

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2367

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.12.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.12.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/457037**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.01.2003**
(Věstník č. 1/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/12872**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/041558**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 01 H 5/00

A 01 H 5/10

C 12 Q 1/68

C 12 N 15/09

C 12 N 15/82

(71) Přihlašovatel:

AVENTIS CROPS SCIENCE N. V., Gent, BE;

(72) Původce:

De Both Greta, Wetteren, BE;

De Beuckeleer Marc, Zwijnaarde, BE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Hybrid ozimé řepky olejky a způsob jeho
přípravy**

(57) Anotace:

Řešení se týká transgenních rostlin ozimé řepky olejky (Brassica napus), konkrétně páru rostlin ozimé řepky olejky, který je obzvláště vhodný pro produkci hybridních semen. První rostlina je charakterizována tím, že jde o rostlinu se samčí sterilitou, díky přítomnosti genu samčí sterility v jejím genomu, zatímco druhá rostlina je charakterizována tím, že nese gen obnovující fertilitu, který je schopný zabránit aktivitě genu samčí sterility. Pár rostlin ozimé řepky olejky podle řešení spojuje schopnost vytvářet hybridní semena s optimálním celkovým agronomickým výkonem, genetickou stabilitou a adaptabilitou k různému genetickému pozadí.

CZ 2002 - 2367 A3

11.10.02

1

PV 002-2367

HYBRID OZIMÉ ŘEPKY OLEJKY A ZPŮSOB JEHO PŘÍPRAVY

4426

Oblast techniky

Tento vynález se týká rostlin ozimé řepky olejky, konkrétně dvojice rostlin ozimé řepky olejky, která je obzvláště vhodná pro produkci hybridních semen. Konkrétněji, jedna rostlina je charakterizována tím, že je to rostlina se samčí sterilitou, díky přítomnosti genu samčí sterility v jejím genomu, zatímco druhá je charakterizována tím, že nese gen obnovující fertilitu, který je schopný zabránit aktivitě genu samčí sterility. Pár rostlin ozimé řepky olejky podle vynálezu spojuje schopnost vytvářet hybridní semena s optimálním celkovým agronomickým výkonem, genetickou stabilitou a adaptabilitou k různému genetickému pozadí.

Všechny dokumenty citované v tomto textu jsou formou odkazu součástí předkládaného popisu.

Dosavadní stav techniky

Fenotypová exprese transgenu v rostlině je určena jak strukturou genu samotného tak jeho lokalizací v rostlinném genomu. Současně přítomnost transgenu v odlišných místech genomu ovlivňuje celkový fenotyp rostliny odlišným způsobem. Agronomicky nebo průmyslově úspěšné vnesení komerčně zajímavých znaků do rostliny metodami genových manipulací může být značně zdlouhavý postup závislý na mnoha různých faktorech. Skutečná transformace a regenerace geneticky transformovaných rostlin jsou pouze prvními kroky v celé řadě selekčních kroků, která zahrnuje extenzivní genetickou

charakterizaci, další šlechtění a vyhodnocení v polních pokusech.

Řepka olejka (*Brassica napus*, AACCC, $2n=38$) je přírodní hybrid vzniklý mezidruhovou hybridizací mezi brukví zelnou (*Brassica oleracea*, CC, $2n = 18$) a brukví tuřínem (*Brassica campestris*, AA, $2n = 20$). Ozimá řepka olejka se vysévá v průběhu posledních 10 dnů srpna a prvních deseti dnů září a sklízí se následující rok v červenci, neboť vyžaduje období s nízkou teplotou pro vernalizaci. Rychleji rostoucí jarní řepky se sejí na konci března až začátku dubna a sklizeň probíhá od poloviny srpna do září. Hlavní typy řepky olejky pěstované v současnosti jsou odrůdy s nízkým a vysokým obsahem erukové kyseliny. Tzv. Dvojitě nízké (00) odrůdy obsahují nízkou (typicky méně než 1 %) hladinu erukových kyselin (které jsou pro člověka obtížně stravitelné) a nízké hladiny glukosinolátů (které činí vedlejší produkty nestravitelné pro zvířata). Běžné využití "00" odrůd představuje olej pro lidskou spotřebu a krmivo pro zvířata s vysokým obsahem proteinů. K průmyslovému využití patří také základní suroviny pro léčiva a hydraulické oleje. Odrůdy řepky s vysokým obsahem erukové kyseliny (HEAR) jsou pěstované specificky pro jejich obsah erukové kyseliny - typicky 50 až 60 % oleje. Hlavním konečným použitím HEAR je výroba erukamidu, což je "kluzné činidlo" používané při výrobě polyethanu. Malý podíl se využívá při výrobě behenylalkoholu, který se přidává k voskovitým surovým minerálním olejům pro zlepšení jejich tekutosti.

Rostliny řepky olejky jsou bisexuální a typicky ze 60 až 70 % samosprašné. Produkce hybridů a vnášení genetické variability jakožto základu pro selekci byly tradičně závislé na adaptaci v přírodě se vyskytujícího jevu jako je například self-inkompatibilita a cytoplazmatická samčí sterilita. Metody umělé kontroly opylení jako je například ruční sterilizace

(emaskulace) nebo použití gametocidních látek nebyly ve šlechtění řepky více rozšířeny vzhledem k jejich omezené praktické použitelnosti a vysokým finančním nákladům.

Byly vyvinuty transgenní metody pro vytvoření samčí nebo samičí sterilní rostliny, které poskytují zajímavé alternativy k tradičním technikám.

EP 0,344,029 popisuje systém pro získání jaderné samčí sterility, přičemž rostliny jsou transformovány genem samčí sterility, který obsahuje například DNA kódující barnázu, který je řízen promotorem specifickým pro tapetum (specifické pletivo prašníků), PTA29, který po vnesení do rostliny zajišťuje selektivní destrukci buněk tapeta. Transformace rostlin tabáku a řepky olejky takovým chimérickým genem vedlo k rostlinám, u kterých bylo zcela zabráněno tvorbě pylu (Mariani et al. 1990, Nature 347: 737-741).

Pro obnovu fertility v potomstvu rostlin se samčí sterilitou byl vytvořen systém, kdy je samčí sterilní rostlina křížena s transgenní rostlinou nesoucí gen obnovující fertilitu, který je po expresi schopen snížit nebo zcela zrušit aktivitu genu samčí sterility (viz US 5,689,041, US 5,792,929). Takový gen obnovující fertilitu je umístěn pod kontrolu promotoru řídicího expresi alespoň v buňkách toho typu, kde je gen samčí sterility exprimován. Mariani et al. (1992. Nature 357:384-387) prokázali, že u řepky olejky sterilita kódovaná genem pTA29-barnáza může být obnovena chimérickým genem pTA29-barstar.

Cytochemická a histochemická analýza vývoje prašníků u rostlin *Brassica napus* obsahujících samotný chimérický gen pTA29:barnáza nebo pTA29:barstar je popsána v publikaci De Block a De Brouwer (1993, Planta 189:218-225).

Úspěšné transformace rostlin druhů *Brassica* bylo dosaženo

řadou metody včetně infekce užitím *Agrobacterium* (jak bylo popsáno například v EP 0,116,718 a EP 0,270,882), ostřelováním mikročásticemi - biobalistickou metodou (jak bylo popsáno například Chen et al., 1994, Theor. Appl. Genet. 88:187-192) a pomocí přímého příjmu DNA (jak bylo popsáno například De Block et al. 1989, Plant Physiol. 914:694-701, Poulsen 1996, Plant Breeding 115:209225).

Avšak žádná z citovaných publikací nepopisovala ani nenavrhovala řešení popsané v předkládané přihlášce.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká dvojice rostlin ozimé řepky olejky obzvláště vhodných pro produkci hybridních semen. Konkrétněji se předkládaný vynález týká první transgenní rostliny ozimé řepky olejky nebo jejích semen, buněk nebo tkání, obsahujících, integrovanou do svého genomu, expresní kazetu, která obsahuje gen samčí sterility, a druhé transgenní rostliny ozimé řepky olejky nebo jejích semen, buněk nebo tkání, obsahujících, integrovanou do svého genomu, expresní kazetu, která obsahuje gen obnovující fertilitu, a hybridní semena získaná křížením první a druhé rostliny, která obsahují gen samčí sterility a/nebo gen obnovující fertilitu integrované do svého genomu.

V jednom provedení vynálezu první rostlina ozimé řepky olejky nebo její semena, buňky nebo pletiva, obsahuje expresní kazetu pTHW107. Ve výhodném provedení vynálezu první rostlina ozimé řepky olejky nebo její semena, buňky nebo pletiva obsahují událost MS-BN1. V dalším provedení vynálezu druhá rostlina ozimé řepky olejky nebo její semena, buňky nebo pletiva, obsahuje expresní kazetu pTHW118. Ve výhodném

provedení vynálezu rostlina ozimé řepky olejky nebo její semena, buňky nebo pletiva obsahují událost RF-BN1. V obzvláště výhodném provedení vynálezu první rostlina ozimé řepky olejky obsahuje událost MS-BN1 a druhá rostlina ozimé řepky olejky obsahuje událost RF-BN1 a hybridní semena od nich získaná obsahují dokonce MS-BN1 a RF-BN1 nebo samotnou RF-BN1.

Vynález se týká transgenních semen ozimé řepky olejky nebo rostliny, která může být z těchto semen pěstována, jejichž genomová DNA je charakterizována jednou nebo oběma následujícími vlastnostmi:

- a) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji alespoň čtyři, nejvýhodněji pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
 - i) jeden soubor dvou EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp a jeden délky více než 14 kbp,
 - ii) jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp a druhý má délku více než 14 kbp,
 - iii) jeden soubor dvou HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
 - iv) jeden soubor tří AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
 - v) Jeden soubor dvou NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

kde každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravenou štěpením plazmidu pTHW107 enzymem HindIII, jak je popsáno v tomto textu, a/nebo

b) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji čtyři soubory restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

- i) jeden soubor tří BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, výhodně přibližně 1849 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2607 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně přibližně 6500 bp,
- ii) jeden soubor čtyř EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, výhodně přibližně 1094 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp, výhodně přibližně 2149 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 7000 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,
- iii) jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden má délku přibližně 5,4 kbp a druhý má délku přibližně 8 kbp,
- iv) Jeden soubor tří HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp, výhodně přibližně 1969 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně jeden má délku přibližně 2565 bp a jeden má délku přibližně 2635 bp,

kde každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravenou štěpením plazmidu pTHW118 enzymem HpaI, jak je popsáno v tomto textu.

Předkládaný vynález se týká semen rostlin ozimé řepky olejky nebo rostliny, která může být z těchto semen pěstována nebo jejích buněk nebo tkání, jejichž genomová DNA je charakterizována jednou nebo oběma následujícími vlastnostmi:

- a) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, například alespoň čtyři, výhodněji pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny popsané v bodě a) výše obsahující soubory restričních fragmentů popsané v bodě a) i), ii), iii), iv) a v) výše, přičemž selekce může zahrnovat kteroukoliv kombinaci i), ii), iii), iv) a v) popsanych v bodě a) výše, a/nebo
- b) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, nejvýhodněji čtyři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny popsané v bodě b) výše obsahující soubory restričních fragmentů popsané v bodě b) i), ii), iii) a iv) výše, přičemž selekce může zahrnovat kteroukoliv kombinaci i), ii), iii) a iv) popsanych v bodě b) výše.

Vynález se dále týká semen ozimé řepky olejky nebo rostlin pěstovaných z těchto semen, jejichž genomová DNA je charakterizována jednou nebo oběma následujícími vlastnostmi:

- c) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, výhodně přibližně 280 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19, v daném pořadí, a/nebo
- d) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, výhodně přibližně 215 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41, v daném pořadí.

Vynález se dále týká semen ozimé řepky olejky nebo rostlin pěstovaných z těchto semen, jejichž genomová DNA je charakterizována vlastnostmi popsanými v bodě a) a c) výše a/nebo vlastnostmi popsanými v bodě b) a d) výše.

Předkládaný vynález se týká semen rostliny ozimé řepky olejky nebo rostliny, která může být z těchto semen pěstována, jejichž genomová DNA je charakterizována jednou nebo oběma následujícími vlastnostmi:

- a) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji alespoň čtyři, nejvýhodněji pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
- i) Jeden soubor dvou EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp a jeden délky více než 14 kbp,
 - ii) Jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp a druhý má délku více než 14 kbp,
 - iii) Jeden soubor dvou HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
 - iv) Jeden soubor tří AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
 - v) Jeden soubor dvou NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

kde každý z restričních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti

3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravitelnou štěpením HindIII plazmidu pTHW107, jak je popsáno v tomto textu, a/nebo,

- c) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, výhodně přibližně 280 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence ze SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19, v daném pořadí.

Předkládaný vynález se týká semen rostliny ozimé řepky olejky, výhodně rostliny se samčí sterilitou nebo rostliny, která může být z těchto semen pěstována nebo jejích buněk nebo tkání, jejichž genomová DNA je charakterizována tím, že je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny popsané výše obsahující soubory restričních fragmentů popsané v bodě i), ii), iii), iv) a v) výše, přičemž selekce může zahrnovat kteroukoliv kombinaci i), ii), iii), iv) a v) popsaných výše.

Předkládaný vynález se dále týká semen rostliny ozimé řepky olejky nebo rostliny pěstované z těchto semen, jejichž genomová DNA je charakterizována jednou nebo oběma následujícími vlastnostmi:

- b) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji čtyři restriční fragmenty nebo soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
- i) Jeden soubor tří BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, výhodně přibližně 1849 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2607 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně přibližně

6500 bp,

- ii) Jeden soubor čtyř EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, výhodně přibližně 1094 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp, výhodně přibližně 2149 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 7000 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,
- iii) Jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden má délku přibližně 5,4 kbp a druhý má délku přibližně 8 kbp,
- iv) Jeden soubor tří HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp, výhodně přibližně 1969 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně jeden má délku přibližně 2565 bp a jeden má délku přibližně 2635 bp,

kde každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravenou štěpením HpaI plazmidu pTHW118, popsáno v tomto textu,

A/nebo

- d) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, výhodně přibližně 215 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence ze SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41, v daném pořadí.

Předkládaný vynález se týká semen rostliny ozimé řepky olejky, výhodně rostliny obnovující fertilitu nebo rostliny, která může být z těchto semen pěstována nebo jejích buněk nebo tkání, jejichž genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, nejvýhodněji čtyři soubory restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny popsané výše, obsahující soubory restrikčních fragmentů popsané v bodě b) i), ii), iii) a iv) výše, přičemž selekce může zahrnovat kteroukoliv

kombinaci i), ii), iii) a iv) popsaných výše.

Předkládaný vynález se týká transgenních rostlin ozimé řepky olejky, buněk, tkání nebo semen, které jsou výhodně charakterizovány oběma vlastnostmi popsanými v bodě b) a/nebo d) výše, v daném pořadí.

Vynález se dále týká transgenních, výhodně hybridních rostlin ozimé řepky olejky s obnovenou fertilitou, buněk, tkání nebo semen získaných křížením rostliny se samčí sterilitou s rostlinou obnovující fertilitu podle vynálezu, charakterizovanou příslušnými vlastnostmi popsanými výše, přičemž rostliny s obnovenou fertilitou, buňky, pletiva nebo semena jsou charakterizována molekulárními vlastnostmi jak rostliny se samčí sterilitou, tak vlastnostmi rostliny ozimé řepky olejky obnovující fertilitu popsanými výše. Vynález se dále týká transgenních, výhodně hybridních rostlin ozimé řepky olejky, buněk, tkání nebo semen získaných křížením rostliny se samčí sterilitou s rostlinou obnovující fertilitu podle vynálezu charakterizovanou molekulárními vlastnostmi popsanými výše, přičemž hybridní rostliny, buňky, pletiva nebo semena jsou charakterizována molekulárními vlastnostmi rostliny ozimé řepky olejky obnovující fertilitu popsanými výše.

Vynález se také týká semen uložených v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730, rostliny, která je vypěstována z těchto semen a buněk nebo tkání z rostliny vypěstované z těchto semen. Vynález se dále týká rostliny získatelné množением a/nebo křížením s rostlinou ozimé řepky olejky pěstovanou ze semen uložených v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730.

Vynález se dále týká způsobu produkce hybridních semen ozimé řepky olejky, který zahrnuje křížení rostliny ozimé řepky olejky se samčí sterilitou podle předkládaného vynálezu s rostlinou ozimé řepky olejky obnovující fertilitu podle

vynálezu.

Vynález se dále týká rostliny ozimé řepky olejky, rostlinné buňky, rostlinné pletiva nebo semen, které obsahují rekombinantní DNA obsahující alespoň jeden transgen, integrovaný do části chromozómové DNA charakterizované sekvencí SEKV. ID. Č. 22 a/nebo rekombinantní DNA obsahující alespoň jeden transgen, integrovaný do části chromozómové DNA charakterizované sekvencí SEKV. ID. Č. 34.

Vynález dále poskytuje způsob produkce transgenní buňky rostliny ozimé řepky olejky nebo rostliny z ní získané, který obsahuje vnesení rekombinantní DNA molekuly do části chromozómové DNA buňky ozimé řepky olejky charakterizované sekvencí SEKV. ID. Č. 22 a, volitelně, regeneraci rostliny ozimé řepky olejky z transformované buňky ozimé řepky olejky.

Vynález dále poskytuje způsob produkce transgenní buňky rostliny ozimé řepky olejky nebo rostliny z ní získané, který obsahuje vnesení rekombinantní DNA molekuly do části chromozómové DNA buňky ozimé řepky olejky charakterizované sekvencí SEKV. ID. Č. 34 a, volitelně, regeneraci rostliny ozimé řepky olejky z transformované buňky ozimé řepky olejky.

Vynález se dále týká způsobu identifikace transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo tkání, obsahujících elitní událost MS-BN1 podle vynálezu, přičemž tento způsob zahrnuje zjištění jedné nebo obou následujících charakteristických vlastností genomové DNA transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo tkání:

a) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji alespoň čtyři, nejvýhodněji pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří

i) Jeden soubor dvou EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140

a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp a jeden délky více než 14 kbp,

- ii) Jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp a druhý má délku více než 14 kbp,
- iii) Jeden soubor dvou HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
- iv) Jeden soubor tří AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
- v) Jeden soubor dvou NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

kde každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravitelnou štěpením HindIII plazmidu pTHW107, jak popsáno v tomto textu, a/nebo

- c) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, výhodně přibližně 280 bp, podle PCR identifikačního protokolu, popsaného v tomto textu, s dvěma primery identifikujícími elitní událost majícími nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19, v daném pořadí.

Vynález se dále týká způsobu identifikace transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo tkání, obsahující elitní událost RF-BN1 podle vynálezu, tento způsob zahrnuje zjištění jedné nebo obou následujících charakteristických vlastností genomové DNA transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo tkání:

b) Genomová DNA je schopna poskytnout alespoň dva, výhodně alespoň tři, výhodněji čtyři restriční fragmenty nebo soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

- i) Jeden soubor tří BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, výhodně přibližně 1849 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2607 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně přibližně 6500 bp,
- ii) Jeden soubor čtyř EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, výhodně přibližně 1094 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp, výhodně přibližně 2149 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 7000 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,
- iii) Jeden soubor dvou EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden má délku přibližně 5,4 kbp a druhý má délku přibližně 8 kbp,
- iv) Jeden soubor tří HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp, výhodně přibližně 1969 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp, výhodně jeden má délku přibližně 2565 bp a jeden má délku přibližně 2635 bp,

kde každý z restričních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravitelnou štěpením HpaI plazmidu pTHW118, jak popsáno v tomto textu a/nebo

d) Genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, výhodně přibližně 215 bp, s použitím PCR identifikačního protokolu, popsaného v tomto textu, s dvěma primery identifikujícími elitní událost

majícími nukleotidovou sekvenci SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41, v daném pořadí.

