гербицидом является глифосат, а гетерологичный транскрибируемый полинуклеотид кодирует глифосат-толерантную EPSPS.

В одном аспекте изобретение также относится к способу получения гибридных семян, включающему применение эффективного количества гербицида к трансгенному растению, содержащему в своем геноме молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, при этом гербицид наносят до или одновременно с развитием мужской репродуктивной ткани трансгенного растения, тем самым индуцируя мужскую стерильность в трансгенном растении; оплодотворение трансгенного растения пыльцой со второго растения; и возможность формирования гибридных семян из трансгенного растения. В одном варианте реализации трансгенное растение представляет собой кукурузу. В другом варианте реализации гербицидом является глифосат, а гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула представляет собой глифосат-толерантную EPSPS. В другом варианте реализации глифосат применяют одновременно с развитием в эффективном количестве около 0,125 фунта кислотного эквивалента на акр до около 8 фунтов кислотного эквивалента на акр. В другом аспекте изобретения предложены гибридные семена, полученные таким способом. В одном варианте реализации гибридное семя содержит

молекулу рекомбинантной ДНК.

Другие конкретные варианты реализации изобретения раскрыты в следующем подробном описании. Во всем этом описании изобретения и формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумеваться как включение заявленного целого, элемента или этапа или группы целых, элементов или этапов, но не исключение любого другого целого, элемента или этапа или группы целых, элементов или этапов.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - иллюстрация этапов развития кисточки V7 при T2, V8/V9 при T4, V10/V11 при T5, V12 при T6 и VT при T7, демонстрирующая размер и морфологию кисточки с нижней панелью фотографий поперечных сечений пыльников, демонстрирующих стадию развития пыльцы. Описанные стадии (V10/V11 и V12), ранее использованные в данной области для выделения малых молекул РНК для идентификации молекул мтс-миРНК, обозначены прямоугольником со сплошной линией; этапы (V7, V8/V9, V10/V11 и V12), описанные в данном документе для выделения малых молекул РНК, обозначены прямоугольником с пунктирной линией;

фиг. 2 - графическое представление выравнивания последовательностей мтс-миРНК по последовательности кДНК, представленной как SEQ ID NO: 17. Последовательность кДНК показана от нуклеотида 1 до 1826, а короткие линии представляют собой выравнивание комплементарной цепи индивидуальных последовательностей мтс-миРНК или фрагментов соседних последовательностей мтс-миРНК или перекрывающихся последовательностей мтс-миРНК (относительно более длинных линий) к кДНК. Последовательности мтс-миРНК, которые являются той же самой цепью, что и кДНК, не показаны. Слева показан нормализованный относительный уровень экспрессии мтс-миРНК. Область в прямоугольнике представляет собой область последовательности кДНК, богатую мишенями мтс-миРНК;

фиг. 3 - схема, показывающая двухцепочечную мтс-миРНК, одноцепочечную мтс-миРНК, целевую последовательность мтс-миРНК в пределах мРНК и область мРНК с большим количеством целевых последовательностей мтс-миРНК, используемых в качестве целевого элемента мтс-миРНК;

фиг. 4 - фотография кисточки и пыльцы кукурузы R0, окрашенной красителем Alexandar из двойных копий трансгенных растений, содержащих молекулу рекомбинантной ДНК, содержащей трансген, кодирующий глифосат-толерантный EPSPS-белок, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК (SEQ ID NO: 2). Трансформанты с 1 по 4 были обрызганы 0,75 фунта/акр гербицида глифосата на V5 с последующей стадией V8 и продемонстрированные кисточки с полной мужской стерильностью, как определено с помощью отсутствия цветения и нежизнеспособных зерен пыльцы, или отсутствия пыльцевых зерен, обнаруженных в пыльниках. Контрольные растения не получали применение глифосата и демонстрировали нормальное цветение и сбрасывание пыльцы, а микроскопическое наблюдение обнаруживало нормальные зерна пыльцы.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, имеющая 95% идентичности последовательности с нуклеотидными позициями от 1429 по 1628 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 2 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, имеющая 95% идентичности последовательности с нуклеотидными позициями от 1429 по 1628 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 17 и имеющая одну нуклеотидную замену (T69A) относительно SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 239 по 433 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 4 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 477 по 697 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 5 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 239 по 433 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 6 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 370 по 477 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 7 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 1357 по 1562 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 8 - последовательность целевого элемента мтс-миРНК, которая соответствует нуклеотидным позициям от 247 по 441 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 9 - обратная комплементарная цепь последовательности целевого элемента мтс-миРНК, имеющей 99% идентичности последовательности с нуклеотидными позициями от 191 по 490

последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 22 с тремя ошибочно спаренными нуклеотидами (C314A, A350G и G408A).

SEQ ID NO: 10-16 - рекомбинантные последовательности целевых элементов мтс-миРНК.

SEQ ID NO: 17 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательности целевых элементов мтс-миРНК, представленные SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 23-31.

SEQ ID NO: 18 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательности целевых элементов мтс-миРНК, представленные SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 32-42.

SEQ ID NO: 19 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательности целевых элементов мтс-миРНК, представленные SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 43-52.

SEQ ID NO: 20 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 7, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 53-60.

SEQ ID NO: 21 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 8, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 61-69.

SEQ ID NO: 22 - последовательность кДНК, содержащая по меньшей мере одну область, насыщенную последовательностями мишеней мтс-миРНК. Содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 9, и выравнивается с последовательностями мтс-миРНК SEQ ID NO: 70-87.

SEQ ID NO: 23-92 - последовательности ДНК, соответствующие последовательностям мтс-миРНК по изобретению, которые выравниваются с последовательностями кДНК, представленными в данном документе как SEQ ID NO: 17-22.

Подробное описание сущности изобретения

В изобретении предложены молекулы рекомбинантной ДНК, композиции и способы для селективной регуляции экспрессии белка, например экспрессии гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения и их применения. В одном аспекте данное изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, которая содержит целевой элемент мужской тканеспецифической малой интерферирующей РНК (мтс-миРНК), функционально связанный с гетерологичным транскрибируемым полинуклеотидом. Такие молекулы рекомбинантной ДНК используются для селективной регуляции экспрессии гетерологичного транскрибируемого полинуклеотида в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения.

Последовательности нуклеиновой кислоты могут быть представлены как ДНК или как РНК, как указано; раскрытие одного из них обязательно определяет другое, как известно специалисту в данной области техники. Кроме того, раскрытие данной последовательности нуклеиновой кислоты обязательно определяет и включает комплементарную цепь этой последовательности, как известно специалисту в данной области техники.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой класс молекул РНК длиной около 18-26 нуклеотидов (н) (например, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 н). Последовательность миРНК может быть представлена с использованием нуклеотидной последовательности РНК, состоящей из гуанина (G), цитозина (C), аденина (A) и урацила (U) или с использованием эквивалентной нуклеотидной последовательности ДНК из гуанина (G), цитозина (C), аденина (A) и тимина (T). миРНК функционирует в рамках индуцированных РНК комплексов сайленсинга (RISC) для инициирования деградации специфичной последовательности информационной РНК (мРНК), что приводит к нарушению экспрессии гена и снижению регуляции белка, кодируемого геном.

"Мужская тканеспецифическая миРНК" или "мтс-миРНК" представляет собой миРНК, обильно или специфически экспрессированную в мужской репродуктивной ткани (тканях) (например, мужское соцветие) растения, таким образом, имеющую тканеспецифический паттерн экспрессии. Мужская тканеспецифическая миРНК была идентифицирована в растениях и может быть обнаружена с использованием методов, известных в данной области, таких как низкомолекулярный нозерн анализ. Последовательность "мтс-миРНК" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты мтс-миРНК. Типичные последовательности мтс-миРНК в форме соответствующей последовательности ДНК молекулы двухцепочечной мтс-миРНК приведены в данном документе как SEQ ID NO: 23-92.

Последовательность ДНК, которая является комплементарной к последовательности мтс-миРНК, называется в данном документе "мишенью мтс-миРНК". Мишень мтс-миРНК содержится в последова-

тельности ДНК гена и транскрибируется в последовательность РНК соответствующей молекулы мРНК. Одноцепочечная и двухцепочечная молекула мтс-миРНК может затем связываться или гибридизоваться в типичных физиологических условиях с мишенью мтс-миРНК в молекуле мРНК. См. фиг. 3. Последовательность нуклеиновой кислоты является комплементарной последовательности мтс-миРНК, если выравнивание двух последовательностей нуклеиновых кислот дает точное совпадение (без каких-либо несоответствий, т.е. полная комплементарность), одно несовпадение, два несовпадения или три несовпадения по длине мтс-миРНК. Дополнительные последовательности могут быть связаны друг с другом в соответствии со стандартными правилами комплементарности Уотсона-Крика (например, пары гуанина с парами цитозина (G:C) и аденина либо с тимином (A:T), либо с урацилом (A:U). "Целевая последовательность мтс-миРНК" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты мишени мтс-миРНК. Типичные целевые последовательности мтс-миРНК представлены в данном документе как SEQ ID NO: 23-92.

Более одной мишени мтс-миРНК может быть сгруппировано вместе или даже перекрываться в пределах одной молекулы ДНК. Молекула ДНК, содержащая более одной мишени мтс-миРНК, упоминается в данном документе как "целевой элемент мтс-миРНК". Целевой элемент мтс-миРНК содержит по меньшей мере две или более мишеней мтс-миРНК в пределах окна 500 нуклеотидной последовательности. Целевой элемент мтс-миРНК может быть любой длины, такой как около 30 нуклеотидов (н), около 40 н, около 50 н, около 60 н, около 70 н, около 80 н, около 90 н, около 100 н, около 150 н, около 200 н, около 250 н, около 300 н, около 350 н, около 400 н, около 450 н или около 500 н. "Последовательность целевого элемента мтс-миРНК" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты целевого элемента мтс-миРНК. Типичные последовательности целевых элементов мтс-миРНК представлены в данном документе как SEQ ID NO: 1-16.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантная" молекула ДНК, полипептид, белок, клетка или организм может быть не природного происхождения или искусственным созданием с использованием инструментов генной инженерии и как таковой является продуктом человеческой деятельности и в остальных случаях обычно не встречаются в природе. "Молекула рекомбинантной ДНК" относится к молекуле ДНК, содержащей комбинацию последовательностей или молекул ДНК, которые естественным образом не встречались бы вместе без вмешательства человека. Например, молекула рекомбинантной ДНК может быть молекулой ДНК, которая состоит по меньшей мере из двух молекул ДНК, гетерологичных относительно друг друга, молекулой ДНК, которая содержит ДНК-последовательность, которая отличается от ДНК-последовательностей, которые существуют в природе, или молекулой ДНК, которая была встроена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации. В одном варианте реализации молекула рекомбинантной ДНК по изобретению представляет собой молекулу ДНК, содержащую целевой элемент мтс-миРНК, функционально связанный по меньшей мере с одной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, например, где молекула транскрибируемого полинуклеотида является гетерологичной целевому элементу мтс-миРНК. Как используется в данном документе, "рекомбинантная" молекула, или клетка, или организм могут относиться к антропогенному.

Используемый в данном документе термин "гетерологичный" относится к комбинации двух или более молекул ДНК или белков, когда такая комбинация обычно не встречается в природе или когда такая комбинация предоставляется в ориентации или порядке, которая отличается от той, которая была найдена в природе. Например, две молекулы ДНК могут быть получены из разных видов или созданы синтетически, и/или две молекулы ДНК могут быть получены из разных генов, например разных генов одного и того же вида или одних и тех же генов от разных видов. В одном примере регуляторный элемент или целевой элемент мтс-миРНК может быть гетерологичным по отношению к функционально связанной транскрибируемой молекуле полинуклеотида, если такая комбинация обычно не встречается в природе, т.е. молекула транскрибируемого полинуклеотида естественным образом не может быть функционально связана с регуляторным элементом или целевым элементом мтс-миРНК. В одном варианте реализации такая гетерологичная комбинация может содержать целевой элемент мтс-миРНК, который может быть синтезирован на основе растений или химически синтезирован и может быть функционально связан с транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, такой как бактериальный трансген, кодирующий белок для устойчивости к гербициду, такой как cp4-EPSPS (например, как показано в данном документе SEQ ID NO 93). Кроме того, конкретная последовательность может быть "гетерологичной" по отношению к клетке или организму, в который он вводится (например, последовательность, которая не встречается естественным образом в этой конкретной клетке или организме).