Vynález se také týká soupravy pro identifikaci rostliny obsahující elitní událost MS-BN1 podle předkládaného vynálezu, souprava obsahuje PCR sondy mající nukleotidovou sekvenci SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

Vynález se dále týká soupravy pro identifikaci rostliny obsahující elitní událost RF-BN1 podle předkládaného vynálezu, souprava obsahuje PCR sondy mající nukleotidovou sekvenci SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.

Vynález se také týká soupravy pro identifikaci elitní události MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v biologických vzorcích, tato souprava obsahuje alespoň jeden specifický primer nebo sondu mající sekvenci, která odpovídá (nebo je komplementární k) sekvenci mající identitu sekvenční mezi 80 % a 100 % se specifickým úsekem MS-BN1 a/nebo alespoň jeden specifický primer nebo sondu mající sekvenci, která odpovídá (nebo je komplementární k) sekvenci mající identitu sekvenční mezi 80 % a 100 % se specifickým úsekem RF-BN1. Výhodně sekvenční sondy odpovídá specifickému úseku obsahujícímu část 5' nebo 3' sousedícího úseku MS-BN1 a/nebo RF-BN1. Nejvýhodněji specifická sonda má (nebo je komplementární k) sekvenci mající identitu sekvenční mezi 80 % a 100 % s rostlinnou DNA sekvencí v SEKV. ID. Č. 36 nebo SEKV. ID. Č. 38 pro MS-BN1 nebo s rostlinnou DNA sekvencí v SEKV. ID. Č. 39 nebo SEKV. ID. Č. 40 pro RF-BN1.

Výhodně souprava podle vynálezu obsahuje, kromě primeru, který specificky rozpoznává 5' nebo 3' sousedící úsek MS-BN1 a/nebo RF-BN1, druhý primer, který specificky rozpoznává sekvenci z MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v cizorodé DNA, pro použití v PCR identifikačním protokolu. Výhodně, souprava podle vynálezu obsahuje dva (nebo více) specifické primery, jeden, který

rozpoznává sekvenci ve 3' hraničním úseku MS-BN1 a/nebo RF-BN1, nejvýhodněji sekvenci v rostlinné DNA úseku SEKV. ID. Č. 36 nebo SEKV. ID. Č. 38 pro MS-BN1 nebo v rostlinné DNA sekvenci SEKV. ID. Č. 39 nebo SEKV. ID. Č. 40 pro RF-BN1 a další, který rozpoznává sekvenci MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v cizorodé DNA, v daném pořadí. Obzvláště výhodně primer rozpoznávající rostlinnou DNA sekvenci v 5' hraničním úseku MS-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 19. Konkrétně, primer rozpoznávající rostlinnou DNA sekvenci v 5' hraničním úsek MS-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 19 a primer rozpoznávající cizorodou DNA MS-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 12, popsáno v tomto textu. Obzvláště výhodně, primer rozpoznávající rostlinnou DNA sekvenci v 5' hraničním úseku RF-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 41. Konkrétně, primer rozpoznávající rostlinnou DNA sekvenci v 5' hraničním úseku MS-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 41 a primer rozpoznávající cizorodou DNA z RF-BN1 obsahuje nukleotidovou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 23, popsáno v tomto textu.

Způsoby a soupravy podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro odlišné účely, jako jsou například, ale bez omezení, následující: k identifikaci MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v rostlinách, rostlinném materiálu nebo v produktech, jako jsou například, ale bez omezení, potraviny nebo krmné produkty (čerstvé nebo zpracované) obsahující nebo pocházející z rostlinného materiálu, dodatečně nebo alternativně mohou být použity způsoby a soupravy podle předkládaného vynálezu k identifikaci transgenního rostlinného materiálu pro účely segregace mezi transgenním a netransgenním materiálem, dodatečně nebo alternativně mohou být použity způsoby a soupravy podle předkládaného vynálezu k určování kvality (tj.

procento čistého materiálu) rostlinného materiálu obsahujícího MS-BN1 a/nebo RF-BN1.

Je třeba mít na mysli, že konkrétní provedení vynálezu jsou popsána závislými patentovými nároky.

Popis obrázků

Následující detailní popis vynálezu uváděný jako příklad, aniž by omezoval vynález na popsaná specifická provedení, může/mohou být lépe pochopen ve spojení s doprovázejícími obrázky, jejichž seznam je následující:

Obr. 1. Plazmidová mapa pVE113

Obr. 2. Restrikční mapa získaná po štěpení MS-BN1 genomové DNA
Sekvence analyzované metodou „Southern blot“: dráha 1, MS-BN1 DNA štěpená EcoRI, dráha 2, MS-BN1 DNA štěpená EcoRV, dráha 3, MS-BN1 DNA štěpená HpaI, dráha 4, MS-BN1 DNA štěpená AflIII, dráha 5, MS-BN1 DNA štěpená NdeI, dráha 6, netransgenní ozimé řepky olejky DNA štěpená BamHI, dráha 7, netransgenní ozimé řepky olejky štěpená BamHI + DNA kontrolního plazmidu pTHW107 štěpená BamHI.

Obr. 3. Restrikční mapa získaná po štěpení RF-BN1 genomové DNA
Sekvence analyzované metodou „Southern blot“: dráha 1, RF-MS1 DNA štěpená BamHI, dráha 2, RF-BN1 DNA štěpená EcoRI, dráha 3, RF-BN1 DNA štěpená EcoRV, dráha 4, RF-BN1 DNA štěpená HindIII, dráha 5, netransgenní ozimé řepky olejky DNA štěpená BamHI, dráha 6, netransgenní ozimé řepky olejky štěpená BamHI + DNA

kontrolního plazmidu pTHW118 štěpená BamHI.

Obr. 4. PCR analýza odlišných linií s použitím MS-BN1 PCR identifikačního protokolu. Nanesení sekvencí na gel: dráha 1, vzorek DNA z řepky olejky rostliny obsahující transgenní událost MS-BN1, dráha 2, vzorek DNA z řepky olejky rostliny obsahující další transgenní událost, dráha 3, DNA z divokého typu řepky olejky, dráha 4, negativní kontrola (voda), dráha 5, standard molekulární hmotnosti (100 bp „žebřík“).

Obr. 5. PCR analýza odlišných linií s použitím RF-BN1 PCR identifikačního protokolu. Nanesení sekvencí na gel: dráha 1, vzorek DNA z řepky olejky rostlin obsahující transgenní událost RF-BN1, dráha 2, vzorek DNA z řepky olejky rostlin obsahující další transgenní událost, dráha 3, DNA z divokého typu řepky olejky, dráha 4, negativní kontrola (voda), dráha 5, standard molekulární hmotnosti (100 bp „žebřík“).

Detailní popis

Termín "gen", jak se v tomto textu používá, se týká kterékoliv DNA sekvence obsahující několik operativně spojených DNA fragmentů, jako je například promotor a 5' netranslatovaný úsek (5'UTR), které spolu tvoří úsek promotoru, kódující úsek (který může nebo nemusí kódovat protein) a netranslatovaný 3' úsek (3'UTR) obsahující polyadenylační místo. Typicky v rostlinných buňkách 5'UTR, kódující úsek a 3'UTR jsou transkribovány na RNA, která, v případě genu kódujícího protein, je translatována na protein. Gen může obsahovat další DNA fragmenty, jako jsou například introny. Jak se používá v tomto textu, genetický lokus je poloha daného genu v genomu rostliny.

Termín "chimerický" při popisu genu nebo DNA sekvence je použit k označení toho, že gen nebo DNA sekvence obsahuje alespoň dva funkčně relevantní DNA fragmenty (jako je například promotor, 5'UTR, kódující úsek, 3'UTR, intron), které nejsou přirozeně spojeny jeden s druhým a pocházejí například z odlišných zdrojů.

Termín "cizorodý" při popisu genu nebo DNA sekvence vzhledem k rostlinným druhům je použit k označení toho, že gen nebo DNA sekvence není přirozeně nalézána v těchto rostlinných druzích nebo není přirozeně nalézána v tomto genetickém lokusu v těchto rostlinných druzích. Termín "cizorodá DNA" je použit v tomto textu při popisu DNA sekvence, která byla vnesena do genomu rostliny jako výsledek transformace.

Termín "transformující DNA", jak se v tomto textu používá, se týká rekombinantní DNA molekuly použité pro transformace. Transformující DNA obvykle obsahuje alespoň jeden "požadovaný gen" (např. chimérický gen), který je schopen poskytnout transformované rostlině jednu nebo více specifických vlastností.

Termín "rekombinantní DNA molekula" je použit jako příklad a tedy může zahrnovat izolovanou molekulu nukleové kyseliny, která může být DNA a která může být získána rekombinantními nebo i dalšími postupy.

Termín "transgen", jak se používá v tomto textu, se týká termínu požadovaného genu, který byl vnesen do genomu rostliny. Termín "transgenní rostlina" se týká rostliny obsahující alespoň jeden transgen v genomu všech svých buněk.

Cizorodá DNA přítomná v rostlinách podle předkládaného vynálezu výhodně obsahuje dva požadované geny, konkrétněji, buďto gen samčí sterility a gen rezistence k herbicidu, nebo gen obnovující fertilitu a gen rezistence k herbicidu.

Termín "gen samčí sterility", jak se v tomto textu používá, se týká genu, který po expresi v rostlině činí rostlinu neschopnou produkce fertilního, životaschopného pylu. Příkladem genu samčí sterility je gen obsahující DNA sekvenci kódující barnázu pod kontrolou promotoru směřujícího expresi do buněk tapeta. Konkrétněji, gen samčí sterility podle předkládaného vynálezu je gen "PTA29-barnáza" popsán v tomto textu.

Termín "gen obnovující fertilitu", jak se v tomto textu používá, se týká genu, který svou expresí v rostlině obsahující gen samčí sterility, je schopný zabránit fenotypové expresi genu samčí sterility, čili obnovit fertilitu rostliny. Konkrétněji gen obnovující fertilitu obsahuje DNA kódující protein nebo polypeptid schopný zabránit fenotypové expresi genu samčí sterility pod kontrolou promotoru směřujícího expresi alespoň do buněk, ve kterých je gen samčí sterility exprimován. Konkrétněji, gen obnovující fertilitu podle předkládaný vynálezu je gen "TA29-barstar", jak je popsán v tomto textu.

Inkorporace rekombinantní DNA molekuly v rostlinném genomu je typicky výsledkem transformace buňky nebo pletiva (nebo dalších genetických manipulací). Konkrétní místo inkorporace je buďto náhodné nebo je v předem určené lokalizaci (pokud je použit způsob cílené integrace).

Cizorodá DNA může být charakterizována lokalizací a konfigurací v místě inkorporace rekombinantní DNA molekuly v rostlinném genomu. Místo v rostlinném genomu, kde byla vložena rekombinantní DNA, se také označuje jako "inzerční místo" nebo "cílové místo". Inzerce (vložení) transgenu do rostlinného genomu může být spojena s delecí rostlinné DNA, označovanou jako "delece cílového místa".

Termíny "sousedící úsek" nebo "sousedící sekvence"

(„flanking region“ a „flanking sequence“), jak se v tomto textu používají, se týkají sekvence alespoň délky 20 bp, výhodně alespoň 50 bp až 5000 bp rostlinného genomu, která je lokalizována buďto v protisměru a je bezprostředně přiléhající, nebo po směru a je bezprostředně přiléhající k cizorodé DNA. Transformační postupy vedoucí k náhodné integraci cizorodé DNA poskytují transformanty s odlišnými sousedícími úseky, které jsou charakteristické a unikátní pro každou transformantu. Když je transgen vnesen do rostliny metodou tradičního křížení, jeho inzerční místo v rostlinném genomu nebo jeho sousedící úseky se obecně nezmění. Termín „inzerční úsek“, jak se v tomto textu používá, se týká úseku odpovídajícímu alespoň 40 bp, výhodně alespoň 100 bp až více než 10000 bp, obsaženému v protisměru a po směru sousedících úsecích transgenu (tj. obklopujících transgen) v rostlinném genomu (netransformovaném) včetně inzerčního místa (a případné delece cílového místa). S ohledem na malé rozdíly v rámci biologického druhu způsobeného mutacemi, inzerční úsek si zachová alespoň 85%, výhodně 90%, výhodněji 95% a nejvýhodněji 100% sekvenční identitu se sekvencí obsahující úseky v protisměru a po směru sousedící s cizorodou DNA v rostlině tohoto druhu.

Expresí požadovaného genu se týká skutečnosti, že gen uděluje rostlině jeden nebo více fenotypových znaků (např. tolerance k herbicidu), které byly zamýšleny, že budou přeneseny tím, že se vnesen rekombinantní DNA molekula - transformující DNA - použítá při transformaci (na základě struktury a funkce části nebo všech požadovaných genů).

Termín „událost“ je definován jako (umělý) genetický lokus, který v důsledku genetické manipulace nese cizorodou DNA obsahující alespoň jednu kopii požadovaného genu. Typické alelové stavy události jsou přítomnost nebo absence cizorodé

DNA. Jak se v tomto textu specificky používá "MS" událost a "RF" událost se týkají události nesoucí gen "TA29-barnázy" a gen "TA29-barstar", v uvedeném pořadí. Událost je charakterizována fenotypově expresí jednoho nebo více transgenů. Na genetické úrovni, událost je část genetické výbavy rostlin. Na molekulární úrovni je událost charakterizována restriční mapou (např. určenou metodou Southern blotting) a/nebo v protisměru a/nebo po směru sousedící sekvencí transgenu a/nebo molekulární konfigurací transgenu. Obvykle transformace rostlin transformující DNA obsahující alespoň jeden požadovaný gen vede k mnohočetným událostem, z nichž každá je jedinečná.

Termín "elitní událost", jak se v tomto textu používá, je událost, která je vybrána ze skupiny, kterou tvoří události, získané transformací stejnou transformující DNA nebo zpětným křížením s rostlinou získanou takovou transformací, na základě exprese a stability transgenu a jeho kompatibility s optimálními agronomickými charakteristikami rostlin, které ho obsahují. Tedy kritéria pro výběr elitní události jsou jedno nebo více, výhodně dvě nebo více, nejvýhodněji všechna následující:

- a) přítomnost transgenu neohrožuje další požadované vlastnosti rostlin, jako jsou například vlastnosti související s agronomickým výkonem nebo komerční hodnotou,
- b) událost je charakterizována dobře definovanou molekulární konfigurací, která je stabilně děděna a pro kterou lze vyvinout vhodný diagnostický nástroj ke kontrole identity,
- c) požadovaný gen (nebo geny) v transgenu projevuje správnou, vhodnou a prostorově i časově trvalou expresi fenotypu, jak při heterozygotním (nebo hemizygotním) tak i homozygotním výskytu události, v komerčně přijatelném stupni v rozmezí environmentálních podmínek, ve kterých se rostliny nesoucí

událost budou pravděpodobně vyskytovat při jejich normálním agronomickém použití.

Je výhodné, když je cizorodá DNA asociována s polohou v rostlinném genomu, která dovoluje introgresi do požadovaného komerčního genetického pozadí.

Status události jako elitní události je potvrzen introgresí elitní události do odlišného relevantního genetického pozadí a pozorováním shody s jedním, dvěma nebo všemi z výše uvedených kritérií a), b) a c).

Navíc pro transgeny kódující samčí sterilitu a obnovu fertility popsané výše v tomto textu, výběr elitní události je také určen kompatibilitou mezi těmito událostmi, konkrétně tím, že potomstvo pocházející z křížení mezi rostlinou nesoucí událost samčí sterility a rostlinou nesoucí událost obnovitele fertility, ve kterém jsou obě události přítomny, má následující vlastnosti:

- a) adekvátní fenotypovou expresi fenotypu obnovitele fertility, tj. samčí fertility, a
- b) fenotypovou expresi v komerčně přijatelném stupni v rozmezí environmentálních podmínek, ve kterých se rostliny nesoucí událost budou pravděpodobně vyskytovat při jejich normálním agronomickém použití.

Termín "elitní událost" se tedy týká genetického lokusu obsahujícího transgen, který odpovídá výše popsaným kritériím. Rostliny, rostlinný materiál nebo potomstvo, jako je například semeno, mohou obsahovat jeden nebo více elitních událostí ve svém genomu.

"Diagnostický nástroj" vyvinutý k identifikaci elitní události rostlin nebo rostlinného materiálu obsahujících elitní událost, je založen na specifických genomových charakteristikách elitní události, jako je například

specifická restrikční mapa genomového úseku obsahujícího cizorodou DNA a/nebo sekvenční úseky sousedících s transgenem.

Termín "restrikční mapa", jak se v tomto textu používá, se týká souboru „Southern blot“ profilů získaných po štěpení rostlinné genomové DNA konkrétním restrikčním enzymem nebo souborem restrikčních enzymů a hybridizaci se sondou sdílející sekvenční podobnost s transgenem v podmínkách standardní stringence. Podmínky standardní stringence, jak se v tomto textu používá, označují podmínky pro hybridizaci popsané zde nebo jako podmínky obvyklé pro hybridizaci jak byly popsány v příručce Sambrook et al. (1989) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY), které například mohou zahrnovat následující kroky: 1) imobilizace fragmentů rostlinné genomové DNA na filtru, 2) prehybridizace filtru po dobu 1 až 2 hodin v podmínkách: 42 °C v 50% formamidu, 5X SSPE, 2X Denhardtova reagentie a 0,1% SDS nebo po dobu 1 až 2 hodin v 68 °C v 6X SSC, 2X Denhardtova reagentie a 0,1% SDS, 3) přidání hybridizační sondy, která byla označena, 4) inkubace po dobu 16 až 24 hodin, 5) promývání filtru po dobu 20 minut při teplotě místnosti v 1X SSC, 0,1 % SDS, 6) promývání filtru třikrát po dobu 20 minut, vždy v 68 °C v 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 7) expozice filtru po dobu 24 až 48 hodin na rentgenový film v -70 °C s intenzifikačním stínítkem.

Vzhledem k přítomnosti (endogenních) restrikčních míst v rostlinném genomu před inkorporací cizorodé DNA, inserce cizorodé DNA změni specifickou restrikční mapu tohoto genomu. Tedy, konkrétní transformanta nebo z ní pocházející potomstvo mohou být identifikovány pomocí jednoho nebo více specifických restrikčních profilů. Podmínky pro stanovení restrikční mapy události jsou popsány v "protokolu pro identifikaci restrikční mapy". Alternativně, jakmile jeden nebo oba úseky sousedící s

transgenem byly sekvencovány, mohou být vyvinuty PCR sondy, které specificky rozpoznávají tyto sekvence podle "PCR identifikačního protokolu". Rostliny nebo rostlinný materiál obsahující elitní událost mohou být identifikovány testováním podle PCR identifikačního protokolu použitím těchto specifických primerů.

Jak se používá v tomto textu, "biologický vzorek" je vzorek rostliny, rostlinný materiál nebo produkty obsahující rostlinný materiál. Termín "rostlina" zahrnuje také rostlinné pletiva, v jakémkoliv stádiu dospělosti, ozimé řepky olejky (*Brassica napus*), a také jakékoliv buňky, pletiva nebo orgány odebrané nebo pocházející z takových rostlin, včetně, avšak bez omezení, jakýchkoliv semen, listů, stonků, květů, kořenů, jednotlivých buněk, gamete, buněčných kultur, tkáňových kultur nebo protoplastů. "Rostlinný materiál", jak se v tomto textu používá, se týká materiálu, který je získán nebo pochází z rostlin. Produkty obsahující rostlinný materiál jsou potraviny, krmiva, a nebo další produkty, které jsou vyráběny s použitím rostlinného materiálu nebo mohou být kontaminovány rostlinným materiálem. Je třeba rozumět, že v kontextu předkládaného vynálezu, takové biologické vzorky jsou výhodně testovány na přítomnost nukleových kyselin specifických pro MS-BN1 a/nebo RF-BN1, ukazujících na přítomnost nukleových kyselin ve vzorcích. Tedy metody označované zde jako metody pro identifikaci elitní události MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v biologických vzorcích, se výhodně týkají identifikace nukleových kyselin, které obsahují elitní událost, v biologických vzorcích.

Termín "souprava", jak se v tomto textu používá, se týká souboru reagentů pro účely provádění způsobu podle vynálezu, konkrétněji, identifikace elitní události MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v biologických vzorcích. Konkrétněji, výhodné provedení

soupravy podle vynálezu obsahuje alespoň jeden nebo dva specifické oligonukleotidové primery, jak bylo popsáno výše. Volitelně, souprava může dále obsahovat jakékoliv další reagentie popsané v tomto textu v PCR identifikačním protokolu. Alternativně, podle dalšího provedení vynálezu, souprava může obsahovat specifické sondy, jak bylo popsáno výše, které specificky hybridizují s nukleovou kyselinou biologického vzorku k identifikaci přítomnosti MS-BN1 a/nebo RF-BN1 ve vzorku. Volitelně, souprava může ještě dále obsahovat jakékoliv další reagentie (jako je například, ale bez omezení, hybridizační pufr, značka) pro identifikaci MS-BN1 a/nebo RF-BN1 v biologických vzorcích, s použitím specifických sond.

Souprava podle vynálezu může být použita a její složky mohou být specificky upraveny, pro účely kontroly kvality (např., čistota jednotlivých šarží semen), detekce elitní události v rostlinném materiálu nebo materiálu obsahujícím rostlinný materiál nebo pocházejícím z rostlinného materiálu, jako jsou například, ale bez omezení, potravinářské produkty nebo krmiva.

Předkládaný vynález se týká vývoje souboru elitních událostí u ozimé řepky olejky, MS-BN1 a RF-BN1, rostlin, obsahujících tyto události, potomstva získaného křížením těchto rostlin a také rostlinných buněk nebo rostlinného materiálu získaného z těchto událostí. Rostliny obsahující elitní událost MS-BN1 byly získány prostřednictvím transformace plazmidem pTHW107, jak bylo popsáno v příkladu 1. Rostliny obsahující elitní událost RF-BN1 byly získány prostřednictvím transformace plazmidem pTHW118, jak je také popsáno v příkladu 1.

Rekombinantní DNA molekula použitá pro vytvoření elitní události MS-BN1 obsahuje DNA sekvenci kódující molekulu

barnázy pod kontrolou promotoru směřujícího expresi selektivně do buněk tapeta (nazvaná "TA29-barnáza"). TA29 promotor má "tapetum selektivní" expresní profil u řepky olejky (De Block a Debrouwer, *Planta* 189:218-225, 1993). Exprese genu TA29-barnázy v rostlinách ozimé řepky olejky vede k destrukci tapeta, což činí rostliny sterilní - jde o rostliny se samčí sterilitou (Mariani et al, 1990, výše). Rekombinantní DNA molekula použitá pro vytvoření elitní události RF-BN1 obsahuje DNA sekvenci kódující molekulu barstar pod kontrolou promotoru specifického pro tapetum (nazvaná "PTA29-barstar"). Exprese genu TA29-barstar v rostlinách ozimé řepky olejky v přítomnosti genu "TA29-barnázy" zabraňuje aktivitě barnázy v buňkách tapeta, a tím zabraňuje destrukci tapeta, a tudíž obnovuje fertilitu těchto rostlin (Mariani et al. 1992, výše).

Obě rekombinantní DNA, které se užívají pro vytvoření elitní události MS-BN1 a RF-BN1, navíc obsahují DNA sekvence kódující enzym fosfinotricinacetyltransferázu a 35S promotor z viru mozaiky kvěťáku (CMV), kde sekvence kódující fosfinotricinacetyltransferázu je pod kontrolou 35S promotoru (nazvaná "35S-bar"). 35S promotor má konstitutivní expresní profil u řepky olejky, což znamená významnou expresi ve většině buněčných typů v průběhu většiny životního cyklu rostliny. Exprese genu 35S-bar v rostlině řepky olejky poskytuje rostlině rezistenci k herbicidním sloučeninám fosfinotricinu, bialafosu nebo glufosinatu, nebo obecněji, inhibitorům glutaminsyntetázy nebo jejich solím nebo optickým izomerům.

Rostliny ozimé řepky olejky nebo rostlinný materiál obsahující MS-BN1 může být identifikován podle protokolů identifikace restriční mapy popsaného pro MS-BN1 v příkladu 5 v tomto textu. Stručně, genomová DNA ozimé řepky olejky je štěpena výběrem několika (výhodně dvou až pěti) z

následujících restrikčních enzymů: EcoRI, EcoRV, NdeI, HpaI, AflIII, pak je přenesena na nylonovou membránu a hybridizována s 3942 bp HindIII fragmentem plazmidu pTHW107 (nebo T-DNA v něm obsaženou). Pro každý restrikční enzym, který byl použit, se určí, zda mohou být identifikovány následující fragmenty:

- EcoRI: jeden fragment velikosti mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp a jeden fragment více než 14 kbp,
- EcoRV: jeden fragment velikosti mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp a jeden fragment více než 14 kbp,
- HpaI: jeden fragment velikosti mezi 1986 a 2140 bp, výhodně přibližně 1990 bp a jeden fragment velikosti mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
- AflIII: jeden fragment velikosti mezi 514 a 805 bp, výhodně přibližně 522 bp, jeden fragment velikosti mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp a jeden fragment velikosti mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
- NdeI: dva fragmenty délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp.

Délky DNA fragmentů jsou určeny srovnáním se souborem DNA fragmentů známé délky, konkrétně PstI fragmenty DNA fága lambda. Fragment delší než 14 kbp byl určen jako fragment délky mezi 14 kbp a 40 kbp, když extrakce DNA byla provedena způsobem podle Dellaporta et al. (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol. 3, p. 19-21).

Jestliže rostlinný materiál po štěpení s alespoň dvěma, výhodně alespoň třemi, konkrétně s alespoň čtyřmi, a zejména pak se všemi uvedenými restrikčními enzymy, poskytuje DNA fragmenty se stejnou délkou, jak byly popsány výše, rostlina ozimé řepky olejky je identifikována jako rostlina nesoucí

elitní událost MS-BN1.

Rostliny nebo rostlinný materiál obsahující MS-BN1 mohou také být identifikovány podle PCR identifikačního protokolu popsaného pro MS-BN1 v příkladu 5 v tomto textu. Stručně, genomová DNA ozimé řepky olejky je amplifikována PCR (polymerázovou řetězovou reakcí) s použitím primerů, které specificky rozpoznávají sousední sekvence MS-BN1, výhodně rozpoznávající 5' nebo 3' sousední sekvence MS-BN1 popsané v tomto textu, konkrétně primer mající sekvenci SEKV. ID. Č. 19 a primer, který rozpoznává sekvence v transgenu, konkrétně primer mající sekvenci SEKV. ID. Č. 12. Endogenní primery ozimé řepky olejky jsou použity jako kontroly. Jestliže rostlinný materiál poskytne fragment mezi 260 a 300 bp, výhodně přibližně 280 bp, rostliny ozimé řepky olejky byly identifikovány jako rostliny nesoucí elitní událost MS-BN1.

Rostliny obsahující MS-BN1 jsou fenotypově charakterizovány tím, že za absence genu obnovitele fertility v jejich genomu projevují samčí sterilitu. Rostliny se samčí sterilitou jsou definovány jako rostliny, které nejsou schopné vytvářet fertilní, životaschopný pyl.

Rostliny obsahující MS-BN1 mohou být například získány ze semen obsahujících MS-BN1 uložených v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730. Takové rostliny pak mohou být dále množeny pro přenesení elitní události podle vynálezu na další kultivary stejného rostlinného druhu.

Rostliny ozimé řepky olejky nebo rostlinný materiál obsahující RF-BN1 mohou být identifikovány podle protokolu identifikace restrikční mapy popsaného pro RF-BN1 v příkladu 5 v tomto textu. Stručně, genomová DNA ozimé řepky olejky je štěpena výběrem (výhodně dvěma až čtyřmi) z následujících restrikčních enzymů: BamHI, EcoRI, EcoRV a HindIII, pak je přenesena na nylonovou membránu a hybridizována s 2182 bp HpaI

fragmentem plazmidu pTHW118 (nebo T-DNA v něm obsaženou). Pro každý restrikční enzym se pak určí, zda mohou být identifikovány následující fragmenty:

- BamHI: jeden fragment délky mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden fragment délky mezi 1700 a 1986 bp, výhodně přibližně 1849 bp, jeden fragment délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2607 bp a jeden fragment délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně přibližně 6500 bp,
- EcoRI: jeden fragment délky mezi 805 a 1159 bp, výhodně přibližně 1094 bp, jeden fragment délky mezi 1986 a 2450 bp, výhodně přibližně 2149 bp a dva fragmenty délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 7000 bp a jeden přibližně 10 kbp,
- EcoRV: dva fragmenty délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden přibližně 5,4 kbp a přibližně 8 kbp,
- HindIII: jeden fragment délky mezi 1700 a 1986 bp, výhodně přibližně 1969 bp a dva fragmenty mezi 2450 a 2838 bp, výhodně jeden přibližně 2565 bp a jeden přibližně 2635 bp,

Délky DNA fragmentů jsou určeny srovnáním se souborem DNA fragmentů známé délky, konkrétně PstI fragmenty DNA fága lambda.

Jestliže rostlinný materiál po štěpení s alespoň dvěma, výhodně alespoň třemi, a zejména pak se všemi uvedenými restrikční enzymy, poskytuje DNA fragmenty se stejnou délkou, jak byly popsány výše, rostlina ozimé řepky olejky je identifikována jako rostlina nesoucí elitní událost RF-BN1.

Rostliny nebo rostlinný materiál obsahující RF-BN1 mohou také být identifikovány podle PCR identifikačního protokolu popsaného pro RF-BN1 v příkladu 5 v tomto textu. Stručně, genomová DNA ozimé řepky olejky je amplifikována PCR s použitím primeru, který specificky rozpoznává sousední

sekvence RF-BN1, výhodně 5' nebo 3' hraniční sekvence RF-BN1 popsané v tomto textu, konkrétně primer mající sekvenci SEKV. ID. Č. 41, a primer, který rozpoznává sekvence v transgenu, konkrétně primer mající sekvenci SEKV. ID. Č. 23. Endogenní primery ozimé řepky olejky jsou použity jako kontroly. Jestliže rostlinný materiál poskytuje fragment mezi 195 a 235 bp, výhodně přibližně 215 bp, rostliny ozimé řepky olejky jsou identifikovány jako rostliny nesoucí elitní událost RF-BN1.

Rostliny obsahující RF-BN1 jsou charakterizovány tím, že gen *barstar* je exprimován v buňkách tapeta. Produkce genu v buňkách tapeta rostlin nemá ani prospěšný ani škodlivý účinek na tvorbu pylu, jak bylo ukázáno (Mariani et al. 1992, výše). Tedy za absence genu samčí sterility v genomu rostliny, gen TA29-*barstar* nemá za následek pozorovatelný fenotyp. V přítomnosti genu samčí sterility v genomu rostliny, gen TA29-*barstar* poskytuje rostlinu s obnovenou fertilitou, tedy fertilní fenotyp. Fenotyp rostliny s obnovenou fertilitou je definován jako rostlina, která, i přes přítomnost genu samčí sterility ve svém genomu, je schopna produkce fertilního, životaschopného pylu.

Rostliny obsahující RF-BN1 mohou být například získány ze semen uložených v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730. Takové rostliny mohou být dále množeny a/nebo použity v obvyklých šlechtitelských postupech k přenesení elitní události podle vynálezu na další kultivary stejného rostlinného druhu.

Rostliny obsahující MS-BN1 a/nebo RF-BN1 jsou také charakterizovány jejich tolerancí ke glufosinátu, což v kontextu předkládaného vynálezu zahrnuje rostliny, které jsou tolerantní k herbicidu LibertyTM. Tolerance k herbicidu LibertyTM je definována kritériem, že postřik rostlin ve stádiu tři až čtyřech listů (3V až 4V) dávkou alespoň 200 gramů účinné složky/hektar (g.a.i./ha), výhodně 400 g.a.i./ha a

případně až 1600 g.a.i./ha, nezahubí rostliny. Rostliny obsahující MS-BN1 a/nebo RF-BN1 mohou být dále charakterizovány přítomností fosfinotricinacetyltransferázy v buňkách, která se stanoví PAT testem (De Block et al, 1987, supra).

Rostliny ozimé řepky olejky podle vynálezu mohou být pěstovány obvyklým způsobem. Přítomnost genu 35S-bar zajišťuje, že jsou tolerantní ke glufosinátu. Tudíž plevely na polích, kde jsou tyto rostliny ozimé řepky olejky pěstovány, mohou být plevely hubeny aplikací herbicidů obsahujících glufosinát jako účinnou složku (jako je například LibertyTM).

Rostliny obsahující MS-BN1 a/nebo RF-BN1 jsou také charakterizovány tím, že mají agronomické vlastnosti, které jsou srovnatelné s komerčně dostupnými odrůdami ozimé řepky olejky v USA. Relevantní agronomické vlastnosti jsou: výška rostliny, síla/pevnost stonku, tendence k poléhání, zimuvzdornost, odolnost k rozpraskávání, tolerance k suchu, a rezistence k nemocem (černá hniloba, skvrnitost listů, Sclerotinia), produkce semen a výnos.

Bylo pozorováno, že přítomnost cizorodé DNA v inzerčních úsecích v genomu rostlin ozimé řepky olejky (*Brassica napus*) popsaných v tomto textu, konkrétněji v inzerčních místech genomu rostlin ozimé řepky olejky, poskytují zvláště zajímavé fenotypové a molekulární vlastnosti rostlinám, které obsahují tyto události. Konkrétněji, přítomnost cizorodé DNA v těchto konkrétních úsecích genomu těchto rostlin vede k trvalé fenotypové expresi transgenů, aniž by se významně zhoršil kterýkoliv z aspektů požadované agronomické výkonnosti rostliny, což činí tyto rostliny zejména vhodné pro produkci hybridní ozimé řepky olejky. Tedy, inzerční úseky odpovídající sekvencím SEKV. ID. Č. 22 a SEKV. ID. Č. 34, a v nich konkrétně inzerční místo MS-BN1 a RF-BN1, jsou zejména vhodné

pro vnesení požadovaných genů. Konkrétněji, inzerční úseky MS-BN1 (SEKV. ID. Č. 22) a RF-BN1 (SEKV. ID. Č. 34) nebo inzerční místa MS-BN1 a RF-BN1, v daném pořadí, jsou zvláště vhodná pro vnesení plazmidů obsahujících gen samčí sterility a gen obnovující fertilitu, v daném pořadí, a zajišťují optimální expresi každého z těchto genů nebo obou genů v rostlině aniž by se zhoršila její agronomická výkonnost.

Rekombinantní DNA molekula může být specificky vložena do inzerčního úseku metodou cílené inzerce. Tyto metody jsou odborníkům dobře známy a patří k nim například homologní rekombinace s použitím rekombinázy, jako například, ale bez omezení, FLP rekombináza ze *Saccharomyces cerevisiae* (US Patent 5,527,695), CRE rekombináza z fága P1 *Escherichia coli* (publikovaná PCT přihláška WO 9109957, rekombináza z pSRI *Saccharomyces rouxii* (Araki et al. 1985, J. Mol. Biol. 182:191-203) nebo rekombinační systém fága lambda jak byl popsán například v US Patentu 4,673,640.

Termín "sekvenční identita", ve vztahu k nukleotidové sekvenci (DNA nebo RNA), se týká hodnoty počtu poloh s identickým nukleotidem děleného počtem nukleotidů v kratší ze dvou srovnávaných sekvencích. Porovnání dvou nukleotidových sekvencí se provádí algoritmem podle Wilbura a Lipmanna (Wilbur a Lipmann, 1983) s použitím parametrů: velikost okna 20 nukleotidů, délka slova 4 nukleotidy a penalta za mezeru 4. Počítačově prováděná analýza a interpretace sekvenčních dat, včetně srovnání sekvencí jak bylo popsáno výše, může být např. výhodně prováděna pomocí programů Intelligenetics™ Suite (Intelligenetics Inc., CA). Sekvence jsou "v podstatě podobné" když tyto sekvence mají sekvenční identitu alespoň přibližně 75 %, zejména alespoň přibližně 80 %, konkrétněji alespoň přibližně 85 %, a zvláště přibližně 90 %, obzvláště přibližně 95 %, a obzvláště přibližně 100%, a zejména

obzvláště jde o sekvence zcela identické. Je jasné, že když jsou RNA sekvence v podstatě podobné, nebo mají jistý stupeň sekvenční identity s DNA sekvencí, thymin (T) v DNA sekvenci se považuje za shodný s uracilem (U) v RNA sekvenci.

Jak se používá v tomto textu, termín "obsahující" je třeba chápat jako specifikující přítomnost dané vlastnosti, hodnoty, kroku nebo složky, což přitom nevyklučuje přítomnost nebo přidání jedné nebo více dalších vlastností, hodnot, kroků nebo složek nebo jejich skupin. Tedy např. nukleová kyselina nebo protein obsahující sekvenci nukleotidů nebo aminokyselin může obsahovat více nukleotidů nebo aminokyselin, než které jsou uvedeny, tj. může být např. vložena ve větší nukleové kyselině nebo proteinu. Chimérický gen obsahující DNA sekvenci, která je funkčně nebo strukturně definována, může obsahovat ještě další DNA sekvence, atd.

Následující příklady popisují vývoj a charakteristické vlastnosti rostlin ozimé řepky olejky obsahující elitní události MS-BN1 a RF-BN1.

Pokud není uvedeno jinak, všechny techniky rekombinantní DNA byly prováděny podle standardních protokolů popsáných v příručce Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, a nebo v dílech 1 a 2 příručky Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Standardní materiály a metody pro rostlinnou molekulární genetiku byly popsány v příručce Plant Molecular Biology Labfax (1993) R.D.D. Croy, publikované v BIOS Scientific Publications Ltd (UK) a Blackwell Scientific Publications, UK.