Используемый в данном документе термин "изолированный" означает отделяемый от других молекул, обычно связанных с ним в его естественном состоянии. Например, изолированная молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует отдельно или в комбинации с другими композициями, но не находится в ее естественном геномном положении или состоянии. В одном варианте реализации термин "изолированный" относится к молекуле ДНК, которая отделена от нуклеиновых кислот, которая обычно фланкирует молекулу ДНК в ее естественном состоянии. Например, изолированная молекула ДНК может быть молекулой ДНК, которая состоит по меньшей мере из двух молекул ДНК, гетерологичных относительно друг друга. В другом примере изолированная молекула ДНК может быть моле-

кулой ДНК, которая была включена в новое геномное местоположение в клетке-хозяине посредством генетической трансформации. Таким образом, молекула ДНК, слитая или функционально связанная с одной или несколькими другими молекулами ДНК, с которыми она не связана в природе, например, в результате методов рекомбинантной ДНК или трансформации растений, считается изолированной в данном документе. Такие молекулы считаются изолированными даже при интегрировании в хромосому клетки-хозяина или присутствии в растворе нуклеиновой кислоты с другими молекулами ДНК.

Термин "функционально связанный" относится по меньшей мере к двум молекулам нуклеотидов, расположенным или связанным таким образом, что можно влиять на функцию другого. Две нуклеотидные молекулы могут быть частью единой смежной нуклеотидной молекулы и могут быть смежными или разделенными. Например, целевой элемент мтс-миРНК может быть функционально связан с транскрибируемой полинуклеотидной молекулой. В одном варианте реализации функционально связанная молекула мтс-миРНК может влиять на транскрипцию, трансляцию или экспрессию транскрибируемой полинуклеотидной молекулы. Например, целевой элемент мтс-миРНК функционально связан с транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, если после транскрипции в мужской репродуктивной тканевой клетке присутствие целевого элемента мтс-миРНК в молекуле мРНК приводит к регуляции экспрессии транскрибируемого полинуклеотида в клетке, индуцированной эндогенной мтс-миРНК и RISC-пути. Функциональная связь целевого элемента мтс-миРНК и молекулы транскрибируемого полинуклеотида может быть достигнута, например, путем введения целевого элемента мтс-миРНК смежно с молекулой транскрибируемого полинуклеотида (такой как расположенный на 5' или 3' по отношению с транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, но необязательно смежной связью), в или смежно с нетранслируемой областью (UTR) молекулы полинуклеотида (такой как расположенный в или смежно с 5' UTR или 3' UTR) и/или на 3' по отношению с транскрибируемой полинуклеотидной молекулой и на 5' к сигналу полиаденилирования. В одном варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК расположен между молекулой транскрибируемого полинуклеотида и последовательностью полиаденилирования, которая представляет собой 3' до и смежно с молекулой транскрибируемого полинуклеотида. В другом варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК находится между стоп-кодоном транскрибируемой полинуклеотидной молекулы и последовательностью полиаденилирования. В другом варианте реализации целевой элемент мтс-миРНК находится в пределах 3'-UTR последовательности, примыкающей к транскрибируемой молекуле полинуклеотида.

Примеры идентификации мтс-миРНК, мишеней мтс-миРНК и целевых элементов мтс-миРНК приведены в данном документе и могут быть идентифицированы с помощью методов, известных специалистам в данной области, например путем биоинформационного анализа библиотек малых РНК и кДНК растений. В частности, мтс-миРНК можно идентифицировать из библиотек малых РНК и секвенировать. Выявленные последовательности мтс-миРНК можно сравнить с коллекциями кДНК и/или геномной последовательности для идентификации мишеней мтс-миРНК и целевых элементов мтс-миРНК, используемых для разработки молекул и конструкций рекомбинантных ДНК, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах реализации целевые элементы мтс-миРНК создаются, синтезируются или модифицируются in vitro. Например, целевые элементы мтс-миРНК могут быть модифицированы, чтобы содержать больше, меньше или отличные последовательности мишеней мтс-миРНК или перегруппировано относительное положение одной или нескольких последовательностей мишеней мтс-миРНК. В некоторых вариантах реализации такая модификация может быть полезной при увеличении или уменьшении влияния целевого элемента мтс-миРНК. Способы создания, синтеза или модификации целевого элемента мтс-миРНК in vitro и для определения оптимальной вариации желаемого уровня регулирования известны специалистам в данной области техники. Типичные рекомбинантные целевые элементы мтс-миРНК могут быть созданы путем комбинирования последовательностей ДНК или их фрагментов из двух или более мишеней мтс-миРНК, двух или более целевых элементов мтс-миРНК, двух или более областей кДНК, богатых мишенью мтс-миРНК, или одной или нескольких мишеней мтс-миРНК и фрагментов из двух или более областей кДНК, богатых мишенью мтс-миРНК, например, путем комбинирования всех или фрагментов двух или более целевых элементов мтс-миРНК, представленных в данном документе как SEQ ID NO: 1-9, путем комбинирования двух или более последовательностей мтс-миРНК, представленных в данном документе как SEQ ID NO: 23-92, или путем комбинирования всех или фрагментов двух или более целевых элементов мтс-миРНК, представленных в данном документе как SEQ ID NO: 1-9 с одной или несколькими последовательностями мтс-миРНК, представленными в данном документе как SEQ ID NO: 23-92. Такие типичные рекомбинантные целевые элементы мтс-миРНК представлены в данном документе как SEQ ID NO: 10-16.

Последовательность ДНК целевого элемента мтс-миРНК также может быть изменена путем включения 1-3 нуклеотидных несоответствий в последовательность мишени мтс-миРНК (относительно данной последовательности мтс-миРНК). В другом варианте реализации данное изобретение включает молекулы рекомбинантной ДНК или целевые элементы мтс-миРНК, имеющие по меньшей мере около 80% (в процентах) идентичности последовательности, около 85% идентичности последовательности, около 90% идентичности последовательности, около 91% идентичности последовательности, около 92% идентичности последовательности, около 93% идентичности последовательности, около 94% идентичности

последовательности, около 95% идентичности последовательности, около 96% идентичности последовательности, около 97% идентичности последовательности, около 98% идентичности последовательности и около 99% идентичности последовательности с любой из ДНК молекул, целевых элементов мтс-миРНК (такие как SEQ ID NO: 1-9), целевых элементов рекомбинантных мтс-миРНК (такие как SEQ ID NO: 10-16), или последовательностями кДНК (такие как SEQ ID NO: 17-22) данного изобретения.

В другом варианте реализации данное изобретение относится к фрагментам молекулы ДНК, описанным в данном документе. Такие фрагменты могут быть использованы в качестве целевых элементов мтс-миРНК или могут быть комбинированы с другими целевыми элементами мтс-миРНК, последовательностями мтс-миРНК или их фрагментами для конструирования целевых элементов рекомбинантных мтс-миРНК, как описано выше. В конкретных вариантах реализации такие фрагменты могут содержать по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 110, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 130, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 170, по меньшей мере около 180, по меньшей мере около 190, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 210, по меньшей мере около 220, по меньшей мере около 230, по меньшей мере около 240, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 260, по меньшей мере около 270, по меньшей мере около 280, по меньшей мере около 290, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 350, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 450, по меньшей мере около 500 смежных нуклеотидов, или длиннее, молекулы ДНК, описанной в данном документе, такой как целевая мишень мтс-миРНК или последовательность кДНК, как описано в данном документе. Способы получения таких фрагментов из исходной молекулы ДНК хорошо известны в данной области.

Эффективность модификаций, дупликаций, делеций или перегруппировок, описанных в данном документе в отношении желательных аспектов экспрессии конкретной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, может быть испытана эмпирически в стабильных и временных анализах растений, таких как описанные в рабочих примерах в данном документе, чтобы подтвердить результаты, которые могут варьировать в зависимости от сделанных изменений и цели изменения исходной молекулы ДНК.

Мишень мтс-миРНК и целевой элемент мтс-миРНК могут функционировать в любом направлении, что означает, что она ненаправлена и, как таковая, может использоваться либо в ориентации 5' или 3', либо в ориентации 3' на 5' в молекуле рекомбинантной ДНК или конструкции ДНК.

Используемый в данном документе термин "экспрессия транскрибируемой полинуклеотидной молекулы" или "экспрессия белка" относится к продуцированию белка из транскрибируемой полинуклеотидной молекулы и полученного транскрипта (мРНК) в клетке. Таким образом, термин "экспрессия белка" относится к любому паттерну трансляции транскрибируемой молекулы РНК в молекулу белка. Экспрессия белка может характеризоваться его временными, пространственными, развивающими или морфологическими качествами, а также количественными или качественными показателями. В одном варианте реализации молекулы рекомбинантной ДНК по изобретению могут быть использованы для селективной регуляции экспрессии белка или транскрибируемой полинуклеотидной молекулы в мужских репродуктивных тканях трансгенного растения. В таком варианте реализации экспрессия молекулы рекомбинантной ДНК в трансгенном растении может приводить к экспрессии функционально связанной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы, по меньшей мере, в вегетативных тканях, но не в мужских репродуктивных тканях. В некоторых вариантах реализации такая регуляция экспрессии белка относится к подавлению или уменьшению; например, подавление или снижение уровня белка, продуцируемого в клетке, например, посредством посттранскрипционной регуляции гена путем РНК-интерференции.

Селективная регуляция экспрессии белка, используемая в данном документе, относится к снижению продуцирования белка в клетке или ткани по сравнению с контрольной клеткой или тканью по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или 100% снижения (т.е. полное снижение). Контрольной клеткой или тканью может быть, например, вегетативная клетка или ткань из того же или подобного трансгенного растения, экспрессирующего белок, или клетка или ткань из трансгенного растения, имеющего аналогичный трансген, кодирующий белок, но без функционально связанного целевого элемента мтс-миРНК. Регулирование экспрессии белка можно определить с использованием любого метода, известного специалисту в данной области, например, путем непосредственного измерения накопления белка в образце клетки или ткани с использованием такой методики, как ELISA или вестерн-блот-анализ, путем измерения ферментативной активности белка, или путем фенотипического определения экспрессии белка. В одном варианте реализации селективная регуляция экспрессии белка относится к достаточному сокращению экспрессии белка, способного придать гербицидную устойчивость в мужской ткани трансгенного растения, что приводит к обнаруживаемому фенотипу измененной мужской фертильности в трансгенном растении, к которому был применен гербицид как индуцированный аэрозоль стерильности. Таким образом, обнаружение измененной мужской фер-

тильности в таком трансгенном растении указывает на селективную регуляцию экспрессии белка.

Используемый в данном документе термин "трансген, кодирующий рекомбинантный белок" или "транскрибируемая полинуклеотидная молекула" относится к любой нуклеотидной молекуле, способной транскрибироваться в молекулу РНК, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые имеют нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность. В зависимости от условий нуклеотидная последовательность может быть или не быть фактически транслирована в молекулу полипептида в клетке. Границы трансгенной или транскрибируемой полинуклеотидной молекулы обычно обозначаются стартовым кодоном трансляции на 5'-конце и стоп кодоном трансляции на 3'-конце.

Термин "трансген" относится к молекуле ДНК, искусственно встроенной в геном организма или клетки-хозяина, в текущем или любом предшествующем поколении организма или клетки в результате вмешательства человека, например, методами трансформации растений. Используемый в данном документе термин "трансгенный" означает, включающий трансген, например "трансгенное растение" относится к растению, содержащему трансген в его геноме, и "трансгенный признак" относится к характеристике или фенотипу, выраженному или предоставленному присутствием трансгена, встроенного в растительный геном. В результате таких геномных изменений трансгенное растение является чем-то значительно отличным от родственного растения дикого типа, а трансгенный признак - это черта, которая естественным образом не обнаруживается у растения дикого типа. Трансгенные растения по изобретению содержат молекулу рекомбинантной ДНК, представленную изобретением.

Трансгенная или транскрибируемая полинуклеотидная молекула по изобретению включает, но не ограничивается ими, трансгенную или транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, которая обеспечивает желательную характеристику, связанную с морфологией растений, физиологией, ростом, развитием, урожайностью, питательными свойствами, устойчивостью к болезням, устойчивостью к вредителям, устойчивостью к гербицидам, устойчивостью к стрессам, устойчивостью к стрессам окружающей среды или химической устойчивостью. В одном варианте реализации транскрибируемая полинуклеотидная молекула по изобретению кодирует белок, который при экспрессии в трансгенном растении обеспечивает устойчивость к гербициду, по меньшей мере, в клетке и/или ткани, где встречается экспрессированный белок; селективная регуляция белка толерантности к гербициду в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения в сочетании с своевременным применением гербицида приводит, по меньшей мере, к индуцированному снижению мужской фертильности или индуцированной мужской стерильности.