V popisu a příkladech se odvolává na následující sekvence:

- SEKV. ID. Č. 1: plazmid pTHW107
SEKV. ID. Č. 2: plazmid pTHW118
SEKV. ID. Č. 3: primer 248
SEKV. ID. Č. 4: primer 249
SEKV. ID. Č. 5: primer 247
SEKV. ID. Č. 6: primer 250
SEKV. ID. Č. 7: primer 251
SEKV. ID. Č. 8: primer 254
SEKV. ID. Č. 9: primer 258
SEKV. ID. Č. 10: primer SP6
SEKV. ID. Č. 11: primer T7
SEKV. ID. Č. 12: primer 201 (BNA01)
SEKV. ID. Č. 13: sekvence obsahující 5' sousedící úsek MS-BN1

SEKV. ID. Č. 14: primer 611
SEKV. ID. Č. 15: primer 259
SEKV. ID. Č. 16: primer 260
SEKV. ID. Č. 17: primer 24
SEKV. ID. Č. 18: sekvence obsahující 3' sousedící úsek MS-BN1

SEKV. ID. Č. 19: primer 51 (BNA02)
SEKV. ID. Č. 20: primer 48
SEKV. ID. Č. 21: sekvence obsahující delecí cílového místa MS-BN1

SEKV. ID. Č. 22: inzerční úsek MS-BN1
SEKV. ID. Č. 23: primer 193 (BNA03)
SEKV. ID. Č. 24: sekvence obsahující 5' sousedící úsek 1ZP-BN1

SEKV. ID. Č. 25: primer 286
SEKV. ID. Č. 27: primer 315
SEKV. ID. Č. 28: primer 316
SEKV. ID. Č. 29: primer 288
SEKV. ID. Č. 30: sekvence obsahující 3' sousedící

	úsek RF-BN1
SEKV. ID. Č. 31:	primer 269
SEKV. ID. Č. 32:	primer 283
SEKV. ID. Č. 33:	primer 284
SEKV. ID. Č. 34:	integrační úsek RF-BN1
SEKV. ID. Č. 35:	primer 57
SEKV. ID. Č. 36:	sekvence obsahující 5' sousedící úsek MS-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky
SEKV. ID. Č. 37:	primer 68
SEKV. ID. Č. 38:	sekvence obsahující 3' sousedící úsek MS-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky
SEKV. ID. Č. 39:	sekvence obsahující 5' sousedící úsek RF-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky
SEKV. ID. Č. 40:	sekvence obsahující 3' sousedící úsek RF-BN1 v ozimé řepky olejky
SEKV. ID. Č. 41:	primer 268 (BNA04)
SEKV. ID. Č. 42:	primer BNA05
SEKV. ID. Č. 43:	primer BNA06

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Transformace rostlin *Brassica napus* genem samčí sterility a genem obnovitele fertility

a) konstrukce chimérické DNA obsahující gen barnázy pod kontrolou promotoru specifického pro tapetum (pTHW107).

Plazmid pTHW107 (SEKV. ID. Č. 1) byl v podstatě získán z intermediárního vektoru pGSV1. pGSV1 je sám odvozen z pGSC

1700 (Cornelissen a Vandewielle, 1989), ale obsahuje umělý T-úsek, který tvoří levá a pravá hraniční sekvence TL-DNA formy pTiB6S3 a multilinker klonovacích míst umožňující inzerci chimérického genu mezi T-DNA hraniční repetice. Vektor PGSV1 je poskytnut s genem barstar v hlavním čtecím rámci plazmidu, s regulačními signály pro expresi v *E. coli*.

Úplný popis DNA obsažené mezi hraničními repeticemi v pTHW107 je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: T-DNA plazmidu pTHW107

nt polohy	Orientace	Popis a odkazy
1-25		Repetice pravé hranice z TL-DNA z pTiB6S3 (Gielen et al (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).
26-97		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
309-98	Proti směru	3' netranslatovaný konec z TL-DNA genu 7 (3'g7) z pTiB6S3 (Velten a Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998, Dhaese et al. (1983) The EMBO Journal 3: 835-846).
310-330		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru

882-331	Proti směru	Kódující sekvence genu <i>bar</i> ze <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). Dva N-koncové kodony kódujícího úseku <i>bar</i> divokého typu byly substituovány kodony ATG a GAC, v daném pořadí.
2608-883	Proti směru	Promotor genu malé podjednotky ribulóza-1,5-bifosfátkarboxylázy <i>at51A</i> z <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbers et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759).
2609-2658		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
2919-2659	Proti směru	260 bp <i>TaqI</i> fragment z 3' netranslatovaného konce genu nopalinsyntázy (3'nos) z T-DNA pTiT37 a obsahující rostlinný polyadenylační signál (Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573).
2920-3031		3'netranslatovaný úsek po směru (downstream) od kódující sekvence barnázy z <i>B. Amyloliquefaciens</i>
3367-3032	Proti směru	Kódující úsek genu barnázy z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202:913-915).

4877-3368	Proti směru	Promotorový úsek anther-specifického (prašnikově specifického) genu TA29 z <i>Nicotiana tabacum</i> . Promotor obsahuje 1,5 kb sekvenci v protisměru (upstream) od ATG iniciačního kodonu (Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403).
4878-4921		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
4922-4946		Repetice levé hranice z TL-DNA z pTiB6S3 (Gielen et al (1984) EMBO Journal 3: 835-846).

b) Konstrukce chimérické DNA obsahující gen barstar pod kontrolou konstitutivního promotoru (pTHW118)

Plazmid pTHW118 (SEKV. ID. Č. 2) byl také v podstatě odvozen z intermediárního vektoru pGSV 1 (popsán výše). Kompletní popis DNA obsažené mezi hraničními repeticemi v pTHW118 je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: T-DNA plazmidu pTHW118

nt polohy	Orientace	Popis a odkazy
1-25		Repetice pravé hranice z TL-DNA z pTiB6S3 (Gielen et al (1984) The EMBO Journal 3: 835-846).
26-53		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru

54-90		Reziduální sekvence z TL-DNA v repetici pravé hranice.
91-97		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
309-98	Proti směru	3' netranslatovaný konec z TL-DNA genu 7 (3'g7) z pTiB6S3 (Velten a Schell. (1985) Nucleic Acids Research 13: 6981-6998, Dhaese et al. (1983) The EMBO Journal 3: 835-846).
310-330		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
883-331	Proti směru	Kódující sekvence genu rezistence k bialafosu (<i>bar</i>) ze <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (Thompson et al. (1987) The EMBO Journal 6: 2519-2523). Dva kodony N-konce kódujícího úseku <i>bar</i> divokého typu byly nahrazeny kodony ATG a GAC, v daném pořadí.
2608-883	Proti směru	Promotor genu malé podjednotky ribulóza-1,5-bifosfátkarboxylázy <i>atS1A</i> z <i>Arabidopsis thaliana</i> (PssuAra) (Krebbes et al. (1988) Plant Molecular Biology 11: 745-759).
2609-2658		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru

2919-2659	Proti směru	260 bp TaqI fragment z 3' netranslatovaného konce genu nopalinsyntázy (3'nos) z T-DNA pTiT37 a obsahující rostlinný polyadenylační signál (Depicker et al. (1982) Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573).
2920-2940		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
2941-2980		3'netranslatovaný úsek po směru (downstream) od <i>barstar</i> kódující sekvence z <i>Bacillus amyloliguefaciens</i>
3253-2981	Proti směru	Kódující úsek genu <i>barstar</i> z <i>Bacillus amyloliguefaciens</i> (Hartley (1988) Journal of Molecular Biology 202:913-915).
4762-3254	Proti směru	Promotorový úsek anther-specifického (prašníkově specifického) genu TA29 z <i>Nicotiana tabacum</i> . Promotor obsahuje 1,5 kb sekvenci v protisměru (upstream) od ATG iniciačního kodonu (Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Research 18: 3403).
4763-4807		Sekvence odvozená ze syntetického polylinkeru
4808-4832		Repetice levé hranice z TL-DNA z pTiB6S3 (Gielen et al (1984) EMBO Journal 3: 835-846).

c) Transformace rostlin *Brassica napus*

Pro transformaci rostlin *Brassica napus* byl užit vektorový systém, který byl popsán v Deblaere et al. (1985, 1987). Vektorový systém sestává z kmene *Agrobacterium* a dvou plazmidových složek: 1) non-onkogenní Ti-plazmid (pGV400) a 2) intermediární klonovací vektor založený na plazmidu pGSV 1. Non-onkogenní Ti-plazmid z něhož byla odstraněna T-oblast nese geny vir nezbytné pro přenos umělé T-DNA klonované do druhého plazmidu do rostlinného genomu. Kmeny *Agrobacteria* vzniklé triparentální konjugací mezi uvedenými složkami pak mohou být použity pro transformaci rostlin.

Selekce byla prováděna na fosfinotricinu (PPT) ve všech stádiích, s výjimkou regenerace rostlinek, která probíhala bez přítomnosti PPT, aby se urychlil růst. Tak byl připraven soubor primárních transformant (rostliny generace T₀).

Příklad 2

Vývoj genetických událostí

2.1. Charakterizace transgenní události

2.1.1. Analýza MS události metodou Southern blot

Přítomnost transgenu a počet genových inzercí byly kontrolovány standardní metodou analýzy Southern blot. Celková genomová DNA byla izolována z 1 g pletiva nadzemních částí rostlin podle Dellaporta (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol,3, p,19-21 nebo Doyle et al. 1987, Phytochem. Bull. 19:11) a štěpena restriční enzymem SacI. SacI má unikátní restriční místo v T-DNA fragmentu, ležící mezi

konstrukty s geny barnázy a bar. Southern analýza byla prováděna s následujícími dvěma sondami:

Sonda "barnáza": 478 bp PstI-EcoRI fragment plazmidu pVE113

Sonda "bar": 546 bp NcoI-BgIII fragment plazmidu pDE110

Plazmidy pVE113 a pDE110 jsou popsány na obrázku 1 a v dokumentu WO 92/09696, v uvedeném pořadí. Hybridizace MS událostí se sondou „barnáza“ poskytla 12 Kb pás, zatímco hybridizace se sondou „bar“ poskytla 14 Kb fragment. Relativní intenzita pásů poskytla indikaci toho, zda rostliny byly homozygotní nebo hemizygotní pro transgenní lokus. U obou událostí byla zjištěna jednoduchá inserce. To bylo potvrzeno skutečností, že segregáční profil transgenů mohl být vysvětlen na principu mendelovské dědičnosti jednoho lokusu.

2.1.2. Analýza RF události metodou Southern blot

Přítomnost transgenů a počet genových inzercí byly kontrolovány standardní metodou analýzy Southern blot. Celková genomová DNA byla izolována z 1 g pletiva nadzemních částí rostlin podle Dellaporta (1983, Plant Molecular Biology Reporter, 1, vol.3, p.19-21 nebo Doyle et al. 1987, Phytochem. Bull. 19:11) a štěpena restrikcí enzymem SacI. SacI má unikátní restrikcí místo v T-DNA fragmentu, ležící mezi konstrukty s geny barnázy a bar. Southern analýza byla prováděna s následujícími dvěma sondami:

Sonda "barnáza": 436 bp HindIII-PstI fragment plazmidu pVE113

Sonda "bar": 546 bp NcoI-BgIII fragment plazmidu pDE110

Hybridizace MS událostí se sondou „barnáza“ poskytla 3 Kb pás, zatímco hybridizace se sondou bar poskytla 14 Kb fragment. Relativní intenzita pásů poskytla indikaci toho, zda rostliny byly homozygotní nebo hemizygotní pro transgenní lokus. U několika událostí byla zjištěna jednoduchá inserce.

To bylo potvrzeno skutečností, že segregační profil transgenu mohl být vysvětlen na principu mendelovské dědičnosti jednoho lokusu.

2.1.3. Obecný fenotyp a agronomická výkonnost rostlin

Rostliny T_1 generace u obou událostí MS a RF byly vyhodnoceny na řadu fenotypových znaků, jako je např. výška rostliny, síla/pevnost stonku, tendence k poléhání, zimuvzdornost, odolnost k rozpraskávání, tolerance k suchu, a rezistence k nemocem (černá hniloba, skvrnitost listů, Sclerotinia), produkce semen a výnos.

Linie byly hodnoceny jako podobné (nebo zlepšené) v uvedených agronomických charakteristikách ve srovnání s netransformovanou odrůdou a také s řadou kultivarů řepky olejky. V některých případech rostliny segregovaly z důvodu somaklonální variace pro jeden nebo více z výše uvedených znaků. Pokud to nevedlo k vnesení komerčně zajímavého fenotypového znaku, takové rostliny byly odstraněny.

2.2. vývoj linií nesoucích znaky MS nebo RF

Různé hemizygotní rostlinky T_0 generace ("Ms/-" nebo "Rf/") byly přeneseny z pletivoových kultur do půdy ve skleníku. Přítomnost transgenu a počet genových kopií byly kontrolovány Southern blot analýzou, jak bylo popsáno výše. Rostliny byly ponechány do květu, a pak byla vyhodnocena sterilita nebo fertilita květů. Rostliny T_0 generace byly kříženy s rostlinami divokého typu rostliny (-/-) pro vytvoření T_1 semen (Ms T_1 a Rf T_1). T_1 semena byla vyseta a dále pěstována ve skleníku. Rostliny byly pak hodnoceny na toleranci ke glufosinátu amonnému. Ms- T_1 rostliny byly také hodnoceny na segregaci sterility/fertility (u nepostříkaných

rostlin), zatímco Rf-T1 rostliny byly kontrolovány na fertilitu květů.

Ms-T1 rostliny obsahující transgen byly kříženy s testovacími rostlinami homozygotními pro gen obnovující fertilitu (Rf/Rf), pro produkci MsRf-F1 semen. Tato semena (Ms/-, Rf/- a -/-, Rf/-) byla vyseta ve skleníku a ošetřena postřikem LibertyTM. Zbylé F1 potomstvo bylo vyhodnoceno na segregaci fertility/sterility pro ověření toho, zda znak samčí sterility může být adekvátně obnoven u *Brassica napus* (fertilita blížká 100 %).

Nejlepší události byly vybrány pro další testování. Ms-T1 rostliny byly kříženy s homozygotním obnovitelem fertility a semena byla vyseta na poli. Rostliny pak byly hodnoceny na toleranci k herbicidu LibertyTM (800 gramů účinné složky na hektar (g.a.i./ha), přičemž doporučená dávka pro rolníky je 400 g.a.i./ha), segregaci fertility/sterility a na obecné fenotypové vlastnosti. Linie, u kterých došlo ke 100% obnovení fertility a u kterých nebyly pozorovány žádné negativní změny ve fenotypu nebo agronomické výkonnosti (podrobně viz (d)) ve srovnání s isogenní kontrolou divokého typu, byly selektovány.

Rf-T1 rostliny obsahující transgen byly kříženy s testovacími rostlinami obsahujícími gen samčí sterility (Ms/-) pro produkci F1 semen. Tato semena byla pěstována ve skleníku, postřikána herbicidem LibertyTM a pak byla vyhodnocena obnova fertility (blízko ke 100 %).

Mezitím byl Rf-T1 rostliny samosprášeny pro získání generace S1. S1 rostliny byly pěstovány ve skleníku, ošetřeny postřikem herbicidu LibertyTM a opět samosprášeny pro vytvoření generace S2, z S2 pak byly vybrány homozygotní rostliny.

2.3. Kombinace událostí MS a RF.

Vybrané Ms-T1 rostliny byly kříženy s vybranými Rf-S₂ událostmi ve skleníku pro otestování obnovy fertility. Semena byla vyseta ve skleníku, na rostliny byl aplikován postřik LibertyTM a byla kontrolována fertilita květů.

2.4. Testování MS a RF události v odlišném genetickém základu a v odlišný lokalizaci

Vybrané události byly vneseny do dvou odlišných genetických základů, které jsou heteroticky odlišné, k prokázání toho, že MS a RF události jsou plně funkční a neměly žádné negativní účinky na výnos nebo kvalitu u žádného z testovaných základů.

Současně byly vybrané MS a RF události testovány ve čtyřech až pěti odlišných prostředích ke zjištění toho, zda není negativní interakce mezi prostředím a MS nebo RF událostí.

V dalším stádiu byla produkce hybridních semen s použitím vybraných MS a RF událostí testována extenzivněji v polních podmínkách. Vybraná MS událost ve svém původním genetickém základu a ve dvou odlišných a heteroticky odlišných základech byly kříženy s vybranou RF událostí, také ve svém původním genetickém základu a ve dvou odlišných a heteroticky odlišných základech. F1 hybridy byly hodnoceny na rezistenci k herbicidu LibertyTM, fertilitu a také celkovou agronomickou výkonnost (výnos a kvalita).

2.5. Selektce elitní události

Výše popsany postup selektce při vývoji transgenních MS linií poskytl několik elitních událostí, které vykazovaly

optimální expresi transgenu, tj. rezistenci ke glufosinátu amonnému, fenotyp samčí sterility a schopnost kompletní obnovy fertility s homozygotní obnovitelskou linií, konkrétně s vybranou RF elitní událostí.

Výše popsaný selekční postup při vývoji transgenních RF linií poskytl několik elitních událostí, které vykazovaly optimální expresi transgenu, tj. rezistenci ke glufosinátu amonnému, a schopnost obnovy fertility F1, když se kříží s rostlinou nesoucí gen samčí sterility, konkrétně s vybranou MS elitní událostí.

Příklad 3

Vnesení vybraných kandidátních elitních událostí do rostlin ozimé řepky olejky

Několik MS a RF elitních událostí, které byly vyvinuty u rostlin *B. napus*, jak bylo popsáno výše, bylo vneseno do kultivaru ozimé řepky olejky opakovaným zpětným křížením rostlin odrůdy Drakkar.

Rostliny byly vyšetřeny a bylo zjištěno následující:

- a) Přítomnost cizorodé DNA nijak nepoškozuje další požadované charakteristiky rostlin, jako jsou například vlastnosti související s agronomickou výkonností nebo komerční hodnotou,
- b) událost byla charakterizována dobře definovanou molekulární konfigurací, která byla trvale děděna,
- c) požadované geny v cizorodé DNA vykazují správnou, vhodnou a trvalou prostorovou i časovou fenotypovou expresi, jak v heterozygotním (nebo hemizygotním) tak i homozygotním výskytu události, v komerčně přijatelném stupni a v rozsahu

environmentálních podmínek, kterým rostliny nesoucí událost budou pravděpodobně vystaveny při jejich normálním agronomickém použití.

Dále, rostliny byly vyhodnoceny na jejich agronomicky významné vlastnosti a výkonnost ve srovnání s divokým typem ozimé řepky olejky.

Extenzivní testování v polních podmínkách ukázalo, že určité kandidátní elitní události u jarní řepky olejky, když byly přeneseny na ozimé řepky olejky, vedly ke vzniku rostlin, které vykazovaly adekvátní expresi požadovaných genů v cizorodé DNA ve spojení s optimální agronomickou výkonností. Tyto události byly vybrány jako MS a RF elitní události u ozimé řepky olejky a byly nazvány MS-BN1 a RF-BN1, v uvedeném pořadí.

Příklad 4

Charakterizace elitních událostí MS-BN1 a RF-BN1

Jakmile byly jednou události MS-BN1 a RF-BN1 identifikovány jako elitní události, kdy exprese požadovaných transgenů a také celková agronomická výkonnost byly optimální, lokusy transgenů byly analyzovány podrobněji na molekulární úrovni. To zahrnovalo detailní analýzu metodou Southern blot (s použitím vícečetné sady restričních enzymů) a sekvencování úseků sousedících s transgenem.

4.1. Southern blot analýza s použitím více restričních enzymů

Pletivo listů bylo odebráno z transgenních a kontrolních rostlin. Celková genomová DNA byla izolována z pletiva listů metodou podle Dellaporta et al. (1983, Plant Molecular Biology

Reporter, 1, vol. 3, p,19-21). DNA koncentrace každého preparátu pak byla určena měřením optické denzity na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm.

10 μg genomové DNA bylo štěpeno restriční enzymem v reakci o celkovém objemu 40 μl , a sice v podmínkách podle doporučení výrobce enzymu. Doba štěpení a/nebo množství restričního enzymy byly upraveny tak, aby bylo zajištěno úplné štěpení vzorků genomové DNA bez nespecifické degradace. Po štěpení bylo k naštěpené DNA přidáno 4 μl nanášecího barviva a vzorky byly naneseny na 1% agarózový gel.

Následující kontrolní DNA byly také naneseny na gel:

- negativní kontrola s genomovou DNA připravenou z netransgenní rostlin *Brassica*. Tato negativní kontrola je použita k potvrzení absence pozadí hybridizace.
- DNA pozitivní kontrola: s heterozygotní integrací jedné kopie transgenů do genomu *Brassica napus*, 10 μg genomové DNA má stejný počet molekul jako přibližně 19 pg DNA 1501 bp PvuI-HindIII fragmentu pTHW118 (velikost diploidního genomu *Brassica napus*: $0,8 \times 10^9$ bp). Množství představující jednu kopii plazmidu na celý genom bylo přidáno k 1 μg naštěpené DNA z netransgenní *Brassica napus*. Takto rekonstituovaný vzorek byl použit k ukázení toho, že hybridizace jsou prováděny v podmínkách umožňujících hybridizaci sondy s cílovou sekvencí.

DNA fága Lambda (kmen CIind 1 ts 857 Sam 7, Life Technologies) štěpený PstI byl zahrnut jako velikostní standard.

Po elektroforéze byly DNA vzorky (štěpená genomová DNA *Brassica*, kontroly a DNA sloužící jako velikostní standard) byly přeneseny na nylonovou membránu pomocí kapilárního

blottingu trvajícího 12 až 16 hodin.

DNA templáty použité pro přípravu sond pro MS-BN1 událost byly připraveny restričním štěpením PTW107 enzymem HindIII. Tak byl vyštěpen 3942 bp DNA fragment, který obsahoval relevantní část transformující DNA (část PSSUARA, 3'nos, barnáza, PTA29).

DNA templáty použité pro přípravu sondy pro RF-BN1 události byly připraveny restričním štěpením PTW118 enzymem HpaI. Tak byl vyštěpen 2182 bp DNA fragment, který obsahoval relevantní části transformující DNA (část PSSUARA, 3'nos, barstar, PTA29).

Po purifikaci byly DNA fragmenty značeny standardním postupem a byly použity k hybridizaci na membráně.

Hybridizace byla prováděna v podmínkách standardní stringence: značená sonda byla denaturována zahříváním po dobu 5 až 10 minut ve vodní lázni na teplotu 95 °C až 100 °C a pak ochlazením na ledu po dobu 5 až 10 minut, a po té byla přidána k hybridizačnímu roztoku (6 X SSC (20 X SSC je 3,0 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7,0), 5 X Denhardtovo činidlo (100 X Denhardt = 2% Ficoll, 2% polyvinylpyrolidon, 2% bovinní sérový albumin), 0,5% SDS a 20 µg/ml denaturované nosičové DNA (jednořetězcová DNA z rybího spermatu, s průměrnou délkou 120 až 3000 nukleotidů). Hybridizace byly prováděny přes noc v 65 °C. Bloty byly promývány třikrát po dobu 20 až 40 minut v 65 °C, promývacím roztokem (2 X SSC, 0,1 SDS).

Autoradiografy byly elektronicky skenovány.

4.1.1. MS-BN1

Restriční profil získaný po štěpení MS-BN1 genomové DNA s různými restričními enzymy je uveden na obrázku 2 a přehledně

shrnut v tabulce 3.

Tabulka 3: Restrikční mapa MS-BN1

Číslo dráhy	Nanesená DNA	Migrace hybridizujících DNA fragmentů mezi pásy velikostního standardu		Určená délka hybridizujících DNA fragmentů
		Větší než	Menší než	
1	MS-BN1 - EcoRI	2140 14057	2450 -	2266 bp (*) >14 kbp
2	MS-BN1 - EcoRV	1159 14057	1700 -	1,4 kbp (*) >14 kbp
4	MS-BN1 - HpaI	1986 2140	2140 2450	1990 bp 2229 bp
5	MS-BN1 - AflIII	2450 2140 514	2838 2450 805	2477 bp (*) 2250 bp 552 bp (*)
6	MS-BN1 - NdeI	5077 5077	14057 14057	10 kbp 6510 bp
7	Netransgenní ozimé řepky olejky	-	-	-
8	Kontrolní plazmidová DNA - BamHI	1700 2450	1986 2838	1966 bp (*) 2607 bp (*)

(*) délky těchto fragmentů byly predikovány na základě restrikční mapy plazmidu pTHW107

4.1.2. RF-BN1

Restrikční profil získaný po štěpení RF-BN1 genomové DNA

s různými restričními enzymy je uveden na obrázku 3 a přehledně shrnut v tabulce 4.

Tabulka 4: Restriční mapa RF-BN1

Číslo dráhy	Nanesená DNA	Migrace hybridizujících DNA fragmentů mezi pásy velikostního standardu		Určená délka DNA fragmentů
		Větší než	Menší než	
1	MS-BN1 - BamHI	805	1099	814 bp
		1700	1986	1849 bp (*)
		2450	2838	2607 bp (*)
		5077	14057	6580 bp
2	MS-BN1 - EcoRI	805	1159	1094 bp
		1986	2450	2149 bp
		5077	14057	7000 bp
		5077	14057	10 kbp
3	MS-BN1 - EcoRV	5077	14057	5,4 kbp
		5077	14057	8 kbp
4	MS-BN1 -HindIII	1700	2140	1969 bp
		2450	2838	2565 bp
		2450	2838	2635 bp
6	Netransgenní ozimé řepky olejky	-	-	-
5	Kontrolní plazmid DNA - BamHI	1700	1986	1849 bp (*)
		2450	2838	2607 bp (*)
		5077	14057	8100 bp

(*) délky těchto fragmentů byly predikovány na základě restriční mapy plazmidu pTHW107

4.2. Identifikace sousedící úseky

Sousedící úseky elitní události MS-BN1 a RF-BN1 byly nejdříve identifikovány pro jarní řepky olejky, ve kterých události byly vyvinuty, a pak kontrolovány u ozimé řepky olejky.

4.2.1. Identifikace úseků sousedících s MS-BN1

4.2.1.1. Pravý (5') sousedící úsek

Pro stanovení sekvence sousedícího úseku MS-BN1 na pravé hranici byla užita ligací-zprostředkovaná polymerázová řetězová reakce (Mueller et al. 1989, Science 780-786, Marinetti et al., 1994, PCR Methods and Applications, 71-75) s extenzním záchytem („extension capture“) (Tormanen et al., 1993, NAR 20:5487-5488).

Oligonukleotidy použité pro přípravu linkeru byly následující:

MDB248: (SEKV. ID. Č. 3)

5'CAT.GCC.CTG.ACC.CAG.GCT.AAG.TAT.TTT.AAC.TTT.AAC.CAC.TTT.
GCT.CCG.ACA.GTC.CCA.TTG

MDB249: (SEKV. ID. Č. 4)

5'CAA.TGG.GAC.TGT.CGG.AGG.ACT.GAG.GGC.CAA.AGC.TTG.GCT.CTT.AGC.
CTG.GGT.CAG.GGC.ATG

Po přípravě linkeru následovala syntéza prvního řetězce z genomové MS-BN1 DNA štěpené NcoI, s použitím biotinylovaného genově specifického primeru:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW107
Biotinylovaný primer MDB247	CCG.TCA.CCG.AGA.TCT.GAT.CTC.ACG.CG (SEKV. ID. Č. 5)	322 ← 347

Linker pak byl ligován k prvnímu řetězci DNA, který pak byl kondenzován k magnetickým perličkám, ze kterých byl nebiotinylovaný řetězec eluován. Tato DNA byla použita pro PCR amplifikaci ve větším měřítku s použitím následujících primerů:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW107
Linkerový primer MDB250	GCACTGAGGGCCAAAGCTTGGCTC (SEKV. ID. Č. 6)	- - - - -
T-DNA primer MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.AGC.TAG.C (SEKV. ID. Č. 7)	293 ← 317

Tato PCR poskytla fragment přibližně 1150 bp. Tento fragment pravé hranice (RB) byl eluován z agarózového gelu a na 100násobně zředěné této DNA byla provedena sdružená („nested“) PCR s použitím následujících primerů:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW107
„Nested“ linkerový primer MDB254	CTTAGCCTGGGTCAGGGCATG (SEKV. ID. Č. 8)	- - - - -
T-DNA primer MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.TG (SEKV. ID. Č. 9)	224 ← 243

Tato reakce poskytla fragment velikosti přibližně 1000 bp,

který byl eluován z agarózového gelu, purifikován a ligován do vektoru pGem®-T. Rekombinantní plazmidová DNA byla podrobena screeningu s použitím standardní PCR reakce s následujícími primery:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW107
SP6 primer	TAA.TAC.GAC.TCA.CTA.TAG.GGC.GA (SEKV. ID. Č. 10)	- (SP6 promotor ve vektoru pGem®-T)
T7 primer	TTT.AGG.TGA.CAC.TAT.AGA.ATA.C (SEKV. ID. Č. 11)	- (T7 promotor ve vektoru pGem®-T)
T-DNA primer MDB201	gCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GAC (SEKV. ID. Č. 12)	143 ← 163

Tak vznikly následující fragmenty:

SP6-T7: 1224 bp

SP6-MDB201: 1068 bp

T7-MDB201: 1044 bp

Fragment pravé hranice byl purifikován a sekvencován (SEKV. ID. Č. 13), což poskytlo výsledný 963 bp fragment, v němž polohy 1 až 867 odpovídají rostlinné DNA a úsek bp 868 až 953 odpovídá T-DNA z pTW 107.

4.2.1.2. Levý (3') sousedící úsek s MS-BN1

Sekvence úseku levé hranice sousedícího s vloženým transgenem v MS-BN1 události byly určeny s použitím metody TAIL-PCR („thermal asymmetric interlaced PCR“), který popsali Liu et al. (1995, Plant Journal 8(3): 457-463). Tento způsob užívá tři sdružené („nested“) specifické primery v následných

reakcích společně s kratším arbitrárně degenerovaným (AD) primerem, takže relativní účinnosti amplifikace specifického a nespecifického produktu mohou být teplotně kontrolovány. Specifické primery byly vybrány pro nasednutí („annealing“) k hranici transgenu a na základě jejich podmínek pro nasednutí. Malé množství (5 μ l) nepurifikovaných sekundárních a terciárních PCR produktů bylo analyzováno na 1% agarózovém gelu. Terciární PCR produkt byl použit pro preparativní amplifikaci, purifikován a sekvencován na automatickém sekvencovacím zařízení s použitím soupravy pro cyklovací sekvencování DyeDeoxy Terminator.

Následující primery byly použity:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW107
Degenerovaný primer MDB611	NgT.CgA.SWg.TNT.WCA.A (SEKV. ID. Č. 14)	- - - - -
Primární TAIL MDB259	gTg.Cag.ggA.AgC.ggT.TAA.CTg.g (SEKV. ID. Č. 15)	7164 → 4186
Sekundární TAIL MDB260	CCT.TTg.gAg.TAA.ATg.gTg.TTg.g (SEKV. ID. Č. 16)	4346 → 4366
Terciární TAIL HCA24	gCg.AAT.gTA.TAT.TAT.ATg.CA (SEKV. ID. Č. 17)	4738 → 4757

Kde: N=A,C,T nebo g, S=C nebo g, W=A nebo T

Fragment amplifikovaný s použitím HCA24-MDB611 byl přibližně dlouhý 540 bp, z nichž bylo 537 bp sekvencováno (3' sousedící: SEKV. ID. Č. 18). Sekvence mezi 1 a 180 bp obsahovala pTHW107 DNA, zatímco sekvence mezi 181 a 537 bp odpovídala rostlinné DNA.

4.2.1.3. Identifikace delece cílového místa

Užitím primerů odpovídajících sekvencím v sousedících úsecích transgenu bylo na DNA divokého typu z rostliny *Brassica napus* var. Drakkar jako templátu identifikováno inzerční místo transgenu.

Následující primery byly použity:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v 5' sousedícím úseku	Poloha v 3' sousedícím úseku
		(SEKV. ID. Č. 13)	(SEKV. ID. Č. 18)
VDS51	TgA.CAC.TTT.gAg.CCA.CTC.g (SEKV. ID. Č. 19)	733 → 751	- - - - -
HCA48	GgA.ggg.TgT.TTT.Tgg.TTA.TC (SEKV. ID. Č. 20)	- - - - -	189 ← 208

Tím byl připraven 178 bp fragment (SEKV. ID. Č. 21), ve kterém úsek 132 až 150 bp odpovídá deleci cílového místa.

4.2.1.4. Identifikace MS-BN1 inzerčního úseku

Na základě identifikace sousedících úseků a delece cílového místa mohl být určen inzerční úsek MS-BN1 (SEKV. ID. Č. 22):

1- 822: 5' sousedící úsek bp 46-867 ze SEKV. ID. Č. 13
 823- 841: delece cílového místa bp 132-150 SEKV. ID. Č. 21
 842-1198: 3' sousedící úsek bp 181-537 SEKV. ID. Č. 18

4.2.2. Identifikace sousedících úseků RF-BN1

Hraniční sousedící úseky RF-BN1 byly určeny pomocí „Vectorette-PCR“ (použití „Vectorette“ a „Subvectorette PCR“ pro izolaci DNA sousedící s transgenem - viz Maxine J. Allen, Andrew Collick a Alec J. Jeffreys, PCR Methods and Applications - 1994 (4) pages 71-75) s RF-BN1 genomovou DNA štěpenou HindIII jako templátem. „Vectorette“ linker byl vytvořen s použitím primerů MDB248 (SEKV. ID. Č. 3) a MDB249 (SEKV. ID. Č. 4) popsány výše.

4.2.2.1. Pravý (5') sousedící úsek BN-RF1

Následující primery byly použity:

	Sekvence (5'→3')	Poloha v PTHW118
Vectorette primer MDB250	GCA.CTG.AGG.GCC.AAA.GCT.TGG.CTC (SEKV. ID. Č. 6)	-----
Vectorette primer MDB254	CTT.AGC.CTG.GGT.CAG.GGC.ATG (SEKV. ID. Č. 8)	-----
T-DNA primer MDB251	GGA.TCC.CCC.GAT.GAG.CTA.AGC.TAG.C (SEKV. ID. Č. 7)	293 ← 317
T-DNA primer MDB193	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC (SEKV. ID. Č. 23)	226 ← 243
T-DNA primer MDB258	CTA.CGG.CAA.TGT.ACC.AGC.TG (SEKV. ID. Č. 9)	224 ← 243
T-DNA primer MDB201	GCT.TGG.ACT.ATA.ATA.CCT.GAC (SEKV. ID. Č. 12)	143 ← 163

Tím byl získán 1077 bp fragment (SEKV. ID. Č. 24), ve kterém úsek 1-881 bp odpovídá rostlinné DNA a úsek 882-1077 bp

odpovídá T-DNA z pTW 118.

4.2.2.2. Levý (3') sousedící úsek BN-RF1

Pro identifikaci 3' sousedícího úseku elitní událost BN-RF1, TAIL-PCR byla provedena jak bylo popsáno výše s použitím arbitrárně degenerovaného primeru a primerů lokalizovaných v T-DNA v blízkosti levé hranice.

Byly použity následující primery:

Arbitrárně degenerovaný primer:

MDB286 NTg.CgA.SWg.ANA.WgA.A (SEKV. ID. Č. 25)

Kde: N=A,C,T nebo g, S=C nebo g, W=A nebo T

T-DNA primery:

MDB314 gTA.ggA.ggT.Tgg.gAA.gAC.C (SEKV. ID. Č. 26)

MDB31S ggg.CTT.TCT.ACT.AgA.AAg.CTC.TCg.g (SEKV. ID. Č. 27)

MDB316 CCg.ATA.ggg.AAg.TgA.TgT.Agg.Agg (SEKV. ID. Č. 28)

Byl získán fragment velikosti přibližně 2000 bp. Tento fragment byl klonován do vektoru pGem[®]-T vektor a použit jako templát pro další PCR reakci s použitím následující primerů:

Primer pro rostlinnou DNA:

MDB288 ATg.CAg.CAA.gAA.gCT.Tgg.Agg (SEKV. ID. Č. 29)

T-DNA primer:

MDB314 gTA.ggA.ggT.Tgg.gAA.gAC.C (SEKV. ID. Č. 26)

Takto byl získán fragment velikosti přibližně 1500 bp (SEKV. ID. Č. 30), kde úsek 1-166 bp odpovídá T-DNA z plazmidu pTW118 a úsek 167-1441 bp odpovídá rostlinné DNA.

4.2.2.3. Molekulární analýza delece cílového místa

Úsek obsahující delecí cílového místa byl klonován pomocí TAIL-PCR (popsána výše) s použitím genomové DNA divokého typu a primerů specifických pro rostlinou DNA v protisměru (upstream) od T-DNA inzertu směrem k inzertu:

Arbitrárně degenerovaný primer:

MDB286 NTg.CgA.SWg.ANA.WgA.A (SEKV. ID. Č. 25)

kde: N=A,C,T nebo g, S=C nebo g, W=A nebo T

Primery pro rostlinou DNA:

MDB269 ggTTTTTCggAggTCCgAgACg (SEKV. ID. Č. 31)

MDB283 CTTggACCCCTAggTAAATgC (SEKV. ID. Č. 32)

MDB284 gTACAAAACCTTggACCCCTAgg (SEKV. ID. Č. 33)

Byl získán fragment velikosti 1068 bp (SEKV. ID. Č. 34), ve kterém je:

53-83: 5'sousedící úsek

84-133: delece cílového místa

134-1055: 3'sousedící úsek

Po inzerci T-DNA bylo cílové místo velikosti 51 bp deletováno. Srovnáním sekvence lokusu divokého typu s lokusem Rf3 odhalilo přítomnost „výplňového“ úseku DNA ve spojovacím místě pravé hranici. „výplňová“ sekvence TCTCG sekvence v pravé hranici sousedí se sekvencí TCA na 5' konci a sekvencí CGA na 3' konci. Tyto triplety byly také nalezeny na předělu delece cílového místa a T-DNA. Vyhledávání ve vzdálenějších rostlinných sekvencích odhalilo možný původ této „výplňové“ DNA. Sekvence TCA.TCTCG.CGA je také lokalizována v rostlinné DNA na 3'konci delece cílového místa. Je to „jádrová“ sekvence dvou identických repetitív velikosti 13 bp lokalizovaná 209 bp po směru (downstream) od předělu delece cílového místa.