Такая индуцируемая мужская стерильность в сочетании с вегетативной устойчивостью к гербицидам может быть использована для повышения эффективности, с которой получают гибридные семена, например, путем устранения или уменьшения необходимости физически удалять мужские половые органы у растения кукурузы, используемого в качестве женского растения в данном скрещивании во время получения гибридных семян. Гербицид-индуцируемые системы мужской стерильности описаны, например, в патенте США № 6762344; патенте США 8618358; и публикации патента США 2013/0007908. Примеры гербицидов, используемых при осуществлении изобретения, включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы ацетил-кофермента А-карбоксилазы (ACC) (например, fop и dim), ингибиторы ацетолактатсинтазы (ALS) (например, сульфонилмочевины (SU) и имидазолиноны (IMI), ингибиторы фотосистемы II (PSII) (например, траазины и фенилэфиры), ингибиторы протопорфириногеноксидазы (PPO) (например, флумиоксазин и фомеафен), ингибиторы 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD) (например, изоксафлутол и трикетоны, такие как мезотрион), ингибиторы 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазы (EPSPS) (например, глифосат), ингибиторы глутаминсинтетазы (GS) (например, глюфозинат и фосфинотрицин), синтетические ауксины (например, 2,4-D и дикамба). Примеры трансгенов или транскрибируемых полинуклеотидных молекул для использования при осуществлении изобретения включают, но не ограничиваются ими, гены, кодирующие белки, придающие устойчивость к ингибиторам HPPD (такие как невосприимчивый к гербицидам HPPD), гены, кодирующие белки, дающие устойчивость к глюфосинату (такие как pat и bar), гены, кодирующие белки, придающие устойчивость к глифосату (например, устойчивые к глифосату EPSPS, такие как cp4-epsps, представленные в данном документе как SEQ ID NO: 93) и гены, кодирующие белки, придающие устойчивость к синтетическому ауксину, такому как дикамба (такой как дикамбамонооксигеназа (DMO)) и 2,4-D (такой как ген (R)-дихлорпропдиоксигеназы (rdpA)).

Рекомбинантные ДНК-конструкции по изобретению могут включать молекулы рекомбинантной ДНК по изобретению и изготовлены с помощью методов, известных в данной области техники и в различных вариантах реализации, включены в векторы трансформации растений, плазмиды или пластидную ДНК. Такие конструкции рекомбинантной ДНК используются для получения трансгенных растений и/или клеток и таковые могут также содержаться в геномной ДНК трансгенного растения, семян, клетки или части растения. Таким образом, данное изобретение включает варианты реализации, в которых конструкция рекомбинантной ДНК расположена в пределах вектора трансформации растений или на биолитической частице для трансформации растительной клетки или в пределах хромосомы или пластиды трансгенной растительной клетки или в пределах трансгенной клетки, трансгенной ткани растения, трансгенного семени растений, трансгенного зерна пыльцы или трансгенного или частично трансгенного (например, привитого) растения. Вектор представляет собой любую молекулу ДНК, которая может быть

использована для целей трансформации растений, т.е. введения ДНК в клетку. Рекомбинантные ДНК-конструкции по изобретению можно, например, встроить в вектор трансформации растений и использовать для трансформации растений для получения трансгенных растений, семян и клеток. Способы конструирования векторов трансформации растений хорошо известны в данной области. В соответствии с изобретением векторы трансформации растений как правило включают, но не ограничиваются ими: подходящий промотор для экспрессии функционально связанной ДНК, конструкцию функционально связанной рекомбинантной ДНК и сигнал полиаденилирования (который может быть включен в последовательность 3'UTR) Промоторы, которые используются при осуществлении изобретения, включают те, которые действуют на растении для экспрессии функционально связанного полинуклеотида. Такие промоторы разнообразны и хорошо известны в данной области и включают те, которые являются индуцибельными, вирусными, синтетическими, конститутивными, регулируемыми по времени, пространственно регулируемыми и/или пространственно-временными. Дополнительные необязательные компоненты включают, но не ограничиваются, одну или несколько из следующих мишеней: 5' UTR, энхансер, цис-действующую мишень, интрон, сигнальную последовательность, транзитную пептидную последовательность и один или несколько селектируемых маркерных генов. В одном варианте реализации вектор трансформации растения содержит рекомбинантную конструкцию ДНК.

Конструкции рекомбинантной ДНК и векторы трансформации растений по данному изобретению изготавливают любым способом, подходящим для предполагаемого применения, с учетом, например, типа желаемой экспрессии, трансгена или желаемой транскрибируемой полинуклеотидной молекулы и удобства использования в растении, в котором должна быть экспрессирована конструкция рекомбинантной ДНК. Общие методы, используемые для манипулирования молекулами ДНК для изготовления и использования рекомбинантных ДНК-конструкций и векторов трансформации растений, хорошо известны в данной области и подробно описаны, например, в руководствах и лабораторных руководствах, включая Michael R. Green and Joseph Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Fourth Edition) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012).

Молекулы и конструкции рекомбинантной ДНК по изобретению могут быть модифицированы способами, известными в данной области, полностью или частично, например, для увеличения удобства манипуляции с ДНК (такие как сайты распознавания рестрикционных ферментов или сайты клонирования на основе рекомбинации) или для включения предпочтительных последовательностей растений (таких как использование растительных кодонов или консенсусных последовательностей Козак) или включения последовательностей, применяемых для молекулы рекомбинантной ДНК и дизайна конструкции (например, спейсерных или линкерных последовательностей). В некоторых вариантах реализации последовательность ДНК молекулы и конструкции рекомбинантной ДНК включает последовательность ДНК, которая была оптимизирована кодоном для растения, в котором должна быть экспрессирована молекула или конструкция рекомбинантной ДНК. Например, молекула или конструкция рекомбинантной ДНК, которая должна быть экспрессирована в растении, может иметь все или части ее кодон-оптимизированной последовательности для экспрессии в растении способами, известными в данной области. Молекулы или конструкции рекомбинантной ДНК по изобретению могут быть размещены рядом с другими молекулами рекомбинантной ДНК или трансгенными объектами для придания дополнительных признаков (например, в случае трансформированных растений, признаки включая устойчивость к гербицидам, устойчивость к вредителям, устойчивость к холодному прорастанию, устойчивость к дефициту воды), например, путем экспрессии или регулирования других генов.

Аспект изобретения включает трансгенные растительные клетки, трансгенные растительные ткани и трансгенные растения или семена, которые включают молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Еще один аспект изобретения включает искусственные или рекомбинантные хромосомы растений, которые включают молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Подходящие способы трансформации клеток растений-хозяев для использования с настоящим изобретением включают практически любой способ, посредством которого ДНК может быть введена в клетку (например, когда молекула рекомбинантной ДНК стабильно интегрирована в растительную хромосому) и хорошо известна в данной области техники. Типичный и широко используемый способ введения молекулы рекомбинантной ДНК в растения представляет собой систему трансформации Agrobacterium, которая хорошо известна специалистам в данной области. Другим типичным способом введения молекулы рекомбинантной ДНК в растения является встраивание молекулы рекомбинантной ДНК в растительный геном в заранее определенном месте методами сайт-направленной интеграции. Сайт-направленная интеграция может быть выполнена любым способом, известным в данной области, например, с использованием нуклеаз по типу цинковых пальцев, искусственных или нативных мегануклеаз, TALE-эндонуклеаз или эндонуклеаз с РНК-управлением (например, системы CRISPR/Cas9). Трансгенные растения могут быть регенерированы из трансформированной растительной клетки методами культуры растительных клеток. Трансгенное растение, гомозиготное по отношению к трансгену, может быть получено путем сексуального скрещивания (самооплодотворения) независимых трансгенных растений, которое содержит одну экзогенную последовательность генов, например растение R0 или F0, с получением семян R1 или F1. Одна четвертая часть произведенных семян R1 или F1 будет гомозиготной по отношению к трансгену. Растения, выращенные из прорас-

тающих семян R1 или F1, могут быть подвергнуты испытанию на гетерозиготность, как правило, с использованием анализа SNP или анализа термической амплификации, который позволяет различать гетерозиготы и гомозиготы (т.е. анализ зиготности).

Изобретение относится к трансгенному растению, имеющему в своем геноме молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению, включая, помимо прочего, люцерну, хлопок, кукурузу, рапс, рис, сою и пшеницу. Изобретение также обеспечивает трансгенные растительные клетки, части растений и потомство такого трансгенного растения. Используемый в данном документе термин "потомство" включает любое растение, семена, растительную клетку и/или растительную часть, полученную или регенерированную из растения, семени, растительной клетки и/или растительной части, которая включает молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению. Трансгенные растения, клетки, части, потомства и семена, полученные из таких растений, могут быть гомозиготными или гетерозиготными для молекулы рекомбинантной ДНК по изобретению. Части растения данного изобретения могут включать, но не ограничиваются ими, листья, стебли, корни, семена, эндосперм, яйцеклетку и пыльцу. Части растений по данному изобретению могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми или нерегенерируемыми. Изобретение также включает и обеспечивает трансформированные растительные клетки, содержащие молекулу ДНК по изобретению. Трансформированные или трансгенные растительные клетки по изобретению включают регенерируемые и нерегенерируемые растительные клетки.

Дополнительно в данном изобретении представлены варианты реализации, в которых молекула рекомбинантной ДНК находится в товарном продукте, полученном из трансгенного растения, семени или растительной части данного изобретения; такие товарные продукты включают, но не ограничиваются ими, собранные части растения, измельченные или цельные зерна или семена растения или любой пищевой или непродовольственный продукт, содержащий молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению.

Изобретение предлагает способ индуцирования мужской стерильности в трансгенном растении, включающий: (a) выращивание трансгенного растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит гетерологичную транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, придающую гербицидную устойчивость, функционально связанную с целевым элементом мтс-миРНК, и (b) применение эффективного количества гербицида к трансгенному растению для индукции мужской стерильности. Эффективное количество гербицида представляет собой количество, достаточное для превращения трансгенного растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК по изобретению, на мужское стерильное. В одном варианте реализации эффективное количество глифосата составляет примерно 0,125 фунтов кислотного эквивалента на акр до примерно 8 фунтов кислотного эквивалента на акр. Применение гербицида может быть применено до или во время развития мужской репродуктивной ткани, например на этапе, выбранном из группы, состоящей из V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, и V14 стадии развития кукурузы и может предотвратить развитие как минимум пыльцы, сбрасывание пыльцы или экструзию пыльников.

В одном варианте реализации предотвращение развития пыльцы, сбрасывания пыльцы или экструзии пыльников может быть результатом мужской стерильности, и, следовательно, отсутствие развития пыльцы, сбрасывания пыльцы или экструзии пыльника могут быть признаком мужской стерильности. Однако в некоторых случаях мужские стерильные растения все еще могут образовывать небольшое количество пыльцы. Поэтому в некоторых вариантах реализации присутствие небольшого количества пыльцы не обязательно указывает, что это мужские фертильные растения или отсутствие мужской стерильности.

Развитие растений часто определяется по шкале стадий, основанных на развитии растений. Для кукурузы общая шкала развития растений, используемая в данной области техники, известна как V-стадии. V-стадии определяются в соответствии с самым верхним листом, в котором видна листовая манжета. VE соответствует появлению, V1 соответствует первому листу, V2 соответствует второму листу, V3 соответствует третьему листу, V(n) соответствует n-му листу. VT возникает, когда последняя ветвь кисточки видна, но до появления шелка. При определении стадии поля кукурузы каждая конкретная V-стадия определяется только тогда, когда 50% или более растений в поле находятся в этой стадии или за ее пределами. Другие шкалы развития известны специалистам в данной области и могут быть использованы со способами по изобретению.