Inzerční úsek pro RF-BN1 může být definován jako úsek obsahující levý sousedící úsek, deleci cílového místa a pravý sousedící úsek, a sice následovně:

- 1-881: 5' sousedící úsek (bp 1-881 SEKV. ID. Č. 24)
882-932: delece cílového místa (bp 84-133 SEKV. ID. Č. 34)
933-2207: 3' sousedící úsek (bp 167-1441 SEKV. ID. Č. 30)

4 3. Genetická analýza lokusu

Genetická stabilita inzertů pro dvě události byla ověřována molekulární a fenotypovou analýzou v potomstvu rostlin po několika generacích.

Analýzy metodou Southern blot rostlin generací T_0 , T_1 a T_2 byly srovnány pro obě události MS-BN1 a RF-BN1. Bylo zjištěno, že získané profily byly identické pro každou z událostí v odlišných generacích. To dokazuje, že molekulární konfigurace transgenů v rostlinách obsahujících jak MS-BN1 tak i RF-BN1 je stabilní.

MS-BN1 a RF-BN1 události vykazují pro své odpovídající transgeny mendelovskou segregaci jako jediný genetický lokus v alespoň třech následných generacích, což ukazuje na to, že inzerty jsou stabilní.

Na základě výše popsaných výsledků byly MS-BN1 a MS-RF1 identifikovány jako elitní události.

4.4. Identifikace sousedících sekvencí událostí MS-BN1 a RF-BN1 u ozimé řepky olejky

Sousedící sekvence elitní události MS-BN1 a RF-BN1 u ozimé řepky olejky byly určeny s použitím primerů, které byly vyvinuty na základě sousedících sekvencí dané události u jarní

řepky olejky.

Pravá (5') sousedící sekvence MS-BN1 ozimé řepky olejky byla určena s použitím T-DNA primeru (SEKV. ID. Č. 12) a primeru lokalizovaného v MS-BN1 pravé hraniční rostlinné DNA:

VDS57: 5'-gCA.TgA.TCT.gCT.Cgg.gAT.ggC-3' (SEKV. ID. Č. 35)

To poskytlo fragment velikosti 909 bp (SEKV. ID. Č. 36) se sekvencí v podstatě podobnou sekvenci SEKV. ID. Č. 13 (počínajíc nukleotidem 98).

Levá (3') sousedící sekvence MS-BN1 ozimé řepky olejky byla určena s použitím T-DNA primeru (SEKV. ID. Č. 17) a primeru lokalizovaného v MS-BN1 levé hraniční rostlinné DNA:

HCA68: 5'-CCA.TAT.AcG.CCA.gAg.Agg.AC-3' (SEKV. ID. Č. 37)

To poskytlo fragment 522 bp (SEKV. ID. Č. 38) se sekvencí v podstatě podobnou sekvenci SEKV. ID. Č. 18.

Pravá (5') sousedící sekvence RF-BN1 ozimé řepky olejky byla určena s použitím T-DNA primeru (SEKV. ID. Č. 12) a primeru lokalizovaného v RF-BN1 pravé hraniční rostlinné DNA (SEKV. ID. Č. 31). Tak vznikl fragment 694 bp (SEKV. ID. Č. 39) se sekvencí v podstatě podobnou sekvenci ze SEKV. ID. Č. 24 (nukleotidy 293 až 980).

Levá sousedící sekvence RF-BN1 ozimé řepky olejky byla určena s použitím T-DNA primeru (SEKV. ID. Č. 26) a primeru lokalizovaného v RF-BN1 levé hraniční rostlinné DNA (SEKV. ID. Č. 29). Tak vznikl fragment 1450 bp, z něhož 1279 bp bylo sekvencováno (SEKV. ID. Č. 40). Bylo zjištěno, že tato sekvence je v podstatě podobná sekvenci SEKV. ID. Č. 30 (nukleotidy 141 až 1421).

Tedy tím bylo potvrzeno, že pravá a levá sousedící sekvence elitní události MS-BN1 a RF-BN1 jsou v podstatě shodné pro jarní a ozimou řepku olejku.

Příklad 5

Vývoj diagnostických nástrojů pro kontrolu identity

Následující protokoly byly vyvinuty s cílem identifikovat jakýkoliv rostlinný materiál ozimé řepky olejky obsahující elitní událost MS-BN1.

5.1. MS-BN1 a RF-BN1 Elitní událost restrikční mapa identifikace protokol

Rostliny ozimé řepky olejky obsahující elitní událost MS-BN1 mohou být identifikovány metodou Southern blotting s použitím v podstatě stejného postupu jak byl popsán v příkladu 4.1. Tedy genomová DNA ozimé řepky olejky je 1) štěpena s alespoň dvěma, výhodně alespoň 3, konkrétně s alespoň 4, konkrétněji se všemi z následujících restrikčních enzymů: EcoRI, EcoRV, NdeI, HpaI, AflIII 2) přenesena na nylonovou membránu a 3) hybridizována s 3942 bp HindIII fragmentem z plazmidu pTHW107. Jestliže alespoň pro dva použité restrikční enzymy jsou identifikovány DNA fragmenty stejné délky jako fragmenty uvedené v tabulce 3 v Příkladu 4.1.1., pak je rostlina ozimé řepky olejky identifikována jako rostlina nesoucí elitní událost MS-BN1.

Rostliny ozimé řepky olejky obsahující elitní událost RF-BN1 mohou být identifikovány metodou Southern blotting s použitím v podstatě stejného postupu jak byl popsán v příkladu 4.1. Tedy genomová DNA ozimé řepky olejky je 1) štěpena s alespoň dvěma, výhodně alespoň 3, konkrétněji se všemi z následujících restrikčních enzymů: BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII 2) přenesena na nylonovou membránu a 3) hybridizována

s 2182 bp HpaI fragmentem plazmidu pTHW118. Jestliže alespoň pro dva použité restriční enzymy jsou identifikovány DNA fragmenty stejné délky jako fragmenty uvedené v tabulce 4 v příkladu 4.1.2., pak je rostlina ozimé řepky olejky identifikována jako rostlina nesoucí elitní událost RF-BN1.

5.2. PCR identifikační protokol pro elitní události MS-BN1 a RF-BN1

Test protokolu, se všemi vhodnými kontrolami, musí být proveden ještě před screeningem neznámých vzorků. Předložený protokol by mohl vyžadovat optimalizaci složek, které se mohou obecně lišit mezi jednotlivými laboratořemi (příprava templátové DNA, Taq DNA polymeráza, kvalita primerů, dNTP, termocykler atd.).

Amplifikace endogenní sekvence hraje v protokolu klíčovou roli. Je třeba dosáhnout takových podmínek PCR a cyklování teplot, aby se amplifikovaly v ekvimolárních množstvích endogenní a transgenní sekvence v templátu známé transgenní genomové DNA. Kdykoliv se cílový endogenní fragment neamplifikuje se stejnou intenzitou zjištěnou po elektroforéze na agarózovém gelu a obarvení ethidiumbromidem, optimalizace podmínek pro PCR je nezbytná.

5.2.1. Templátová DNA

Templátová DNA se připravuje z listových terčků nebo jednoho semena postupem podle Edwards *et al.* (Nucleic Acid Research, 19, p.1349, 1991). Když se používá DNA připravená jinými metodami, měl by se nejdříve provést test protokolu s různými množstvími templátu. Obvykle 50 ng genomové DNA jako templát poskytuje nejlepší výsledky.

5.2.2. Přidělení pozitivní a negativní kontroly

Následující pozitivní a negativní kontroly by měly být zařazeny v každém běhu PCR:

- „Master Mix“ kontrola (DNA negativní kontrola). To je PCR, ve které není přidána do reakce žádná DNA. Pokud nastane očekávaný výsledek, tj. žádné PCR produkty, znamená to, že připravená reakční směs (Master Mix) pro PCR není kontaminovaná cílovou DNA.
- DNA pozitivní kontrola (vzorek genomové DNA obsahující transgenní sekvence). Úspěšná amplifikace této pozitivní kontroly demonstruje, že PCR podmínky v daném běhu PCR byly takové, že umožnily amplifikaci cílové sekvence.
- kontrola DNA divokého typu. Toto je PCR, ve které je jako templát genomová DNA připravená z netransgenní rostliny. Když nastane očekávaný výsledek, tedy žádná PCR amplifikace produktu z transgenů, avšak jen amplifikace endogenního PCR produktu, to znamená, že není detekovatelné pozadí transgenů při amplifikaci samotné genomové DNA.

5.2.3. Primery

Následující primery, které specificky rozpoznávají transgen a sousedící sekvence MS-BN1 byly použity:

BNA01: 5'-gCT.Tgg.ACT.ATA.ATA.CCT.gAC-3' (SEKV. ID. Č. 12)

(MDB201) (cíl: transgen)

BNA02: 5'-TgA.CAC.TTT.gAg.CCA.CTC.g-3' (SEKV. ID. Č. 19)

(VDS51) (cíl: rostlinná DNA)

Pro identifikaci rostlinného materiálu obsahujícího RF-BN1 byly užity následující primery, které specificky rozpoznávají

transgen a sousedící sekvenci RF-BN1:

BNA03: 5'-TCA.TCT.ACg.gCA.ATg.TAC.CAg-3' (SEKV. ID. Č. 23)

(MDB193) (cíl: transgen)

BNA04: 5'-Tgg.ACC.CCT.Agg.TAA.ATg.CC-3' (SEKV. ID. Č. 41)

(MDB268) (cíl: rostlinná DNA)

Primery zacílené na endogenní sekvence jsou vždy přítomny v PCR koktejlu. Tyto primery slouží jako vnitřní kontrola u neznámých vzorků a v pozitivní kontrole. Pozitivní výsledek s dvojicí endogenních primerů demonstruje, že je v preparátu genomové DNA přítomen dostatek DNA v odpovídající kvalitě, aby mohl být generován PCR produkt. Endogenní primery byly:

BNA05: 5'-AAC.gAg.TgT.CAg.CTA.gAC.CAg.C-3' (SEKV. ID. Č. 42)

BNA06: 5'-CgC.AgT.TCT.gTg.AAC.ATC.gAC.C-3' (SEKV. ID. Č. 43)

5.2.4. Amplifikované fragmenty

Očekávané amplifikované fragmenty v PCR reakci jsou:

Pro dvojici primerů BNA05-BNA06: 394 bp (endogenní kontrola)

Pro dvojici primerů BNA01-BNA02: 280 bp (MS-BN1 elitní událost)

Pro dvojici primerů BNA03-BNA04: 215 bp (RF-BN1 elitní událost)

5.2.5. Podmínky PCR

PCR reakční směs obsahuje v 50 μ l reakci :

5 μ l templátová DNA

5 μ l 10x Amplifikační pufr (dodávaný s Taq polymerázou)

1 μ l 10 mM dNTP

1 μ l BNA01 (MS-BN1) nebo BNA03 (RF-BN1) (10 pmol/ μ l)

1 μ l BNA02 (RF-BN1) nebo BNA04 (RF-BN1) (10 pmol/ μ l)

0,5 μ l BNA05 (10 pmol/ μ l)

0,5 μ l BNA06 (10 pmol/ μ l)

0,2 μ l Taq DNA polymeráza (5 jednotek/ μ l)

voda do 50 μ l

Teplotní profil pro dosažení optimálních výsledků je následující:

4 minuty v 95 °C

Pak následuje:

1 minuta v 95 °C

1 minuta v 57 °C

2 minuty v 72 °C

v 5 cyklech

Pak následuje:

30 sekund v 92 °C

30 sekund v 57 °C

1 minuta v 72 °C

ve 22 až 25 cyklech

Pak následuje: 5 minut v 72 °C

5.2.6. Analýza na agarózovém gelu

Vzorky PCR o objemu 10 a 20 μ l se nanášejí na 1,5% agarózový gel (Tris-borátový pufr) společně s vhodným standardem molekulární hmotnosti (např. 100 bp „žebřík“ PHARMACIA).

5.2.7. Validace výsledků

Data získaná pro vzorky DNA transgenní rostliny v jednom běhu PCR run a jednom PCR koktejlu nelze akceptovat, dokud
1) DNA pozitivní kontrol nevykazuje očekávané PCR produkty

(transgenní a endogenní fragmenty), 2) DNA negativní kontrola je negativní pro PCR amplifikaci (žádné fragmenty) a 3) DNA kontrola divokého typu vykazuje očekávaný výsledek (amplifikován endogenní fragment).

Dráhy ukazující viditelná množství transgenního a endogenního PCR produktu očekávané velikosti, jsou indikací toho, že odpovídající rostlina, ze které byla genomová templátová DNA připravena, zdělila MS-BN1 a/nebo RF-BN1 elitní událost. Dráhy bez viditelného množství obou transgenních PCR produktů avšak s viditelným množstvím endogenního PCR produktu indikují, že odpovídající rostliny, ze kterých byla genomová templátová DNA připravena, neobsahují elitní událost. Dráhy bez viditelného množství endogenního a transgenních PCR produktu jsou výsledkem toho, že kvalita a/nebo kvantita genomové DNA nebyla dostatečná pro vznik PCR produktu. Tyto rostliny nemohou být vyhodnoceny. Genomová DNA by měla být znovu připravena a měl by být proveden nový běh PCR s příslušnými vhodnými kontrolami.

5.2.8. Použití protokolu diskriminační PCR k identifikaci MS-BN1 a RF-BN1

Rostlinný materiál z listů ozimé řepky olejky obsahující buďto MS-BN1, RF-BN1 nebo jinou transgenní událost, byl testován podle výše popsaného protokolu. Vzorky z ozimé řepky olejky divokého typu byly použity jako negativní kontroly. Výsledky PCR analýz jsou ilustrovány na obrázku 4 a 5.

Obrázek 4 ilustruje výsledek získaný pomocí identifikačního protokolu PCR pro elitní událost MS-BN1 na dva vzorcích ozimé řepky olejky (dráha 1 a 2). Dráha 1 obsahuje elitní událost detekovanou jako 280 bp pás, zatímco vzorek v dráze 2 neobsahuje MS-BN1.

Obrázek 5 ilustruje výsledek získaný pomocí PCR identifikačního protokolu pro elitní událost RF-BN1 na dvou vzorcích ozimé řepky olejky (dráha 1 a 2). Dráha 1 obsahuje elitní událost detekovanou jako 215 bp pás, zatímco vzorek v dráze 2 neobsahuje RF-BN1.

Příklad 6

Produkce hybridních semen s použitím MS-BN1 a RF-BN1 v rostlinách ozimé řepky olejky

Rostliny ozimé řepky olejky obsahující MS-BN1, které vykazovaly samčí sterilitu, byly kříženy s rostlinami ozimé řepky olejky homozygotními v RF-BN1. Hybridní semena byla sebrána z MS-BN1 a uložena ve sbírce ATCC pod přístupovým číslem ATCC PTA-730.

Tato hybridní semena byla znovu vyseta na pole. Bylo zjištěno, že rostliny byly 100% fertillní a projevovaly současně optimální agronomické vlastnosti. Hybridní rostliny obsahovaly buďto obě události MS-BN1 a RF-BN1 nebo jen RF-BN-1 samotnou.

Příklad 7

Vnesení MS-BN1 a RF-BN1 do výhodného kultivaru ozimé řepky olejky

Elitní události MS-BN1 a RF-BN1 byly opakovaným zpětným křížením rostlin obsahujících událost MS-BN1 nebo RF-BN1, v daném pořadí, přeneseny na řadu agronomicky významných kultivarů ozimé řepky olejky.

Bylo pozorováno, že introgrese elitní události do těchto kultivarů nijak významně neovlivnila žádné požadované fenotypové nebo agronomicky významné charakteristiky těchto kultivarů (žádná vazba), když exprese transgenu, která byla určována jako tolerance ke glufosinátu, dosáhla komerčně přijatelné úrovně. To potvrdilo status událostí MS-BN1 a RF-BN1 jako elitních událostí.

V připojených nárocích se užívá termín "rostlina" tak, že zahrnuje i jakákoliv rostlinná pletiva, v jakémkoliv stádiu zralosti, a také jakékoliv buňky, pletiva nebo orgány odebrané nebo pocházející z rostlin, včetně, aniž by však byl výčet omezující, semen, listů, stonků, květů, kořenů, jednotlivých buněk, gamet, buněčných kultur, tkáňových kultur nebo protoplastů.

Semena obsahující elitní událost MS-BN1 a elitní událost RF-BN1 nebo elitní událost RF-BN1 samotnou byla uložena v Americké sbírce mikroorganismů a tkáňových kultur ATCC pod přístupovým číslem: PTA-730.