Другим общим инструментом для прогнозирования и оценки стадий роста и развития кукурузы являются Единицы степени роста (GDU). Фактом роста и развития кукурузы является тепло. Тепло обычно измеряется в один момент времени и выражается как температура, но его также можно измерять в течение определенного периода времени и выражать в виде тепловых единиц. Эти тепловые единицы обычно называются GDU. GDU можно определить как разницу между средней дневной температурой и выбранной базовой температурой с учетом определенных ограничений. GDU рассчитываются с использованием следующего уравнения:

$$\text{Единица степени роста} = \{(H+L)/2\} - B,$$

где H - дневной максимум (но не выше 86°F); L - дневной минимум (но не ниже 50°F); а B - базовая температура 50°F. Поскольку рост кукурузы является незначительным, когда температура превышает 86°F или менее 50°F, устанавливаются пределы ежедневных высоких и низких температур, используе-

мых в формуле. Более низкое ограничение для суточной температуры также предотвращает вычисление отрицательных значений. Поэтому, если ежедневная высокая температура превышает 86°F, ежедневная высокая температура, используемая в формуле GDU, будет установлена на 86°F. И наоборот, если ежедневная низкая температура опускается ниже 50°F, ежедневная низкая температура, используемая в GDU формуле, будет установлена при 50°F. Если ежедневная высокая температура не превышает 50°F, то на этот день GDU не записывается. Максимум GDU, который кукуруза может накапливать за один день, равна 36, минимум равен нулю. Оценка зрелости растения кукурузы определяется суммой суточных значений GDU за определенный период времени. Период времени, который используют большинство производителей семян кукурузы, представляет собой время от момента посадки до физиологической зрелости или момента, при котором заполнение зерна практически завершено. Например, в большинстве штатов США накопленные GDU хранятся для большинства географических районов и доступны из Службы отчетов об урожае USDA или государственных служб распространения. Кроме того, инструмент для получения информации о GDU в определенном месте также описан в патенте США № 6967656, который включен в данное описание посредством ссылки во всей его полноте.

Другой способ прогнозирования развития кисточки для определения сроков проявления мужской стерильности, индуцируемой применением гербицида, описан в патенте США № 8618358, который включен в данном документе в качестве ссылки во всей его полноте.

Гербициды для использования с изобретением включают любой гербицид, включая те, которые действуют против ацетил-кофермента А-карбоксилазы (ACC), ингибиторы ацетолактат-синтазы (ALS), ингибиторы фотосистемы II (PSII), ингибиторы протопорфириногеноксидазы (PPO), ингибиторы 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD), ингибиторы 5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS), ингибиторы глутаминсинтетазы (GS) и синтетические ауксины. Гербициды хорошо известны в данной области и описаны, например, в "Modern Crop Protection Compounds, Volumes 1 (Second Edition), edited by Wolfgang Kramer, Ulrich Schirmer, Peter Jeschke, Matthias Witschel, ISBN: 9783527329656, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany (2012). В одном варианте реализации гербицидом является глифосат.

Гибридные семена могут быть получены с использованием способа, включающего: (a) примение гербицида на трансгенное растение, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, включая гетерологичную транскрибируемую полинуклеотидную молекулу, придающую гербицидную устойчивость, функционально связанную с целевым элементом мтс-миРНК, при этом выполняется применение гербицида во время развития мужской репродуктивной ткани трансгенного растения, тем самым индуцируя мужскую стерильность в трансгенном растении; (b) оплодотворение трансгенного растения пыльцой со второго растения; и (c) сбор гибридных семян из трансгенного растения. В одном варианте реализации трансгенное растение представляет собой кукурузу. В одном варианте реализации гербицидом является глифосат, а белок, кодируемый гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, является устойчивым к глифосату EPSPS. В одном варианте реализации глифосат применяют во время развития в эффективном количестве около 0,125 фунта кислотного эквивалента на акр до около 8 фунтов кислотного эквивалента на акр. В другом варианте реализации этап оплодотворения может быть осуществлен путем естественного оплодотворения, например, путем опыления с помощью ветра или может включать механическое или ручное опыление.

Гибридные семена можно собирать из мужского стерильного трансгенного растения, которое оплодотворялось пыльцой со второго растения, при этом мужское стерильное трансгенное растение содержит молекулу рекомбинантной ДНК, включающую гетерологичный транскрибируемый полинуклеотид, который придает гербицидную устойчивость, функционально связанную с мтс-миРНК, и при этом трансгенное растение было индуцировано до мужской стерильность путем применения эффективного количества гербицида во время развития мужской репродуктивной ткани. В одном из примеров гербицид представляет собой глифосат и применяется во время развития при эффективном количестве примерно 0,125 фунтов кислотного эквивалента на акр до примерно 8 фунтов кислотного эквивалента на акр и предотвращает, по меньшей мере, развитие пыльцы, сбрасывание пыльцы или экструзии пыльника.

Примеры

Следующие примеры описывают усовершенствования получения гибридных семян по сравнению с материалами, представленными в данной области техники. Такие улучшения включают новые мишени мтс-миРНК и целевые элементы мтс-миРНК для использования в молекулах рекомбинантной ДНК и трансгенных растениях для обеспечения задержки развития пыльцы на ранних стадиях, что приводит к отсутствию жизнеспособных зерен пыльцы в широком диапазоне зародышевой плазмы и связанных с ними методах использования. Следующие примеры представлены для демонстрации вариантов реализации изобретения.

Пример 1. Идентификация мишеней мтс-миРНК.

Малую РНК выделяли из четырех отдельных стадий роста кукурузы и трех отдельных стадий роста колоса кукурузы. См. табл. 1. Малую РНК, обильно представленную в кисточке, выделяли на очень ранних стадиях развития кисточки (V7, V8/V9, V10/V11 и V12) (см. фиг. 1). Таким образом, получены малые РНК из мужских тканей моложе, чем ранее применялось в данной области техники для получения после-

довательностей малых РНК, обильно представленных в кисточке.

Библиотеки малых РНК были получены с использованием изолированной малой РНК, и на библиотеках было выполнено высокопроизводительное секвенирование малой РНК.

Биоинформационный анализ использовался для сравнения последовательностей в этих библиотеках кисточек и колосов с последовательностями в библиотеках малых РНК, полученных из других тканей кукурузы, включая листья, собранные на различных стадиях роста, целый проросток, корни, собранные на разных стадиях роста, эндосперм и ядро. Этот дифференциальный биоинформационный анализ выявил тысячи последовательностей малых РНК, обильно представленных в кисточках, с нормализованной экспрессией от 10 до 665 транскриптов на четверть миллиона (tpq). Определенные последовательности малых РНК, обильно представленных в кисточках, вероятно, являются миРНК из-за их длины (18-26 нуклеотидов) и их ожидаемого происхождения из предшественника двухцепочечной РНК. Вследствие мужской тканевой специфичности эта малая РНК, обильно представленная в кисточках, упоминается в данном документе как мужская тканеспецифическая миРНК (мтс-миРНК).

Таблица 1. Описание библиотек малых РНК кисточки и колоса

Стадия кисточки/колоса	Размер кисточки/ колоса
Кисточка на стадии первичной клетки микроспоры (растение на V7-V8)	<1см
Кисточка на предмейотической стадии первичной клетки микроспоры (растение на V8-V9)	1-3см
Кисточка на стадии раннего мейоза - без стадии микроспоры (растение на V9-V10)	3-17см
Кисточка на поздней стадии - одноядерные микроспоры (растение на V12-VT)	>17см
Колос в премейозе - 4-ядерная стадия незрелого эмбрионального мешка (растение на VT)	2-3см
Колос на стадии 8-ядерного незрелого эмбрионального мешка до более поздней стадии до 10 антиподовых клеток (растение на VT)	4-5 см
Колос на стадии опыления (растение на VT-R1)	9-10 см

Метод ПЦР в реальном времени использовали для идентификации и подтверждения того, что последовательности мтс-миРНК были специфически экспрессированы в кисточке. Тотальная РНК, включая обогащенную малую РНК, была выделена из тканей, указанных в табл. 1, и использована для синтеза кДНК с обратными транскрипционными праймерами, состоящими из 8 н, комплементарных последовательностям мтс-миРНК на 3'-конце, и универсальной последовательностью 35 н на 5' конце. После синтеза кДНК проводили ПЦР в реальном времени, при этом последовательность (от 14 до 18 н) одного из прямых праймеров была идентична 5'-концу последовательности мтс-миРНК, а обратный праймер был универсальным праймером. В качестве внутреннего контроля 18S РНК была амплифицирована, и это было использовано для нормализации уровней мтс-миРНК. Данные из ПЦР в реальном времени использовались для сужения числа последовательностей мтс-миРНК, которые были обильно представлены в кисточке.

Профилирующий микроматричный анализ миРНК проводили с использованием чипов µParaflo® Microfluidics, предоставленных LC Sciences LLC (Хьюстон, штат Техас, США) с 1200 последовательностями, выбранными из тысяч последовательностей мтс-миРНК, идентифицированных из дифференциального биоинформационного анализа. Чипы микроматрицы содержали тройные зонды комплементарной последовательности для каждой из 1200 мтс-миРНК последовательностей. Тотальная РНК была выделена из 26 пулов ткани кукурузы (двойные или тройные пулы тканей) из LH244 (номер депозита ATCC PTA-1173) или 01DKD2 (1294213) (номер депозита ATCC PTA-7859) инбредных растений. См. табл. 2. Каждый из 26 образцов РНК был гибридизован с чипами микроматрицы, которые содержат зонды для 1200 мтс-миРНК. Изображения гибридизации были собраны с использованием лазерного сканера GenePix® 4000B (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) и оцифрованы с использованием программного обеспечения для анализа изображений Array-Pro® Analyzer (Media Cybernetics, Роквилл, Мэриленд). Относительные значения сигнала были получены путем вычитания фона и нормализации. Значительно выраженные сигналы определяли t-критерием с $p<0,05$. Из микроматричного анализа около 500 мтс-миРНК из 1200 были идентифицированы как высокоспецифичные для кисточек.

Таблица 2. Описание образцов тканей, используемых в микроматричном анализе

Номер чипа	Генотип	Тип ткани	Образцы, объединенные в пул из 3 растений	Стадия
1	LH244	Ранний колос	<5 см объединенных в пул	VT
2	LH244	Поздний колос	>5 см объединенных в пул	VT-R1
3	LH244	Ранняя кисточка	2-7 см объединенных в пул	V8-V9
4	LH244	Поздняя кисточка	>7 см объединенных в пул	V10-V12
5	LH244	лист	V4 объединенных в пул	V4
6	LH244	лист	V12 объединенных в пул	V12
7	LH244	корень	V4 объединенных в пул	V4
8	LH244	стебель	V4 объединенных в пул	V4
9	LH244	Ранний колос	<5 см объединенных в пул	VT
10	LH244	Поздний колос	>5 см объединенных в пул	VT-R1
11	LH244	Ранняя кисточка	2-7 см объединенных в пул	V8-V9
12	LH244	Поздняя кисточка	>7 см объединенных в пул	V10-V12
13	LH244	лист	V4 объединенных в пул	V4
14	LH244	лист	V12 объединенных в пул	V12
15	LH244	корень	V4 объединенных в пул	V4
16	LH244	корень	V4 объединенных в пул	V4
17	01DKD2	Ранний колос	<5 см объединенных в пул	VT
18	01DKD2	Поздний колос	>5 см объединенных в пул	VT-R1
19	01DKD2	Поздний колос	>5 см объединенных в пул	VT-R1
20	01DKD2	Ранняя кисточка	2-7 см объединенных в пул	V8-V9
21	01DKD2	Ранняя кисточка	2-7 см объединенных в пул	V8-V9
22	01DKD2	Поздняя кисточка	>7 см объединенных в пул	V10-V12
23	01DKD2	Поздняя кисточка	>7 см объединенных в пул	V10-V12
24	01DKD2	лист	V4 объединенных в пул	V4
25	LH244	лист	V4 объединенных в пул	V4
26	LH244	лист	V12 объединенных в пул	V12

Затем был осуществлен биоинформационный анализ с использованием инструментов выравнивания последовательностей, таких как Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) или SHort Read Mapping Package (SHRiMP) (Rumble, 2009) для сравнения последовательностей 500 мтс-миРНК, идентифицированных как высокоспецифичные для кисточек против колекции одногенных последовательностей кДНК кукурузы. В этом BLAST анализе были обнаружены последовательности кДНК кукурузы, к которым выровнялись многие последовательности мтс-миРНК, приводящие к идентифицируемым областям по-

следовательности ДНК, имеющим кластерные, перекрывающиеся выравнивания нескольких последовательностей мтс-миРНК с идеальными или близкими к идеальным совпадениями. Из этого анализа были идентифицированы шесть последовательностей кДНК, содержащих один или несколько таких областей, богатых последовательностями мишеней мтс-миРНК. Типичные шесть кДНК последовательностей представлены в данном документе как SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; и SEQ ID NO: 22. В качестве примера на фиг. 2 продемонстрировано графическое представление выравнивания нескольких последовательностей мтс-миРНК на кДНК, предоставленной как SEQ ID NO: 17. Несколько коротких линий представляют собой относительное положение последовательностей мишеней мтс-миРНК (и, следовательно, расположение сайта связывания для мтс-миРНК в транскрибируемой молекуле мРНК), которые выстраиваются в соответствии с кДНК. Ось Y представляет нормированные уровни экспрессии мтс-миРНК в тканях мужского пола, как это было обнаружено в микроматричном анализе. Прямоугольник представляет собой область кДНК SEQ ID NO: 17, соответствующий последовательностям целевых элементов мтс-миРНК SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Выбранные последовательности мтс-миРНК, выровненные с одной из шести последовательностей кДНК, использовали для дополнительного микроматричного анализа для определения дифференциальной экспрессии в тканях кукурузы. Микроматричный анализ для последовательностей мтс-миРНК нормированных значений сигнала для кисточки V8-V9, кисточки V10-V12 или комбинированных сигналов из другой ткани для зародышевой плазмы кукурузы LH244 и 01DKD2 представлен в табл. 3-10. Каждая таблица демонстрирует подмножество последовательностей мтс-миРНК, идентифицированных как совпадающие с одной из шести последовательностей кДНК, представленных в данном документе как SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; и SEQ ID NO: 22. Результаты значений сигнала измеряются как относительные значения сигнала, а стандартная ошибка ($p<0,05$) представлена с помощью (STDR). Результаты микроматричного анализа показывают, что типичные мтс-миРНК последовательности дают высокий сигнал в кисточке (V8-V9 и V10-V12) и низкий сигнал в другой ткани, что указывает на то, что эндогенная экспрессия этих мтс-миРНК обильно представлена в кисточке. Последовательность мтс-миРНК соответствует смысловой или антисмысловой цепи, соответствующей последовательности мишени мтс-миРНК в последовательности кДНК. Последовательность мтс-миРНК может иметь однонуклеотидное, двухнуклеотидное или тринуклеотидное несовпадение с выровненной частью последовательности кДНК, а последовательность мтс-миРНК может выравниваться в соответствии со смысловой цепью или антисмысловой цепью последовательности кДНК. Представленные в данном документе последовательности мтс-миРНК обнаруживаются в разных зародышевых плазмах кукурузы.

В табл. 3 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 23-31), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 17, которая содержит последовательности целевых элементов мтс-миРНК, представленных SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. Для обеих зародышевых плазм LH244 и 01DKD2 сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 3, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 17 можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 3. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 17

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
23	183,5 (36,9)	514 (105,2)	2,6 (0,6)	27 (2)	318 (46,5)	4,3 (1,5)
24	104,5 (40,9)	322 (77,5)	7,7 (3,5)	16 (1)	174 (32,3)	3 (0,7)
25	289 (99)	824,3 (146,6)	2,6 (0,7)	56 (9,1)	440 (14,1)	2,3 (1,1)
26	55,5 (4,5)	175,7 (41,2)	3,8 (1,1)	10 (7,1)	104 (26,3)	3,8 (1,8)
27	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
28	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
29	292,5 (25,8)	886,7 (99,7)	2,2 (0,7)	86 (11,1)	535,5 (20,7)	4 (1,2)
30	173,5 (52)	495,7 (80,9)	4,2 (1,1)	32 (1)	282 (20,2)	6,5 (1,9)
31	8 (3)	49 (15,8)	1,2 (0,4)	0 (0)	26,5 (6,6)	2,8 (0,6)

В табл. 4 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 32-38), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 3. Для зародышевой плазмы LH244 сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Для зародышевой плазмы 01DKD2 сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК выше в кисточке V10-V12, чем сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК для кисточки V8-V9 или других образцов ткани.

Таблица 4. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 18

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
32	376,5 (320,7)	118 (30,8)	2 (0,6)	7,5 (3,5)	516 (307,1)	2,8 (0,9)
33	111,5 (12,6)	1032,7 (26,8)	17,8 (13,1)	4,5 (2,5)	648,5 (174,3)	2,8 (1)
34	848,5 (675,3)	572,7 (211,3)	3 (0,6)	8,5 (0,5)	982 (389,9)	3,5 (1,3)
35	437 (370,7)	117,7 (22,8)	1,6 (0,6)	4 (3)	519 (319,2)	2,8 (0,5)
36	906,5 (668,2)	606,7 (231,5)	2,2 (0,7)	15,5 (1,5)	1225,5 (480,3)	4,3 (1,5)
37	554 (370,7)	553 (48,5)	1,5 (0,4)	9,5 (1,5)	1224,5 (153)	3,3 (1,4)
38	768,5 (480,3)	1442,7 (17,2)	1,4 (0,5)	8,5 (2,5)	1305,5 (10,6)	3 (1,5)

В табл. 5 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 39-42), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 4. Для зародышевой плазмы LH244 сигналы для последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Для зародышевой плазмы 01DKD2 сигналы для последовательностей мтс-миРНК выше в кисточке V10-V12, чем сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК для кисточки V8-V9 или других образцов ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 4 и 5, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 18, можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 5. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 18

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
39	442,5 (242,9)	2157,3 (1059,3)	0,6 (0,2)	16 (12,1)	1514,5 (525,8)	1,5 (1,5)
40	119 (2)	448,7 (125,1)	1,5 (0,5)	7,5 (0,5)	452 (97)	2,8 (0,9)
41	185,5 (19,7)	702,7 (195,2)	0,9 (0,3)	5 (1)	752 (225,3)	3 (1,5)
42	143,5 (7,6)	564,3 (154,3)	2,6 (0,8)	6 (1)	588 (163,6)	5,3 (1,5)

В табл. 6 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 43-46), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 5. Для зародышевой плазмы LH244 сигналы для последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Для зародышевой плазмы 01DKD2 сигнал для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 43-44) выше в кисточке V10-V12, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для кисточки V8-V9 или других образцов ткани; и сигналы для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 45-46) выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК как в кисточке V8-V9, так и в кисточке V10-V12 по сравнению с другим образцом ткани.

Таблица 6. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 19

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
43	52,5 (29,8)	147,3 (13,2)	1 (0,3)	4 (0)	190,5 (2,5)	4,3 (2,4)
44	756 (548,5)	1340 (75)	1,8 (0,5)	15,5 (1,5)	1443,5 (85,4)	6,3 (1,7)
45	7901 (1803,1)	9982,3 (2999)	8,2 (5,4)	253 (11,1)	7195,5 (759,1)	5,8 (4,1)
46	4502,5 (424,8)	8663,3 (1595,4)	8,4 (6,2)	252 (9,1)	6778 (124,2)	6,8 (3,8)

В табл. 7 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 47-52), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 6. Для зародышевой плазмы LH244 сигналы для последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Для зародышевой плазмы 01DKD2 сигналы для последовательностей мтс-миРНК выше в кисточке V10-V12, чем сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК для кисточки V8-V9 или других образцов

ткани; сигналы для последовательностей мтс-миРНК 47 и SEQ ID NO: 48) незначительно выше в кисточке V8-V9, по сравнению с сигналом для этих последовательностей мтс-миРНК для другого образца ткани; сигнал для последовательности мтс-миРНК (SEQ ID NO: 52) значительно выше в кисточке V8-V9 по сравнению с сигналом для этой последовательности мтс-миРНК для другого образца ткани и сигналы для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51) незначительно отличаются от сигнала для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 6 и 7, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 19, можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 7. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 19

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
47	157,5 (5,6)	900,7 (51,8)	15,5 (7,4)	12,5 (1,5)	1051,5 (199,5)	4 (0,7)
48	221 (106,1)	720,3 (251,7)	4,8 (2,7)	9,5 (6,6)	470,5 (57,1)	1 (0,4)
49	340 (239,4)	1241,7 (105,7)	16,3 (5,4)	57,5 (10,6)	867 (117,2)	55,3 (11,6)
50	296 (228,3)	722 (267,2)	0 (0)	5,5 (5,6)	326 (262,6)	1,8 (1,8)
51	158 (78,8)	287 (46)	34,3 (6,5)	24,5 (0,5)	275,5 (20,7)	40 (3,1)
52	4080 (1829,4)	3629,7 (1327,5)	5,5 (3,5)	234 (11,1)	3286,5 (33,8)	3,5 (2,1)

В табл. 8 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 53-60), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 20, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 7. Для обеих зародышевой плазмы LH244 и 01DKD2 сигналы для этих последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 8, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 20, можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 8. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 20

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
53	76,5 (1,5)	145 (19,4)	2,2 (0,8)	16 (2)	84 (1)	1,5 (0,5)
54	100,5 (3,5)	172 (21,6)	14,2 (6,2)	56 (22,2)	231 (79,8)	19,5 (4,7)
55	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
56	261 (1)	692 (59,7)	49,5 (30,4)	138,5 (29,8)	599,5 (41,9)	19,3 (4,8)
57	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
58	215,5 (14,6)	349 (29,1)	0,7 (0,3)	88,5 (2,5)	327 (31,3)	2 (0,9)
59	789 (97)	1262,7 (169,2)	4,1 (2,6)	202 (24,2)	811,5 (115,7)	0,3 (0,3)
60	141,5 (9,6)	265,7 (30,1)	5,8 (1,2)	75,5 (5,6)	303 (37,4)	9,3 (1,8)

В табл. 9 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 61-69), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 21, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 8. Для обеих зародышевых плазм LH244 и 01DKD2 сигналы для последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 9, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 21, можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 9. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 21

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
61	850,5 (8,6)	334,7 (222,3)	9,4 (3,4)	461 (154,6)	454 (1)	8 (5)
62	44,5 (5,6)	11,3 (3,9)	1,8 (0,7)	13,5 (5,6)	15,5 (6,6)	1 (1)
63	34,5 (4,5)	11,7 (2,2)	3,2 (1)	14,5 (1,5)	18 (1)	1,5 (0,5)
64	23 (8,1)	13,7 (4,6)	1,8 (1)	13,5 (13,6)	9 (8,1)	1,3 (0,9)
65	811,5 (169,2)	260,3 (103,2)	5,8 (2,7)	444,5 (4,5)	454,5 (45)	12 (8,4)
66	199,5 (54)	48 (20,6)	1,9 (0,7)	61 (44,4)	55,5 (34,9)	2,8 (1,8)
67	216 (18,2)	62 (16,6)	3,3 (2)	123,5 (0,5)	107 (17,2)	4,3 (2,6)
68	265 (86,9)	85,3 (20,4)	5 (2,3)	98 (62,6)	96 (56,6)	2,5 (2,2)
69	516 (82,8)	185 (82,1)	11,2 (4,1)	309,5 (19,7)	282,5 (2,5)	9,8 (5,5)

В табл. 10 показаны результаты относительного микроматричного сигнала для репрезентативных последовательностей мтс-миРНК (приведенные в данном документе как SEQ ID NO: 70-87), которые выравниваются с последовательностью кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 22, которая содержит последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 9. Для зародышевой плазмы LH244 сигналы для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 70, 71, 73, 75-81, 83-87) в кисточке V8-V9 и кисточке V10-V12 выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК для других образцов ткани; и сигналы для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 72, 74, 82) в другой ткани было выше, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК в равной степени в кисточке V8-V9 или кисточке V10-V12. Для зародышевой плазмы 01DKD2 сигналы для последовательностей мтс-миРНК (SEQ ID NO: 70-87) выше в кисточке V10-V12, чем сигнал для этих последовательностей мтс-миРНК в кисточке V8-V9 или в других образцах ткани. Результаты микроматричного анализа, приведенные в табл. 10, демонстрируют, что последовательность кДНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 22, можно использовать в качестве источника для конструирования целевых элементов мтс-миРНК для молекул рекомбинантной ДНК.