SEZNAM SEKVENCÍ

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4946

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: T-DNA plazmidu pTHW107

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (964)..(4906)

<223> Hind III fragment

<400> 1

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgtcga actcggccgt cgagtacatg 60
gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa 120

atatttattg ataaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaatttatt 180
 gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tatcagctgg tacattgccg 240
 tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
 agctcatcgg gggatcctag acgcgtaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
 gggcggtagc ggcaggctga agtccagctg ccagaaacc acgtcatgcc agttcccgtg 420
 cttgaagccg gccgcccga gcatgccg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg 480
 cacgctcggg tcgttgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc 540
 cagggacttc agcaggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcggg 600
 ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggag ttgctgcct tccaggggcc 660
 cgcgtaggag atgccggcga cctcgcgct cacctcggcg acgagccagg gatagcgcct 720
 ccgagacgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcccgttc tgcggctcgg tacggaagtt 780
 gaccgtgctt gtctcgatgt agtggtgac gatggtgcag accgccggca tgtccgcctc 840
 ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgctg ttctgggtcc attgttcttc tttactcttt 900
 gtgtgactga ggtttggtct agtgctttg tcatctatat ataataata caacaatgag 960
 aacaagcttt ggagtgatcg gagggtctag gatacatgag attcaagtgg actaggatct
 1020
 acaccgttg attttgatg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca
 1080
 aaggcctaag gagaggtgtt gagaccctta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt
 1140
 ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aattgtgtga tggaggagt
 1200
 gtgcttgcct atttacttg cctggtggac ttggcccttt ccttatggg aatttatatt
 1260
 ttacttacta tagagctttc ataccttttt tttaccttgg atttagttaa tatataatgg
 1320
 tatgattcat gaataaaaat gggaaatfff tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta
 1380
 ggtgaaactg tggaatatat atttttttca tttaaaagca aaatttgcct tttactagaa
 1440
 ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa
 1500
 acagaactat gtttaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt
 1560
 tacaacaagt cataagcca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa
 1620
 aatattacaa atcataagcc caacaagtt attgatcaaa aaaaaaaaaac gcccaacaaa
 1680
 gctaaacaaa gtccaaaaaa aacttctcaa gtctocatct tcctttatga acattgaaaa
 1740

ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggcct gtcttcccaa cctcctacat

1800

cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gta~~ctttttt~~ agttgcaatg atattgatag

1860

tatgtttgtg aaaactaata gggttaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttgggtccaa

1920

gattttccga gagctttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat

1980

accaattag gtttcttatt atgtgccaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaaat

2040

gaaaacgtat gaatgttatt agtaaattgt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca

2100

gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtg ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat

2160

atatatataa tgctttacaa cacttggatt tttttttgga ggctggaatt tttaatctac

2220

atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat

2280

atatgtgttc gtgtatatt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat

2340

atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata

2400

tagtgcattt tttctaacaa ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag

2460

taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa

2520

attctttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac

2580

cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtaccgga attcgagctc

2640

ggtaccgagg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgca taatttatcc

2700

tagtttgccg gctatatttt gttttctatc gcgtattaa tgtataattg cgggactcta

2760

atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgtaattat tacatgctta

2820

acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt

2880

aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga gccggaaagt

2940

gaaattgacc gatcagagtt tgaagaaaaa tttattacac actttatgta aagctgaaaa

3000

aaacggcctc cgcaggaagc cgtttttttc gttatctgat ttttgtaaag gtctgataat

3060

ggtccgttgt tttgtaaact agccagtcgc ttgagtaaag aatccggctt gaattttctga
3120

agcctgatgt atagttaata tccgcttcac gccatgttcg tccgcttttg cccgggagtt
3180

tgccttcctt gtttgagaag atgtctccgc cgatgctttt ccccgagcgc acgtctgcaa
3240

ggttcccttt tgatgccacc cagccgaggg cttgtgcttc tgattttgta atgtaattat
3300

caggtagctt atgatatgtc tgaagataat ccgcaacccc gtcaaactgt ttgataaccg
3360

gtaccatggt agctaatttc ttttaagtaaa aactttgatt tgagtgatga tgttgactg
3420

ttacacttgc accacaaggg catatataga gcacaagaca tacacaacaa cttgcaaaac
3480

taacttttgt tggagcattt cgaggaaaat ggggagtagc aggctaactt gagggtaaca
3540

ttaaggtttc atgtattaat ttgttgcaaa catggactta gtgtgaggaa aaagtaccaa
3600

aattttgtct caccctgatt tcagttatgg aaattacatt atgaagctgt gctagagaag
3660

atgtttatcc tagtccagcc acccacctta tgcaagtctg cttttagctt gattcaaaaa
3720

ctgatttaat ttacattgct aatgtgcat acttcgagcc tatgtcgtt taattcgagt
3780

aggatgtata tattagtaca taaaaaatca tgtttgaatc atctttcata aagtgacaag
3840

tcaattgtcc cttcttggtt ggcactatat tcaatctgtt aatgcaaatt atccagttat
3900

acttagctag atatccaatt ttgaataaaa atagctcttg attagtaaac cggatagtg
3960

caaagtcaca tatccatcaa acttctgggtg ctcgtggcta agttctgatc gacatggggt
4020

taaaatttaa attgggacac ataaatagcc tatttgca aatctcccca tcgaaaatga
4080

cagattgtta catggaaaac aaaaagtctt ctgatagaag tcgcaaagta tcacaatttt
4140

ctatcgagag atagattgaa agaagtgcag ggaagcgggt aactggaaca taacacaatg
4200

tctaaattaa ttgcattcgc taacaaaaaa gtgtattact ctctccggtc cacaataagt
4260

tatttttgg ccctttttt atggtccaaa ataagtgagt ttttagatt tcaaaaatga
4320

tttaattatt ttttactac agtgcccttg gagtaaattg tgttgagta tgtgttagaa
4380

atgtttatgt gaagaaatag taaaggtaa tatgatcaat ttcattgcta tttaatgtta
4440

aaatgtgaat ttcttaatct gtgtgaaaac aaccaaaaaa tcacttattg tggaccggag
4500

aaagtatata aatatatatt tggaagcgac taaaaataaa cttttctcat attatacгаа
4560

cctaaaaaca gcatatggta gtttctaggg aatctaaatc actaaaatta ataaaagaag
4620

caacaagtat caatacatat gatttacacc gtcaaacacg aaattcgtaa atatttaata
4680

taataaagaa ttaatccaaa tagcctccca ccctataact taaactaaaa ataaccagcg
4740

aatgtatatt atatgcataa tttatatatt aaatgtgtat aatcatgtat aatcaatgta
4800

taatctatgt atatggtag aaaaagtaaa caattaatat agccggctat ttgtgtaaaa
4860

atccctaata taatcgcgac ggatccccgg gaattccggg gaagcttaga tccatggagc
4920

cattacaat tgaatatatc ctgccc
4946

<210> 2

<211> 4832

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: T-DNA plazmidu pTHW118

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1883)..(4065)

<223> HpaI fragment

<400> 2

aattacaacg gtatatatcc tgccagtact cggccgctga actcggccgt cgagtacatg 60

gtcgataaga aaaggcaatt tgtagatggt aattcccatc ttgaaagaaa tatagtttaa 120

atatttattg ataaaataac aagtcaggta ttatagtcca agcaaaaaca taaatttatt 180
 gatgcaagtt taaattcaga aatatttcaa taactgatta tadcagctgg tacattgccg 240
 tagatgaaag actgagtgcg atattatgtg taatacataa attgatgata tagctagctt 300
 agctcatcgg gggatcctag acgcgtgaga tcagatctcg gtgacgggca ggaccggacg 360
 gggcgggtacc ggcaggctga agtccagctg ccagaaaccc acgtcatgcc agttcccgtg 420
 cttgaagccg gccgcccga gcatgccgcg gggggcatat ccgagcgcct cgtgcatgcg 480
 cacgctcggg tcggtgggca gcccgatgac agcgaccacg ctcttgaagc cctgtgcctc 540
 cagggacttc agcaggtggg tgtagagcgt ggagcccagt cccgtccgct ggtggcgggg 600
 ggagacgtac acggtcgact cggccgtcca gtcgtaggcg ttgctgcctc tccaggggcc 660
 cgcgtagggc atgcccggca cctcgccgct cacctcggcg acgagccagg gatagcgcctc 720
 ccgacagcgg acgaggtcgt ccgtccactc ctgcggttcc tgcggctcgg tacggaagtt 780
 gaccgtgctt gtctcgatgt agtggttgac gatggtgcag accgcccgca tgtccgcctc 840
 ggtggcacgg cggatgtcgg ccgggcgctg ttctgggtcc attgttcttc tttactcttt 900
 gtgtgactga ggtttggctc agtgctttgg tcctctatat ataatgataa caacaatgag 960
 aacaagcttt ggagtgatcg gagggtctag gatacatgag attcaagtgg actaggatct
 1020
 acaccgttgg attttgagtg tggatatgtg tgaggttaat tttacttggg aacggccaca
 1080
 aaggcctaag gagaggtggt gagaccotta tcggcttgaa ccgctggaat aatgccacgt
 1140
 ggaagataat tccatgaatc ttatcgttat ctatgagtga aattgtgtga tggaggagtg
 1200
 gtgcttgctc attttacttg cctggtggac ttggcccttt ccttatgggg aatttatatt
 1260
 ttacttacta tagagctttc ataccttttt tttaccttgg atttagttaa tatataatgg
 1320
 tatgattcat gaataaaaat gggaaatfff tgaatttgta ctgctaaatg cataagatta
 1380
 ggtgaaactg tggaaatata atttttttca tttaaaagca aaatttgcct tttactagaa
 1440
 ttataaatat agaaaaatat ataacattca aataaaaatg aaaataagaa ctttcaaaaa
 1500
 acagaactat gtttaatgtg taaagattag tcgcacatca agtcatctgt tacaatatgt
 1560
 tacaacaagt cataagccca acaaagttag cacgtctaaa taaactaaag agtccacgaa
 1620
 aatattacaa atcataagcc caacaaagtt attgatcaaa aaaaaaaaaac gcccaacaaa
 1680
 gctaaacaaa gtccaaaaaa aacttctcaa gtctccatct tcctttatga acattgaaaa

1740

ctatacacia aacaagtcag ataaatctct ttctgggect gtcttcccaa cctcctacat
1800

cacttcccta tcggattgaa tgttttactt gtaccttttc cgttgcaatg atattgatag
1860

tatgtttgtg aaaactaata gggtaacaa tcgaagtcac ggaatatgga tttggtccaa
1920

gattttccga gagctttcta gtagaaagcc catcaccaga aatttactag taaaataaat
1980

accaattag gtttcttatt atgtgcaaaa ttcaatataa ttatagagga tatttcaaat
2040

gaaaacgtat gaatgttatt agtaaatggt caggtaagac attaaaaaaa tcctacgtca
2100

gatattcaac tttaaaaatt cgatcagtgt ggaattgtac aaaaatttgg gatctactat
2160

atatatataa tgctttacia cacttggatt tttttttgga ggctggaatt tttaatctac
2220

atatttgttt tggccatgca ccaactcatt gtttagtgta atactttgat tttgtcaaat
2280

atatgtgttc gtgtatattt gtataagaat ttctttgacc atatacacac acacatatat
2340

atatatatat atatattata tatcatgcac ttttaattga aaaaataata tatatatata
2400

tagtgcattt tttctaacia ccatatatgt tgcgattgat ctgcaaaaat actgctagag
2460

taatgaaaaa tataatctat tgctgaaatt atctcagatg ttaagatttt cttaaagtaa
2520

attttttcaa attttagcta aaagtcttgt aataactaaa gaataatata caatctcgac
2580

cacggaaaaa aaacacataa taaatttgaa tttcgaccgc ggtaccogga attcgagctc
2640

ggtaccoggg gatcttcccg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgca taatttatcc
2700

tagtttgccg gctatatttt gttttctatc gcgtattaa tgtataattg cgggactcta
2760

atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgtaattat tacatgctta
2820

acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg attcaatctt
2880

aagaaacttt attgcaaat gtttgaacga tctgcttcgg atcctctaga ccaagcttgc
2940

gggtttgtgt ttccatattg ttcatctccc attgatcgta ttaagaaagt atgatggta
3000

tgctgcagcc ttccgctttc gcttcacgga aaacctgaag cacactctcg gcgccatttt

3060

cagtcagctg cttgctttgt tcaaaactgcc tccattccaa aacgagcggg tactccaccc
3120

atccggtcag acaatcccat aaagcgtcca ggttttcacc gtagtattcc ggaagggcaa
3180

gctccttttt caatgtctgg tggaggctgc tgatacttct gatttgttcc ccgttaatga
3240

ctgctttttt catcggtagc taatttcttt aagtaaaaac tttgatttga gtgatgatgt
3300

tgtactgtta cacttgcacc acaagggcat atatagagca caagacatac acaacaactt
3360

gcaaaaactaa cttttgttgg agcatttcga ggaaaatggg gagtagcagg ctaatctgag
3420

ggtaacatta aggtttcatg tattaatttg ttgcaaacat ggacttagtg tgaggaaaaa
3480

gtacaaaaat tttgtctcac cctgatttca gttatggaaa ttacattatg aagctgtgct
3540

agagaagatg tttattctag tccagccacc caccttatgc aagtctgctt ttagcttgat
3600

tcaaaaactg atttaattta cattgctaaa tgtgcatact tcgagcctat gtcgctttaa
3660

ttcgagttagg atgtatatat tagtacataa aaaatcatgt ttgaatcatc tttcataaag
3720

tgacaagtca attgtccctt cttgtttggc actatattca atctgttaat gcaaattatc
3780

cagttatact tagctagata tccaattttg aataaaaata gctcttgatt agtaaaccgg
3840

atagtgacaa agtcacatat ccatcaaact tctgggtgctc gtggctaagt tctgatcgac
3900

atgggggttaa aatttaaatt gggacacata aatagcctat ttgtgcaaat ctccccatcg
3960

aaaatgacag attgttacat ggaaaacaaa aagtcctctg atagaagtcg caaagtatca
4020

caattttcta tcgagagata gattgaaaga agtgcagga agcggttaac tggaacataa
4080

cacaatgtct aaattaattg cattcgctaa ccaaaaagtg tattactctc tccggtccac
4140

aataagttat tttttggccc tttttttatg gtccaaaata agtgagtttt ttagatttca
4200

aaaatgattt aattatTTTT ttactacagt gcccttgag taaatggtgt tggagtatgt
4260

gtagaaatg tttatgtgaa gaaatagtaa aggttaatat gatcaatttc attgctattt
4320

aatgttaaaa tgtgaatttc ttaatctgtg tgaaaacacc aaaaatcac ttattgtgga

4380

ccggagaaag tatataaata tatatttggg agcgactaaa aataaacttt tctcatatta
4440

tacgaaccta aaaacagcat atggtagttt ctagggaatc taaatcacta aaattaataa
4500

aagaagcaac aagtatcaat acatatgatt tacaccgtca aacacgaaat tcgtaaatat
4560

ttaatataat aaagaattaa tccaaatagc ctcccaccct atkacttaa ctaaaaataa
4620

ccagcgaatg tatattatat gcataattta tatattaaat gtgtataatc atgtataatc
4680

aatgtataat ctatgtatat ggtagaaaa agtaaacaat taatatagcc ggctatttgt
4740

gtaaaaatcc ctaatataat cgcgacggat ccccggaat tccggggaag cttagatcca
4800

tggagccatt tacaattgaa tatatcctgc cg
4832

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 248

<400> 3

catgccctga cccaggctaa gtattttaac tttaaccact ttgctccgac agtcccattg 60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 249

<400> 4

caatgggact gtcggaggac tgagggccaa agcttggtc ttagcctggg tcagggcatg 60

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 247

<400> 5

ccgtcaccga gatctgatct cacgcg

26

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 250

<400> 6

gcactgaggg ccaaagcttg gctc

24

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 251

<400> 7

ggatcccccg atgagctaag ctagc

25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 254

<400> 8

cttagcctgg gtcagggcat g

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 258

<400> 9

ctacggcaat gtaccagctg

20

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer SP6

<400> 10

taatacgact cactataggg cga

23

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer T7

<400> 11

tttaggtgac actatagaat ac

22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 201

<400> 12

gcttgacta taatacctga c

21

<210> 13

<211> 953

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 5'sousedící úsek
MS-BN1

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1)..(24)

<223> pGEM®-T

<400> 13

```

cccngccgcc atggccgagg gattcttagc ctgggtcagg gcatgcatgg tgtgatccaa 60
agactttctc ggcccaaata ctaatcatca caagtcatgc atgatctgct cgggatggcc 120
aagaaaaatc gaacctatga caatattcac agttgtaagt tttttaccag tagacaaata 180
ccacttggtt taacatattg taaacttaat atatagaaga tgttcttatt cagaaaataa 240
tatatgtata tatataaaat tttattggcg actcgaggat gcacagaaat ataaaatggt 300
ggtcgcttag accatctcca atgtatttct ctatTTTTac ctctaaaata aaggagctct 360
ataatagagg tgggttttgc tccaatgtat ttctttaaaa tagagatctc tacatataga 420
gcaaaatata gaggaatggt atttcttctt ctataaatag aggagaaaat agcaatctct 480
atTTtagagg caaaaataga gatbsgttgg agtgattttg cctctaaatg ctattataga 540
ggtagaaaata gaggtgggtt ggagatgctc ttactatTTT catagtaggt gaaaacttga 600
aactagaaag ctttgagtg tacgagtga aaacctctct ttgtagaaac atacacatgc 660
catttagtta actagttgac atagatTTTT gagtcagata actttaagaa tatatatggt 720
tggatgagag tttgacactt tgagccactc gaaggacaaa ttttaaaaac ttgtgggatg 780
ctgtggccat aaaccttgag gacvsttga tcatattcta ttaactacag tacgaatag 840
attcgacctt tgcaattttc tcttcaggta ctcgccgctc gaactcggcc gtcgagtaca 900
tggtcgataa gaaaaggcaa tttgtagatg ttaattccca tcttgaaaga aat          953

```

<210> 14

<211> 16

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 611

<400> 14

ngtcgaswgt ntwcaa

16

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 259

<400> 15

gtgcagggaa gcggttaact gg

22

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 260

<400> 16

cctttggagt aaatggtggt gg

22

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 24

<400> 17

gcgaatgtat attatatgca

20

<210> 18

<211> 537

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 3'sousedící úsek
MS-BN1

<400> 18

gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat 60
gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttgtgta 120
aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagctta gatccatgga 180
tttgttatga taaccaaaaa caccctcctt tttattataa aggtagggat agctaactctg 240
ttattcgggt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatfff 300
tttgttcggt ttcattacaa tccaagacaa gttaggttta ttacatttta ccaaaaaaaaa 360
aggtttggtt tattgtgaac attgctgogg tttatttaaa tttgattcta ttcaaaggtc 420
aatccgtatt taacaagtaa actagtcttt atataatctt aaatctaacg atctttgatt 480
tttaaattgc atttanctat gtctctctctg gcgtatatgg tctctttgaa aacactc 537

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 51

<400> 19

tgacactttg agcactcg

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 48

<400> 20

ggagggtggt tttggttatc

20

<210> 21

<211> 178

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující delecí inzerčního
místa MS-BN1

<400> 21

gacactttga gccactcgaa ggacaaattt taaaaacttg tgggatgctg tggccataaa 60

ccttgaggac gctttgatca tattctatta actacagtac gaatatgatt cgacctttgc 120

aattttctct tgttttctaa tcatatgga tttggtatga taaccaaaaa caccctcc 178

<210> 22

<211> 1198

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: inzerční úsek MS-BN1

<400> 22

catggtgtga tccaaagact ttctoggccc aaataactaat catcacaagt catgcatgat 60
 ctgctcggga tggccaagaa aaatogaacc catgacaata ttcacagttg taagtttttt 120
 accagtagac aaataccact tggtttaaca tattgtaaac ttaatatata gaagatgttc 180
 ctattcagaa aataatatat gtatatatat aaaattttat tggcgactcg aggatgcaca 240
 gaaatataaa atgttggtcg cttagaccat ctccaatgta tttctctatt tttacctcta 300
 aaataaagga gctctataat agaggtgggt tttgctccaa tgtatttctt taaaatagag 360
 atctctacat atagagcaaa atatagagga atgttatttc ttcctctata aatagaggag 420
 aaaatagcaa tctctatttt agaggcaaaa atagagatbs gttggagtga ttttgcctct 480
 aaatgctatt atagaggtag aaatagaggt gggttggaga tgctcttact attttcatag 540
 taggtgaaaa cttgaaacta gaaagctttg gagtgtacga gtggaaaacc tctctttgta 600
 gaaacataca catgccattt agttaactag ttgacataga tttttgagtc agataacttt 660
 aagaatatat atgtttggat gagagtttga cactttgagc cactcgaagg acaaatttta 720
 aaaacttgty ggatgctgtg gccataaacc ttgaggacvs tttgatcata ttctattaac 780
 tacagtacga atatgattcg acctttgcaa ttttctcttc aggttttcta attcatatgg 840
 atttgttatg ataaccaaaa acaccctcct ttttattata aaggtagggga tagctaactc 900
 gttattcggg tttgattaga gatattaatc ccgttttatc aagtacagtt tgatgtattt 960
 ttttgttcgt tttcattaca atccaagaca agttaggttt attacatttt accaaaaaaaa
 1020
 aaggtttggt ttattgtgaa cattgctgog gtttatttaa atttgattct attcaaaggt
 1080
 caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gatctttgat
 1140
 ttttaaattg catttancta tgtcctctct ggcgtatatg gtctctttga aaacactc
 1198