Таблица 10. Результаты анализа микрочипов для кДНК SEQ ID NO: 22

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)	V8-V9 кисточка (STDR)	V10-V12 кисточка (STDR)	Другая ткань (STDR)
70	56,5 (23,7)	694 (256,9)	1,8 (0,4)	3 (3)	873 (308,1)	4 (1,5)
71	1125,5 (383,4)	2380 (696,9)	1,6 (0,5)	46 (0)	1943,5 (447)	2,3 (1,3)
72	323,5 (54)	325,7 (55,9)	1324,8 (1083,3)	332,5 (83,3)	530 (89,9)	233,3 (16,5)
73	1058,5 (370,2)	2395,7 (634,9)	4,5 (1,8)	37,5 (2,5)	1695,5 (380,3)	2 (1,4)
74	83,5 (20,7)	129 (11,2)	164,2 (106,5)	43,5 (0,5)	171 (19,2)	45,8 (4,5)
75	53 (34,3)	237,3 (62,1)	3,3 (0,5)	3 (1)	257 (74,8)	5 (1,8)
76	55 (38,4)	252,3 (66,5)	5,7 (1)	2,5 (0,5)	276,5 (81,3)	4 (1,4)
77	180,5 (64,1)	302,7 (111,2)	4,1 (2,3)	0,5 (0,5)	225 (30,3)	2,5 (0,6)
78	47,5 (15,7)	642,7 (242)	1 (0,4)	3 (2)	715,5 (211,6)	4,5 (1)
79	197,5 (62,1)	269,3 (106,8)	1,9 (0,6)	5 (1)	290,5 (28,8)	2 (0,4)
80	138 (83,8)	383,3 (44,6)	0,7 (0,3)	2,5 (1,5)	230 (43,4)	0,5 (0,3)
81	207 (113,1)	470,3 (55,2)	1,6 (1,1)	1 (1)	320 (69,7)	0 (0)
82	95,5 (29,8)	137 (17,7)	217,4 (158,6)	71,5 (7,6)	211 (14,1)	54,8 (5,1)
83	173 (63,6)	303 (82)	2,5 (1,2)	2 (1)	253,5 (24,7)	1,5 (0,6)
84	13 (5,1)	35,7 (7,1)	4,4 (1,5)	0 (0)	20 (10,1)	1 (0,4)
85	184 (71,7)	310 (109,1)	2,8 (1,3)	2,5 (0,5)	246 (14,1)	2,5 (1)
86	173,5 (62,1)	241,7 (101,2)	2,4 (0,7)	3 (1)	256,5 (7,6)	3 (0,9)
87	56 (35,4)	104 (12,7)	4,7 (2)	2,5 (0,5)	91,5 (6,6)	2,5 (1)

Эти анализы подтвердили, что шесть последовательностей кДНК (SEQ ID NO: 17-22) были богаты последовательностями мешеней мтс-миРНК и что соответствующая мтс-миРНК продемонстрировала высокую специфичность для кисточки. Таким образом, эти последовательности кДНК содержат последовательности, которые можно использовать с помощью методов молекулярной биологии для создания молекул рекомбинантной ДНК, которые содержат целевые элементы мтс-миРНК, которые могут обеспечивать опосредованное через мтс-миРНК сайленсинг трансгена.

Анализ соответствующей геномной последовательности, содержащей целевые элементы мтс-миРНК, проводили для 32 различных зародышевых плазм кукурузы (с относительной зрелостью (RM) в пределах от 80 до 120 дней), обычно используемых в качестве женского растения в гибридном скрещивании для подтверждения присутствия и любого изменения последовательности целевых элементов мтс-миРНК. Для целевых элементов мтс-миРНК, представленных как SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, три набора пар праймеров для термической амплификации были сконструированы, чтобы амплифицировать соответствующую последовательность в пределах последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 17. Эти праймеры использовали для получения ПЦР-ампликона в геномной ДНК, выделенной из ткани каждой зародышевой плазмы. Ампликоны были получены из всех тестируемых зародышевых плазм. Последовательность ампликона через тридцать две зародышевые плазмы была либо на 100% идентична последовательности целевого элемента мтс-миРНК, либо содержала минимальное количество однонуклеотидных полиморфизмов (до 95% идентичных). Эти данные демонстрируют, что трансгенные растения получены с рекомбинантной ДНК-конструкцией, содержащие трансген, кодирующий рекомбинантный белок, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК, представленный как SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 имела бы мужскую тканевую специфическую регуляцию экспрессии рекомбинантного белка в большинстве зародышевых плазм кукурузы. Если трансген кодирует рекомбинантный белок, придающий глифосатную толерантность, тогда у кисточек большинства из зародышевых плазм кукурузы будет глифосат-индуцированная мужская стерильность.

Пример 2. Рекомбинантные ДНК-конструкции и векторы трансформации растений.

Рекомбинантные ДНК-конструкции и векторы трансформации растений были созданы с использованием последовательностей ДНК, соответствующих областям шести последовательностей кДНК, идентифицированных как богатые последовательностями мишеней мтс-миРНК. Конструкции рекомбинантной ДНК и векторы трансформации растений были сконструированы так, чтобы быть использованными для получения трансгенных растений, в которых специфичный для кисточек сайленсинг трансгена, функционально связанного с целевым элементом мтс-миРНК, происходил бы через мтс-миРНК-опосредованный сайленсинг.

Девять целевых элементов мтс-миРНК были разработаны с использованием результатов анализа шести последовательностей кДНК. Каждый целевой элемент мтс-миРНК был сконструирован так, чтобы иметь последовательность ДНК, содержащую множество перекрывающихся последовательностей мишеней мтс-миРНК, к которым может связываться различная мтс-миРНК. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 1, имеет 95% идентичность последовательности с нуклеотидным положением от 1429 до 1628 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 17. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 2, имеет изменение одного нуклеотида (T69A) относительно SEQ ID NO: 1. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 3, соответствует нуклеотидному положению 239-443 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 4, соответствует нуклеотидному положению 477-697 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 18. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 5, соответствует нуклеотидному положению 239-443 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 6 соответствует нуклеотидному положению 370-477 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 19. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 7, соответствует нуклеотидному положению 1357-1562 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 20. Последовательность целевого элемента мтс-миРНК, представленная в данном документе как SEQ ID NO: 8, соответствует нуклеотидному положению 247-441 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 21. Обратная комплементарная цепь последовательности целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 9, имеет 99% идентичность последовательности с нуклеотидным положением от 191 до 490 последовательности кДНК, представленной в данном документе как SEQ ID NO: 22 с тремя нуклеотидными несоответствиями (C314A, A350G и G408A) SEQ ID NO: 22 относительно последовательности обратной комплементарной цепи SEQ ID NO: 9. Дополнительные целевые элементы мтс-миРНК могут быть созданы путем комбинирования последовательностей ДНК разных целевых элементов мтс-миРНК или фрагментов из двух или более областей кДНК, богатых мишенью мтс-миРНК, таким путем как комбинирование всех или фрагментов двух или более целевых эле-

ментов мтс-миРНК, представленных в данном документе как SEQ ID NO: 1-9, и/или одной или нескольких последовательностей мтс-миРНК, представленными в данном документе как SEQ ID NO: 23-92. Различные фрагменты этих целевых элементов мтс-мРНК длиной от 21 до 170 нуклеотидов были комбинированы и были получены новые целевые элементы мтс-миРНК с использованием способов синтеза ДНК, известных в данной области, и представлены в виде SEQ ID NO: 10-16.

Целевые элементы мтс-миРНК были субклонированы в конструкции рекомбинантной ДНК с целевым элементом мтс-миРНК, функционально связанным с 3'-концом открытой рамки считывания гена cp4-epsps (SEQ ID NO: 93), кодирующего белок CP4-EPSPS для устойчивости глифосата и 5' к функционально связанному 3'-нетранслируемому участку (3'-UTR). Рекомбинантные ДНК-конструкции также содержат функционально связанные комбинации одной из трех комбинаций промотора/интрона/энхансера и последовательности транзитного пептида хлоропласта. Конфигурации экспрессионной кассеты содержатся в векторах трансформации для проверки эффективности мишени мтс-миРНК.

Пример 3. Тестирование трансформации растений и эффективности.

Трансформационные векторы, содержащие рекомбинантные ДНК-конструкции, использовали с методом трансформации на основе Agrobacterium и незрелыми эмбрионами кукурузы и методами, известными в данной области. Собирали образцы листьев растений R0 и проводили молекулярный анализ для отбора трансгенных растений, содержащих единственную копию (одну вставку) или двойную копию (две независимые вставки) рекомбинантной ДНК-конструкции и без векторной основы. Трансформанты с однократной копией не были опрысканы глифосатом и были самоопылены и продвинулись для сбора семян R1, в то время как трансформанты с двойной копией использовались для разбрызгивания глифосатом R0 для оценки вегетативной устойчивости и индуцированной мужской стерильности. Трансгенные растения, которые не были опрысканы глифосатом, имели нормальное цветение, нормальное сбрасывание пыльцы и нормальное развитие пыльцы, определяемое окрашиванием Alexandar и микроскопическим наблюдением.

Трансформанты R0 с двойной копией использовались при тестировании, чтобы приблизиться к гомозиготному трансформанту с одной копией. Растения опрыскивали глифосатом на двух разных стадиях роста, чтобы определить, обеспечивает ли присутствие целевого элемента мтс-миРНК в конструкции рекомбинантной ДНК вегетативную глифосатную устойчивость и индуцированную глифосатом стерильность кисточек. Растения опрыскивали в теплице с 1X глифосатом (0,75 фунта а.е./акр), применяемым на стадии V5, с последующим добавлением 1X глифосата (0,75 фунта а.е./акр), применяемого на стадии V8. Через семь дней после применения глифосата на стадии V5 растения были оценены по вегетативному повреждению с оценкой ≤10% травмы, что считается свидетельством вегетативной устойчивости к глифосату (% вегетативной толерантности). Мужская стерильность измерялась двумя способами.

Растения, которые демонстрировали вегетативную устойчивость к глифосату, были оценены после применения глифосата на стадии V8 для полной глифосат-индуцированной мужской стерильности, измеренной как отсутствие экструзии пыльника до стадии S90 +12 (% полной мужской стерильности). Затем пыльники собирали и рассекали для микроскопического наблюдения за развитием пыльцы. Пыльники для каждого трансформанта испытывали на отсутствие жизнеспособных пыльцевых зерен, полученных как обнаружено окрашиванием Alexandar под микроскопическим наблюдением, и оценивались как не создающие жизнеспособной пыльцы (% без пыльцы). В растениях, не опрысканных глифосатом, развитие кисточек, экструзия пыльников и развитие пыльцы были нормальными.

Целевые элементы мтс-миРНК были испытаны в нескольких конфигурациях вектора трансформации. Каждый вектор трансформации использовался для получения нескольких растений R0 с каждым растением R0, представляющим уникальный трансгенный объект, созданный с использованием того же вектора трансформации. Данные для трех различных конфигураций векторов трансформации представлены в табл. 11 и 12.

Целевые элементы двенадцати мтс-миРНК тестировали в первой векторной конфигурации (A) с результатами, показанными в табл. 11. Удивительно, что процент растений, демонстрирующих вегетативную толерантность к глифосату, варьировал от 80 до 100%, но процентная доля, демонстрирующая полную индуцированную глифосатом мужскую стерильность (индуцированная мужская стерильность, включала как нежизнеспособную пыльцу, так и отсутствие производства пыльцы) колебалась от 0 до 100%. См. табл. 11. Например, растения, полученные с использованием вектора трансформации, содержащего целевой элемент мтс-миРНК, кодируемый SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15, имели высокие показатели, свидетельствующие о вегетативной устойчивости к глифосату (в пределах от 90 до 100% тестируемых растений), но ни у одного из трансгенных объектов не было обнаружено полной индуцированной глифосатом мужской стерильности; растения, полученные с использованием вектора трансформации, содержащего целевой элемент мтс-миРНК, кодируемый SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9 имели высокие показатели, свидетельствующие о вегетативной устойчивости к глифосату (от 90 до 100% тестируемых растений) и умеренные показатели, демонстрирующие мужскую стерильность, вызванную глифосатом (в пределах от 50 до 40% тестируемых растений); и растения, полученные с использованием вектора трансформации, содержащего целевой элемент мтс-миРНК, закодированный SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8 имели высокие показатели, указывающие на вегетативную ус-

тойчивость к глифосату (в пределах от 88 до 100% тестируемых растений) и высокие показатели, демонстрирующие мужскую стерильность, вызванную глифосатом (82-100% тестируемых растений). Развитие пыльцы оценивали по окраске Alexandar. Было обнаружено, что растения, содержащие четыре трансформанта, выполненные с вектором трансформации, содержащим целевой элемент мтс-миРНК, предоставленный в виде SEQ ID NO: 2, и опрысканные глифосатом для индуцирования мужской стерильности, имеют очень мало абортированных зерен пыльцы или у них не было обнаружено пыльцевых зерен. Растения, которые не получали глифосат, имели нормальную пыльцу. См. фиг. 4.

Таблица 11. Оценка растений R0

SEQ ID NO:	Конфигурация вектора	Количество обрызганных растений	% Вегетативной устойчивости	% Полной мужской стерильности	% Без пыльцы
2	A	11	100	82	82
3	A	10	90	10	0
4	A	7	86	7	0
5	A	10	90	50	0
6	A	9	90	82	0
7	A	9	88	100	44
8	A	10	90	100	50
9	A	10	100	40	0
13	A	7	100	0	0
14	A	10	90	0	0
15	A	10	90	0	0
16	A	10	80	50	0

Четыре других целевых элемента мтс-миРНК были испытаны во второй и третьей векторной конфигурации (B и C соответственно) с результатами, показанными в табл. 12. Различия как в процентах растений, демонстрирующих вегетативную устойчивость глифосата, так и в процентах, демонстрирующих полную мужскую стерильность, вызванную глифосатом, наблюдались между двумя векторными конфигурациями. Векторная конфигурация B обеспечивала повышенный процент растений, демонстрирующих вегетативную устойчивость к глифосату для всех тестируемых целевых элементов мтс-миРНК. Для процента, демонстрирующего полную глифосат-индуцированную мужскую стерильность, два протестированных целевых элемента мтс-миРНК (SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11) лучше выполнялись в векторной конфигурации C, один из целевых элементов мтс-миРНК (SEQ ID NO: 12) лучше выполнялись в векторной конфигурации B, и один из целевых элементов мтс-миРНК (SEQ ID NO: 1) обеспечили 100% полную глифосат-индуцированную мужскую стерильность в обеих конфигурациях B и C.

Таблица 12. Оценка растений R0

SEQ ID NO:	Конфигурация вектора	Обрызганные растения	% Вегетативной устойчивости	% Полной мужской стерильности	% Без пыльцы
1	B	9	67	100	100
10	B	10	90	55	22
11	B	2	100	50	0
12	B	10	100	50	20
1	C	13	38	100	60
10	C	6	83	100	0
11	C	9	55	80	0
12	C	15	87	23	0

Из растений, демонстрирующих вегетативную устойчивость к глифосату, процент растений с индуцированной глифосатом мужской стерильностью без жизнеспособной пыльцы составлял от 0 до 100%. Для растений, полученных с использованием вектора трансформации, у которого было более 60% тестируемых растений, демонстрирующих вегетативную устойчивость к глифосату и полную, вызванную глифосатом, мужскую стерильность, процент растений, у которых нет жизнеспособной пыльцы, составлял от 0 до 100%. Два целевых элемента мтс-миРНК (SEQ ID NO: 1 в векторной конфигурации B и SEQ ID NO: 2 в векторной конфигурации A) имели соответственно 100 и 82% нежизнеспособной пыльцы. Эти два целевых элемента мтс-миРНК (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2) отличаются на один нуклеотид и получены из одной и той же последовательности кДНК (SEQ ID NO: 17).

Пример 4. Иммунолокализация белка CP4-EPSPS в кисточке.

Иммунолокализация белка CP4-EPSPS в кисточке трансгенных растений использовалась для анализа экспрессии белка на уровне клеток и тканей, чтобы подтвердить потерю экспрессии белка CP4-EPSPS в пыльце из-за присутствия функционально связанного целевого элемента мтс-миРНК. R3 поколение трансгенных растений, содержащих трансген cp4-epsps, функционально связанный с SEQ ID NO: 1 или в качестве контроля трансген cp4-epsps без функционально связанного целевого элемента мтс-миРНК выращивали в теплице. Растения опрыскивали 1X глифосатом (0,75 фунта а.е./акр) на стадии V2 для подтверждения вегетативной устойчивости. Кисточки размером от 1 до 17 см собирали на стадиях V8-V12, когда ткань пыльника находилась в материнской клетке микроспоре и на стадиях свободной микроспоры. Пыльники удаляли из колокола кисточки с использованием рассекающих щипцов и сразу фиксировали в 3,7% формальдегиде в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) в мягком вакууме. После промывки в PBS ткани помещали в среду для заливки и немедленно замораживали. Замороженные тканевые блоки хранили при -80°C до тех пор, пока они не разделялись на срезы в микротоме -20°C и не собирались на заряженных слайдах.

Срезы тканей блокировали блокирующим агентом (10% нормальной козьей сыворотки, 5% альбумина бычьей сыворотки, 0,1% Triton X-100 в PBS) в течение двух часов. Срезы инкубировали с анти-CP4-EPSPS антителом (1/500 в PBS). После промывки срезов три раза в PBS срезы тканей инкубировали с вторичным антителом, козьим антимышиным IgG, конъюгированным с Alexa Flour® 488 (Invitrogen, Юджин, Орегон). Отрицательный контроль был приготовлен путем исключения инкубации антител CP4-EPSPS. Как первичные, так и вторичные антитела инкубировали при комнатной температуре в течение 2-4 часов, а затем дополнительно инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывания ткани были визуализированы с помощью конфокального микроскопа с использованием лазерного сканирующего микроскопа Zeiss (LSM) 510 META с использованием 488 нм лазера для возбуждения и 500-550 нм (зеленый канал) для набора фильтров эмиссии. Один и тот же параметр изображения использовался во всех образцах, включая контроли. Люминесцентные и яркие изображения полей были отсканированы из каждого среза и затем объединены с использованием программного обеспечения LSM для отображения структурной информации. Данные для отрицательных контролей продемонстрировали ожидаемое отсутствие сигнала. Данные для трансгенных растений, содержащих трансген cp4-epsps, функционально связанный с SEQ ID NO: 1, продемонстрировали низкий сигнал флуоресценции, указывающий на низкую экспрессию белка CP4-EPSPS в стенке пыльника, тапетуме и развитие микроспор пыльцы пыльника. Данные для контрольных трансгенных растений (те, которые содержат трансген cp4-epsps без функционально связанного целевого элемента мтс-миРНК) показали высокий сигнал флуоресценции, указывающий высокую экспрессию белка CP4-EPSPS в стенке пыльника, тапетуме и развитие микроспор пыльцы пыльника.

Снижение экспрессии белка CP4-EPSPS в пыльце в растениях, содержащих трансген cp4-epsps, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК, представленный как SEQ ID NO: 1, коррелирует с наблюдаемой полной глифосат-индуцированной мужской стерильностью на этих растениях. Эти данные подтверждают, что наблюдаемая полная глифосат-индуцированная мужская стерильность является результатом потери экспрессии белка CP4-EPSPS в пыльце из-за присутствия функционально связанного целевого элемента мтс-миРНК, представленного SEQ ID NO: 1.

Пример 5. Полевые испытания.

Для оптимального использования при получении гибридов желательно иметь очень низкую экструзию пыльников в полевых условиях после применения гербицида в сочетании с вегетативной устойчивостью к гербицидам (что измеряется низким урожаем сельскохозяйственных культур). Другие аспекты получения гибридной кукурузы также могут быть желательными, такие как высота и урожайность растений. Чтобы оценить это, трансгенные растения, содержащие трансген cp4-epsps, оперативно связанный с мишенью-мишенью мтс-миРНК, были испытаны на продвинутых поколениях в полевых условиях и были измерены несколько параметров.

Полевые испытания растений поколения R3, содержащих трансген cp4-epsps, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК, представленным как SEQ ID NO: 1, были проведены в нескольких местах для оценки вегетативной устойчивости к глифосату и специфичной для кисточки чувствительности к глифосату. В полевых испытаниях были испытаны растения поколения R3, содержащие одну и ту же трансгенную вставку в разных геномных местах. Испытуемые растения содержали одну копию одного из четырех уникальных трансгенных объектов, созданных с использованием того же вектора трансформации растений, который содержит трансген cp4-epsps, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК, представленным как SEQ ID NO: 1. Испытания проводились с использованием рандомизированной полной блоковой разработки. Множественные показатели эффективности и агрономические параметры были оценены в течение всего сезона полевых испытаний, и в конце сезона была определена урожайность. Полевые испытания для оценки эффективности проводились путем применения гербицида глифосата при 0,75 фунта а.е./акр на стадии V7, затем 0,75 фунта а.е./акр на стадии V9 и оценки процентного соотношения урожая на стадии VT (CIPVT), среднего процента экструзии пыльников на этапе S90+8 (AES9E) и урожайности (измеренный как бушели на акр (бушель/акр)) в кон-

це сезона. Полевые испытания включали устойчивый к глифосату трансгенный объект NK603 (номер депозита ATCC PTA-24780) в качестве отрицательного контроля для вызванной глифосатом мужской стерильности и в качестве положительного контроля для вегетативной устойчивости к глифосату. Растения, содержащие трансформант NK603, демонстрируют вегетативную устойчивость к глифосату на коммерческом уровне и обеспечивают полностью устойчивую кисточку к глифосату. Все данные были подвергнуты анализу дисперсии и среднему (LSD), разделенному при $p<0,05$.

Таблица 13. Результаты эффективности свойств для полевых испытаний с растениями, содержащими SEQ ID NO: 1

Трансформант	CIPVT	AES9E
NK603 контроль	1,25	95,00
Трансформант 1	1,25	0
Трансформант 2	3,75	3,25
Трансформант 3	0	4,00
Трансформант 4	0	1,75

Средний урожай на стадии VT для контрольных растений, содержащих трансформант NK603, составлял 1,25. Средний урожай для растений, содержащих трансформант 1, трансформант 2, трансформант 3 и трансформант 4, составлял 1,25, 3,75, 0 и 0 соответственно. Наименее значимое различие в урожае (LSD) при 0,05 было 10,25 для всех проверенных трансформантов. Эти результаты демонстрируют, что растения, содержащие четыре трансгенных объекта, содержащих целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, имели от нулевого до очень низкого вегетативное повреждение с применением 0,75 фунта а.е./акр глифосата в V7, затем V9, аналогично контрольным растениям, содержащим трансформант NK603.

Средняя экструзия пыльников на стадии S90+8 для контрольных растений, содержащих трансформант NK603, составляла 95. Средняя экструзия пыльника на S90+8 для растений, содержащих трансформант 1, трансформант 2, трансформант 3 и трансформант 4, составляла 0, 3,25, 4 и 1,75 соответственно. Средняя экструзия пыльника при S90+8 LSD при 0,05 составила 42,71 для всех тестируемых трансформантов. Эти результаты демонстрируют, что растения, содержащие четыре трансгенных объекта, содержащих целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, имели нулевую или очень низкую экструзию пыльника с применением 0,75 фунта а.е./акр глифосата в V7, за которым следует V9, в отличие от контрольных растений, содержащих трансформант NK603, которые были мужскими полностью фертильными, после применения глифосата.

В конце сезона кукурузу собирали из этих полевых испытаний и определяли урожайность. Средняя урожайность для контрольных растений, содержащих трансформант NK603, составила 96,74 бушель/акр. Средняя урожайность для растений, содержащих трансформант 1, трансформант 2, трансформант 3 и трансформант 4, составляла 102,17 бушель/акр, 96,48 бушель/акр, 97,59 бушель/акр и 95,8 бушель/акр соответственно. Урожай LSD при 0,05 составил 26,25 бушель/акр для всех протестированных событий. См. табл. 14. Эти результаты демонстрируют, что растения, содержащие четыре трансгенных объекта, содержащих целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, имели паритет урожайности с NK603.

Таблица 14. Результаты урожайность для полевых испытаний с растениями, содержащими SEQ ID NO: 1

Трансформант	Средняя урожайность (бушель/акр)
NK603 контроль	96,74
Трансформант 1	102,17
Трансформант 2	96,48
Трансформант 3	97,59
Трансформант 4	95,8

Полевые испытания инбредных растений R2 или более высоких поколений, содержащих трансген cp4-epsps, функционально связанный с различными целевыми элементами мтс-миРНК, проводились в нескольких местах для оценки вегетативной устойчивости к глифосату и специфичной для кисточки чувствительности к глифосату. В полевых испытаниях тестировались инбредные растения R2 или более высокого поколения, содержащие единственную копию трансгена cp4-epsps, функционально связанного с целевым элементом мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8, каждый в конфигурации A вектора трансформации. Испытания проводились с использованием группового блока с коэффициентом группирования, являющимся либо вектором трансформации, либо группой векторов специфичной для кисточки чувствительности к глифосату, если номера трансформантов для конкретного вектора преобразования были низкими. Множественные показатели

эффективности и агрономические параметры были оценены в течение всего сезона полевых испытаний, и в конце сезона была определена урожайность. Полевые испытания для оценки эффективности проводились путем применения глифосата на 1,5 фунта а.е./акр, нанесенного на кукурузу на стадии V2 с последующим глифосатом при 0,75 фунта а.е./акр, нанесенного на кукурузу при V8 (875 дней с возрастанием), а затем глифосат при 0,75 фунта а.е./акр, применяемый к V10 кукурузы (1025 дней роста). Оценки процентного коэффициента урожая на стадии VT (CIPVT), средний процент экструзии пыльников на этапе S90+8 (AES90+8), средняя высота растения (в дюймах) и урожайность (измеренный как бушели на акр (бушель/акр)) в конце сезона. Полевые испытания включали устойчивый к глифосату трансгенный объект NK603 в качестве отрицательного контроля для глифосат-индуцируемой мужской стерильности и в качестве положительного контроля для вегетативной устойчивости к глифосату. Устойчивую к глифосату смесь мужских опылителей, состоящую из трех гибридных основ зародышевой плазмы, помещали на каждый третий участок и окружали все испытание, чтобы служить источником пыльцы для тестовых записей. Обработки гербицидами применяли с использованием рюкзака CO_2 или распылителя, установленного на тракторе, который был откалиброван для доставки 15 галлонов на акр (GPA) с использованием вдуваемых форсунок Teejet® TTI (TeeJet Technologies, Спрингфилд, Иллинойс) с водой в качестве носителя гербицида. Все данные были подвергнуты анализу дисперсии и среднему (LSD), разделенному при $p<0,05$. Результаты приведены в табл. 15.

Никаких существенных различий в процентах урожая при VT (CIPVT) или средней высоте растения по сравнению с контролем NK603 не наблюдалось для тестируемых растений, содержащих целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8. Растения, содержащие целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7, также не имели значительного снижения урожайности семян по сравнению с контролем NK603. Растения, содержащие целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7, имели очень низкую или не имели вообще экструзию пыльника с AES90+8 значениями 0-2,75% и 0-1,5% соответственно. Растения, содержащие целевой элемент мтс-миРНК SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8 имели значительно уменьшенную экструзию пыльников по сравнению с контрольными растениями, причем значения AES90+8 варьировали от 10 до 25%.

Таблица 15. Различные мтс-миРНК в той же конфигурации А вектора трансформации

SEQ ID NO:	# протестированных объектов	CIPVT (LSD=8,1)	AES90+8 (LSD=10)	Урожайность семян бу/акр (LSD=24,7)	Средняя высота растения (дюймы) (LSD=6,9)
не определено	NK603	0-6,25%	90%	110	83,2
1	8	2,5-6,25%	0-2,75%	97-99	84,75
4	4	1,25-3,75%	16,25-18,75%	70-80	85,1
5	4	5%	10%-20%	90-100	84,31
6	7	3,75%	25%	120	82,1
7	2	3,75-5%	0-1,5%	100-110	79,8
8	2	2,5-2,7%	15,75-17,85%	80-90	80,1

Пример 6. Получение гибридных семян.

Трансгенные растения и семена по изобретению могут быть использованы для целей разведения, в том числе для получения гибридных семян. Трансгенные растения кукурузы, содержащие рекомбинантную конструкцию ДНК, содержащую трансген, кодирующий глифосат-толерантный EPSPS-белок, функционально связанный с целевым элементом мтс-миРНК, высаживают в области, такой как открытое поле. Другое родительское растение (растения) кукурузы может находиться или не находиться в одной и той же области. Для борьбы с сорняками при получении семян глифосат может быть нанесен на трансгенные растения кукурузы на вегетативных стадиях, как указано на этикетках сельскохозяйственных продуктов Roundup®.

Получение гибридных семян может быть проведено путем применения глифосата к трансгенным растениям кукурузы (женское растение), начиная непосредственно перед или во время развития кисточки на этапах вегетативного роста кукурузы от V7 до V13. Применение глифосата вызывает индуцированный мужской стерильный фенотип через тканеселективную устойчивость к глифосату в трансгенных

растениях кукурузы. Индуцированные мужские стерильные трансгенные растения кукурузы могут быть опылены другими растениями-донорами пыльцы (мужское растение), в результате чего жизнеспособное гибридное семя кукурузы переносит конструкцию рекомбинантной ДНК для тканеселективной устойчивости к глифосату. Растения-доноры пыльцы могут присутствовать или не присутствовать в одной и той же области и могут быть или не быть трансгенными растениями кукурузы. Опыление может быть осуществлено любыми способами, известными в данной области, в том числе путем близкого размещения растений или путем опыления вручную. Гибридные семена собирают из трансгенных растений кукурузы.

Показывая и описывая принципы изобретения, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что изобретение может быть модифицировано при компоновке и детализировано без отхода от таких принципов. Мы заявляем все изменения, которые находятся в пределах сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая целевой элемент мтс-миРНК, который содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 и их комплементарных цепей, при этом целевой элемент мтс-миРНК функционально связан с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, где наличие указанной молекулы рекомбинантной ДНК селективно подавляет экспрессию указанной гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулы в мужской репродуктивной ткани растения.

2. Молекула рекомбинантной ДНК по п.1, отличающаяся тем, что гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула кодирует белок, который обеспечивает устойчивость к гербицидам у растений.

3. Молекула рекомбинантной ДНК по п.2, отличающаяся тем, что указанная гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула кодирует глифосат-толерантную 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазу (EPSPS).

4. Способ получения молекулы рекомбинантной ДНК, включающий функциональное связывание целевого элемента мтс-миРНК, включающего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 и их комплементарных цепей, с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой.

5. Трансгенное растение или его часть, проявляющие селективное подавление экспрессии белка, содержащие в своем геноме молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

6. Семя трансгенного растения по п.5, проявляющее селективное подавление экспрессии белка, содержащее указанную молекулу ДНК.

7. Растение по п.5, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой однодольное растение.

8. Растение по п.7, отличающееся тем, что указанное растение представляет собой растение кукурузы.

9. Способ селективной регуляции экспрессии белка в мужской репродуктивной ткани трансгенного растения, включающий экспрессию в указанном трансгенном растении молекулы рекомбинантной ДНК по п.1.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанный белок содержит глифосат-толерантную 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазу (EPSPS).

11. Способ индуцирования мужской стерильности в трансгенном растении, включающий:

a) выращивание трансгенного растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит целевой элемент мтс-миРНК, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 и их комплементарных цепей, при этом целевой элемент мтс-миРНК функционально связан с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, кодирующей белок, который придает устойчивость по меньшей мере к первому гербициду; и

b) применение эффективного количества указанного гербицида к указанному трансгенному растению, при этом применение гербицида проводят до или одновременно с развитием мужской репродуктивной ткани указанного трансгенного растения, тем самым индуцируя мужскую стерильность в трансгенном растении.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула кодирует глифосат-толерантную 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазу (EPSPS).

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный гербицид представляет собой глифосат.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что указанное эффективное количество гербицида составляет от примерно 0,125 (0,057 кг) фунтов кислотного эквивалента на акр (0,4 га) до примерно 8 фунтов (3,6 кг) кислотного эквивалента на акр глифосата.

15. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное эффективное количество гербицида применяют на стадии развития, выбранной из группы, состоящей из стадий V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 и V14.

16. Способ получения гибридных семян, включающий:

a) применение эффективного количества гербицида к трансгенному растению, содержащему молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит целевой элемент мтс-миРНК, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 и их комплементарных цепей, при этом целевой элемент мтс-миРНК функционально связан с гетерологичной транскрибируемой полинуклеотидной молекулой, кодирующей белок, который придает устойчивость по меньшей мере к первому гербициду, при этом указанное применение гербицида проводят до или одновременно с развитием мужской репродуктивной ткани трансгенного растения, тем самым индуцируя мужскую стерильность в указанном трансгенном растении;

b) оплодотворение указанного трансгенного растения пыльцой со второго растения; и

c) возможность формирования гибридных семян из указанного трансгенного растения.

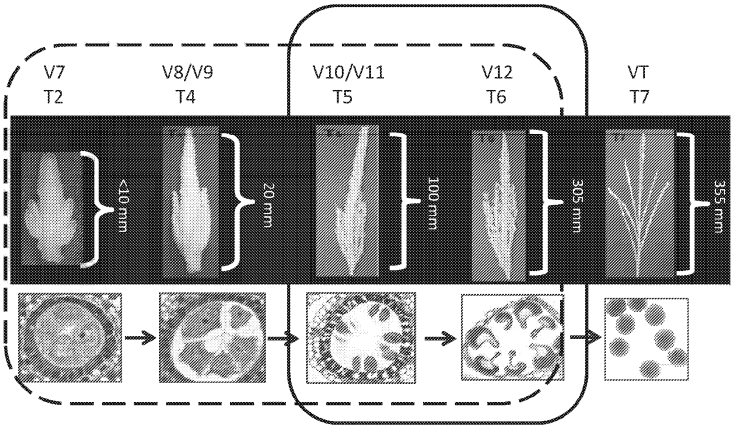
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанное оплодотворение включает возможность опылению происходить с помощью ветра.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанная гетерологичная транскрибируемая полинуклеотидная молекула кодирует глифосат-толерантную 5-енолпирувил-шикимат 3-фосфатсинтазу (EPSPS).

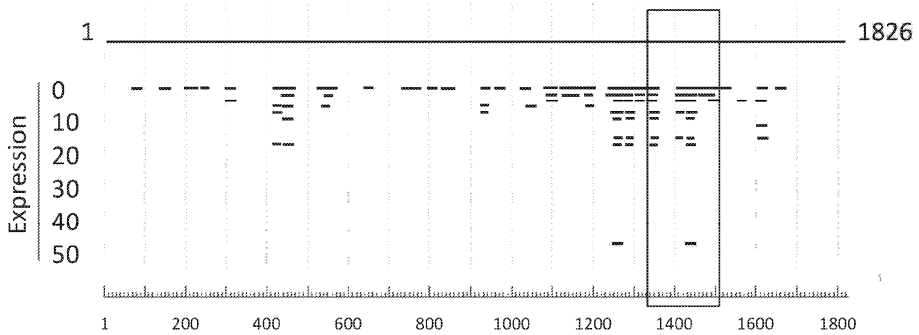
19. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный гербицид представляет собой глифосат.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный глифосат применяют одновременно с развитием при эффективном количестве от примерно 0,125 фунтов (0,057 кг) кислотного эквивалента на акр (0,4 га) до примерно 8 фунтов (3,6 кг) кислотного эквивалента на акр.

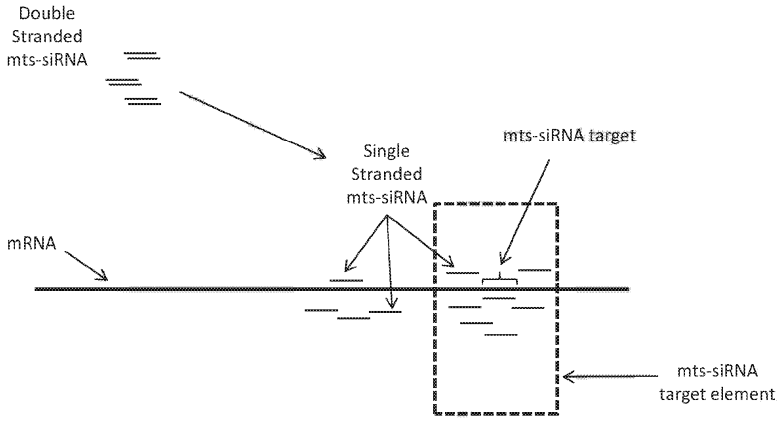
21. Гибридные семена, полученные способом по п.16, при этом гибридные семена содержат указанную рекомбинантную молекулу ДНК.



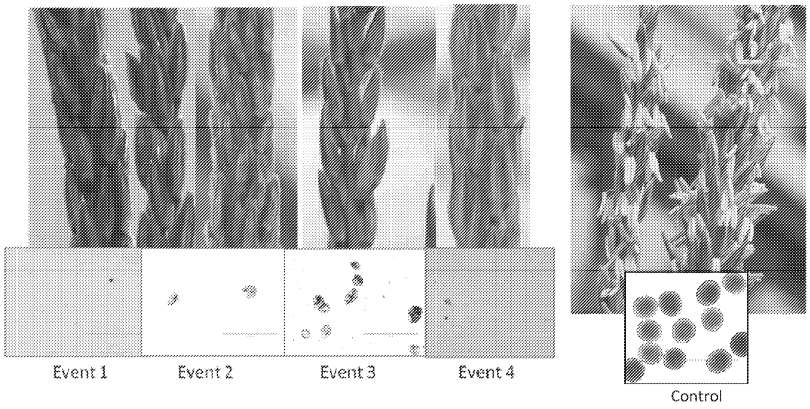
Фиг. 1



Фиг. 2


Double
Stranded
mts-siRNA
Single
Stranded
mts-siRNA
mts-siRNA target
mRNA
mts-siRNA
target element

Фиг. 3


Event 1
Event 2
Event 3
Event 4
Control

Фиг. 4