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 193

<400> 23

tcatctacgg caatgtacca gc

22

<210> 24

<211> 1077

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 5' susedící úsek
RF-BN1

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1)..(45)

<223> pGEM®-T

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1061)..(1077)

<223> pGEM®-T

<400> 24

gagctctccc atatggtcga cctgcaggcg gccgcactag tgattcttag cctgggtcag 60
ggcatggcat gtctgatggg acatgctaaa tgctatattt cctgtttaaa gtgttaaaat 120
cattttctga tggaactaaa tccagtttta agagtaactg acaagtacaa ttaagcacia 180
caatataata gtagtaattg gcacttttga ttgttaaata tcaaacaggt aaagttacia 240
aaaaaatac caaaccaata atgaagactt ggcggagaca gtgccgtgcg aaggttttcg 300
gagggtccgag acgagttcaa aaatacattt tacataatat atttttcata tatatatata 360
tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct tcacaaaaat 420
tttataaact aaatttttaa atcatgaaca aaaagtatga atttgtaata taaatacaaa 480
gatacaaatt tttgattgaa atattggtag ctgtcaaaaa agtaaatcctt agaatttaaa 540
ttaactatag taaactatat attgaaaata ttataaattt ttatcaaatt ctcataaata 600

11.10.02

tataaaataa atctaactca tagcatataa aaagaagact aatgtggatc aaaatattta 660
 cagtttttta gaagtagaat ctttatagtt ttatttataa tatagcaaaa atgatcacia 720
 acctagttay ttaaggagaa gtccaattca aatcaaata aaaataaaat ctatctaaaa 780
 aaatatgtta actaccatgc aaaagtattt tttttgtaat tagaaaccct gaaatttgta 840
 caaaaacttgg acccctaggt aatgccttt ttcctctcgc gataagaaaa ggcaatttgt 900
 agatgttaat tcccatcttg aaagaaatat agtttaata tttattgata aaataacaag 960
 tcaggtatta tagtccaagc aaaaacataa atttattgat gcaagtttaa attcagaaat
 1020
 atttcaataa ctgattatat cagctggtag atcgccgtag aatcccgcgc catggcg
 1077

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 286

<400> 25

ntgcgaswga nawgaa

16

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 314

<400> 26

gtaggagggt gggaagacc

19

<210> 27

11.10.05

<211> 25

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 315

<400> 27

gggcttttcta ctagaaagct ctggg

25

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 316

<400> 28

ccgatagga agtgatgtag gagg

24

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 288

<400> 29

atgcagcaag aagcttggag g

21

<210> 30

11.10.00

<211> 1501

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 3' susedící úsek
RF-BN1

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1)..(16)

<223> pGEM®-T

<220>

<221> různé vlastnosti

<222> (1458)..(1501)

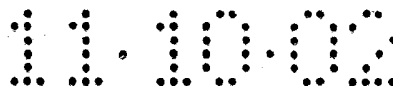
<223> pGEM®-T

<400> 30

```

ccatggccgc gggattgtag gaggttggga agacaggccc agaaagagat ttatctgact 60
cgttttgtgt atagttttca atgttcataa aggaagatgg agacttgaga agtttttttt 120
ggactttggt tagctttggt gggcgttttt ttttttgat caataacttt gttgggctta 180
tggtcgataa gogtgcgcat gtctgatgg acatgctaaa tgctatattt ctgtttaaag 240
tgttaaaatc atttttgat ggaactaat ccagttttaa gagtaactga caagtacaat 300
taagcacaac aataaaatag tagtaattgg catctttgat tgttaaatat caaaacaata 360
aagttacaaa aaaaaatacc aaaccaataa tgaagacttg gcggagacag tgccgtgcga 420
aggttttcgg aggtccgaga cgagttcaaa aatacatttt acataatata tttttcatat 480
atatatatat atataacatt caaaagtttg aattattaca taaacgtttt ctaaattttc 540
ttcaccaaaa ttttataaac taaaattttt maatcatgaa caaaaagtat gaatttgtaa 600
tataaatacm aagatacaaa tttttgattg aatattgggt agctgtcaaa aaagtaaadc 660
ttagaattta aattaactat agtaaactat ataggaataa tattataaat ttttatcaaa 720
ttctcataaa tatataaaat aaatctaact catagcatat aaaaagaaga ctaatgtgga 780
tcaaratatt tacagttttt tagaagtaga atctctatag ttttatttaa aatatagcaa 840

```



aaatgatcac aaacctagtt actttaacca gaagtccaat tcaaaatcaa ataaaaataa 900
 aaatctatct aaaaaaatat gttaactacc atgcaaaagt attttttttt gtaattagaa 960
 accctgaaat ttgtacaaaa cttggacccc taggtaaatt ccctagaaag tatectatta
 1020
 gcgtcgacaa actgttgctc atatttttct ctccttactt tatatcatac actaatatan
 1080
 gnagatgatc taattaatta ttcatttcca tgctagctaa ttcaagaaaa agaaaaaaaa
 1140
 ctattatcta aacttatatt cgagcaacac ctggagata acaggatata tgtcattaat
 1200
 gaatgcttga actcatctcg cgaactcatc tcgcatcgct tatagccaca aagatccaac
 1260
 ccctctcttc aatcatatat cagtagtaca atacaatag atattgtgag cacatatgcc
 1320
 gtctagtact gatgtgtaca tgtagaggag ccgcaaatgt ttagtcactc caacaaatga
 1380
 gcatgaccac gcatcttctg atgatgtaca gccgtccctt ttgctctctc aaatatectc
 1440
 caagcttctt gctgcataaa tcaactagtgc ggccgcctgc aggtcgacca tatgggagag
 1500

c
1

150

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 269

<400> 31

ggtttttcgga ggtccgagac g

21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 283

<400> 32

cttgacccc taggtaaagt c

21

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 284

<400> 33

gtacaaaact tggacccta gg

22

<210> 34

<211> 1068

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující delecí cílového místa RF-BN1

<400> 34

cgcggttgga gctctcccat atggtcgacc tgcaggcggc cgactagtg attcttgac 60
 ccctaggtaa atgccttttt caaaagcctc taagcacggt tctgggcggg gagtcagcga 120
 gaaaaaaga tatttccta gaaagtatcc tattagcgtc gacaaactgt tgctcatatt 180
 tttctctcct tactttatat catacactaa tataaaaaga tgatctaatt aattattcat 240
 ttccatgcta gctaattcaa gaaaaagaaa aaaactatta tctaaactta tattcgagca 300

acacctcgga gataacagga tatatgttat taatgaatgc ttgaactcat ctgcggaact 360
 catctcgcat cgcttatagc cacaaagatc caaccctct cttcaatcat atatcagtag 420
 tacaatacaa atagatattg tgagcacata tgccgtctag tactgatgtg tatatgtaga 480
 gganngcaaa tgtttagtca ctccaacaaa tgagcatgac nacgcatctt ctgatgatgt 540
 acagccgtcc cttttgctct ctcaaatac ctccaagctt cttgctgcat ggaatcttct 600
 tcttggtgtc tttcatgata acaaaatcta acgagagaga aacccttagt caagaaaaaa 660
 caaataaaac tctaacgaga gtgtgtgaga aagtagagag tatgtgtgag tgacggagag 720
 aaagtgagac cataaagatg ttgtgcaaag agagcaagac ttaacctata tatactcaca 780
 tacacgtaca catcatacc attanagata ataaaaagga aaaaggaaca actaacaagg 840
 gaactgtatc ccatacttta tctcatcata catgatgcat aatatattct ttogtatatc 900
 aagaaaaatg agcctgatat tttttattt cgaaactaaa agagtgtcta tttctctctc 960
 ttagagatag tgccatgtca aatttctaag aagtagcaag atttacaag gaatctaaag
 1020
 caaccccacg cgcattgtgt tcatttctct cgaccatccc ggggcoat
 1068

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 57

<400> 35

gcatgatctg ctcgggatgg c

21

<210> 36

<211> 909

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 5'sousedící úsek MS-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky

<400> 36

tgc at gat ct gct cgg gat gcca ag aaaa atc ga acc ca tgaca atatt cac agt t gta 60
 agt ttt ttt ac cag tag acaa atacc actt gtt taac ata ttg taa actt aat ata taga 120
 agat gtt cct attc ag aaaa taat ata tgt atata taa aat ttt attg gcg act cgag 180
 gat gcac aga aatata aat gtt ggt cgt tag acc atct cca atgt att tct ctatt ttt 240
 tac ctctaaa ataa agaac tct ata atag aggt ggg ttt tact cca atg tatt tct tta 300
 aaat agag at ctct acat at agag caaat atag agga at gtt att tctt cct ctataaa 360
 tag ag gaa aat ag caat c tct att ttag aggc aaaa at agag at ggg tgg agt gatt 420
 ttgc ctctaa atg ctatt at agag gtagaa atag aggt gg gtt gg agat g ctct tactat 480
 ttt catag ta ggt gaaa act tgaa actaga aag ctt tgg a gtgt acg agt ggaaa cctc 540
 tct ttt gtag aac ata caca tgcc att tag tta act agt t gac ata gatt ttt g agt cag 600
 ata act ttaa gaat ata t gtt g gat ga gag ttt gaca ctt t g agcca ctc ga agg ac 660
 aaat t taaa aact t g tgg atg ct g tgg ccataaac ct tgagg acg ct ttgat catat 720
 tct att aact acag tac ga tat gatt cga ctt t g caat ttt ctct ca gtact cgg cc 780
 gtc ga act cg gcc gtc agt acat ggt cga taag aaaa agg caatt t gtag atgt taattc 840
 ccat ct t gaa agaa at atag tttaa atatt tatt g gataa aataaca agt caggt attat 900
 agtcca agc 909

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 68

<400> 37

ccatatacgc cagagaggac

20

<210> 38

<211> 522

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 3'sousedící úsek MS-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky

<400> 38

```
gcgaatgtat attatatgca taatttatat attaaatgtg tataatcatg tataatcaat 60
gtataatcta tgtatatggt tagaaaaagt aaacaattaa tatagccggc tatttgtgta 120
aaaatcccta atataatcga cggatccccg ggaattccgg gggaagotta gatccatgga 180
tttgttatga taaccaaaaa caccctcctt tttattataa aggtagggat agctaactctg 240
ttattcgggtt ttgattagag atattaatcc cgttttatca agtacagttt gatgtatfff 300
tttgttcgtt ttcattacaa tccaagacaa gttaggttta ttacatttta ccaaaaaaaaa 360
aggtttggtt tattgtgaac attgctgcg gtttatttaa atttgattct attcaaaggt 420
caatccgtat ttaacaagta aactagtctt tatataatct taaatctaac gataacttggga 480
tttttaaatt gcatttagct atgtcctctc tggcgtatat gg 522
```

<210> 39

<211> 694

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 5'sousedící úsek RF-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky

<400> 39

```
ggttttcgga ggtccgagac gagttcaaaa atacatttta cataatatat ttttcatata 60
tatatatata tataacattc aaaagtttga attattacat aaacgttttc taaattttct 120
```

tcacccaaaat tttataaact aaaatTTTTa aatcatgaac aaaaagtatg aatttgtaat .180
 ataaatacaa agatacaaat ttttgattga aatattggta gctgtcaaaa aagtaaactct 240
 tagaatttaa attaactata gtaaactata tattgaaaat attataaatt tttatcaaat 300
 tctcataaat atataaaata aatctaactc atagcatata aaaagaagac taatgtggat 360
 caaaatattt acagttttttt agaagtagaa tctttatagt tttatttaa ataatagcaa 420
 aatgatcaca aacctagtta cttaaccag aagtccaatt caaatcaaa taaaataaa 480
 aatctatcta aaaaaatag ttaactacca tgcaaaagta ttttttttg taattagaaa 540
 ccctgaaatt tgtacaaaac ttggaccct aggtaatgc cttttcatc tcgcgataag 600
 aaaaggcaat ttgtagatgt taattcccat cttgaaagaa ataatgttta aatatttatt 660
 gataaataa caagtcaggt attatagtcc aagc 694

<210> 40

<211> 1279

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: sekvence obsahující 3' susedící úsek RF-BN1 v rostlině ozimé řepky olejky

<400> 40

gggggTTTT tttttgatc aataacttg ttggccttat ggtcgataag cgtgcatg 60
 tctgatggta catgctaaat gctatatttc tgtttaaagt gttaaaatca ttttctgatg 120
 gaactaaatc cagttttaag agtaactgac aagtacaatt aagcacaaca ataaaatagt 180
 agtaattggc atctttgatt gttaaatatc aaacaataaa gttcaaaaaa aaataccaac 240
 ccaataatga agacttggcg gagacagtgc cgtgcgaagg ttttcggagg tccgagacga 300
 gttcaaaaat acattttaca taatatattt ttcatatata tatatatata taacattcaa 360
 aagtttgaat tattacataa acgttttcta aattttcttc accaaaattt tataaactaa 420
 aatttttaa tcatgaacaa aaagtatgaa ttgtaatat aaatacaaag atacaaattt 480
 ttgattgaaa tattgtagc tgtcaaaaaa gtaaacttta gaatttaaat taactatagt 540
 aactatata ttgaaaatat tataaatttt tatcaaattc tcataaatat ataaaataaa 600
 tctaactcat agcatataaa aagaagacta atgtggatca aaatatttac agttttttag 660

aagtagaatc tttatagttt tatttaaaat atagcaaaaa tgatcacaaa cctagttact 720
ttaaccagaa gtccaattca aaatcaaata aaaataaaaa tctatctaaa aaaatatggt 780
aactaccatg caaaagtatt ttttttggta attagaaacc ctgaaatttg tacaaaactt 840
ggaccctag gtaaattccc tagaaagtat cctattagcg tcgacaaact gttgctcata 900
tttttctctc cttactttat atcatacact aatataaaaa gatgatctaa ttaattattc 960
atttccatgc tagctaatto aagaaaaaga aaaaaaactt attatctaaa cttatattcg
1020
agcaacacct cggagataac aggatatatg tcattaatga atgcttgaac tcatctcgcg
1080
aactcatctc gcatcgctta tagccacaaa gatccaacc ctctcttcaa tcatatatca
1140
gtagtacaat acaaatagat attgtgagca catatgccgt ctagtactga tgtgtatag
1200
tagaggagcc gcaaagtgtt agtcactcca acaaatgagc atgaccaocg atcttctgat
1260
gatgtacagc cgtcccttt
1279

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer 268 (BNA04)

<400> 41

tggacccta ggtaaagcc

20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer BNA05

<400> 42

aacgagtgtc agctagacca gc

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: primer BNA06

<400> 43

cgcagttctg tgaacatcga cc

22

P A T E N T O V É N Á R O K Y (původní)

1. Rostlina ozimé řepky olejky, semena, buňky nebo pletiva rostliny podle nároku 1, kde genomová DNA rostlin ozimé řepky olejky nebo semen, buněk nebo pletiv rostliny poskytnou alespoň dva soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

I) jeden soubor BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp,

II) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp,

III) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp,

IV) jeden soubor HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp,

přičemž každý z restričních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravenou štěpením plazmidu pTHW118 enzymem HpaI.

2. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 1, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo pletiv je schopna poskytnout alespoň tři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.

3. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 2, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo

pletiv je schopna poskytnout čtyři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.

4. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 2, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo pletiv je schopna poskytnout všech pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
5. Rostlina ozimé řepky olejky, semena, buňky nebo pletiva rostliny podle nároku 1, kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
6. Rostlina ozimé řepky olejky, semena, buňky nebo pletiva rostliny podle nároku 5, kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti přibližně 215 s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence ze SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
7. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 1, kde dále genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň tři soubory restričních fragmentů vybrané ze skupiny, kterou tvoří:
 - I) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp, a jeden délky více než 14 kbp,
 - II) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp, a druhý má délku více než 14 kbp,
 - III) jeden soubor HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a

2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp, a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
IV) jeden soubor AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp, a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,

V) jeden soubor NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

kde každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravenou štěpením plazmidu pTHW107 enzymem HindIII.

8. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 7, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout alespoň tři soubory restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny.
9. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 8, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout alespoň čtyři soubory restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny.
10. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 9, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout všech pět souborů restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny.
11. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 7, kde dále genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím

polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

12. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 1, které mohou být získány křížením rostliny s rostlinou ozimé řepky olejky získanou ze semen uložených v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730.
13. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, kde se jedná o hybridní rostlinu, semena nebo hybridní rostlinné buňky nebo pletiva.
14. Semena uložená v ATCC pod přístupovým číslem PTA-730.
15. Rostlina ozimé řepky olejky nebo její semena, rostlinné buňky nebo pletiva, kde: a) genomová DNA rostlin ozimé řepky olejky nebo semen, buněk nebo pletiv rostliny poskytnou alespoň dva soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
 - I) jeden soubor BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp,
 - II) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp,
 - III) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp,
 - IV) jeden soubor HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp,přičemž každý z restričních fragmentů je schopen

hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravitelnou štěpením plazmidu pTHW118 enzymem HpaI, a/nebo

b) kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.

16. Rostlina, semena, buňky nebo pletiva rostliny podle nároku 15, kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti přibližně 215 s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence ze SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
17. Rostlina, buňky, pletivo nebo semena podle nároku 15, kde dále genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň tři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
18. Rostlina, buňky, pletivo nebo semena podle nároku 17, kde dále genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň čtyři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
19. Rostlina, buňky, pletivo nebo semena podle nároku 18, kde dále genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout všech pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
20. Rostlina, buňky, pletivo nebo semena podle nároku 13, kde dále genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň tři soubory restričních

fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

- I) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp, a jeden délky více než 14 kbp,
- II) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp, a druhý má délku více než 14 kbp,
- III) jeden soubor HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,
- IV) jeden soubor AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp, a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
- V) jeden soubor NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

přičemž každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravenou štěpením plazmidu pTHW107 enzymem HindIII, a/nebo

b) kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

21. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 20, kde genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

22. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 20, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout alespoň tři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
23. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 22, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout alespoň čtyři soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
24. Rostlina, semena, rostlinné buňky nebo pletivo podle nároku 23, kde genomová DNA rostliny, semen, rostlinných buněk nebo tkání je schopna poskytnout všech pět souborů restričních fragmentů vybraných ze skupiny.
25. Způsob produkce hybridních semen vyznačující se tím, že zahrnuje
- a) křížení transgenní rostliny ozimé řepky olejky se samčí sterilitou, která má jednu z uvedených charakteristik nebo obě:
 - 1) genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň dva soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
 - I) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp, a jeden délky více než 14 kbp,
 - II) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp, a druhý má délku více než 14 kbp,
 - III) jeden soubor HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,

- IV) jeden soubor AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp, a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,
- V) jeden soubor NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

příčemž každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravitelnou štěpením plazmidu pTHW107 enzymem HindIII, a/nebo

- 1) genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19,

s rostlinou ozimé řepky olejky obnovující fertilitu, obsahující, a to trvale integrován do svého genomu, gen obnovující fertilitu obsahující:

- DNA kódující inhibitor ribonukleázy
- konstitutivní promotor, kde DNA je v stejné transkripční jednotce a pod kontrolou konstitutivního promotoru,

b) sklizení hybridních semen z rostlin ozimé řepky olejky se samčí sterilitou.

26. Způsob podle nároku 25 vyznačující se tím, že rostlina obnovující fertilitu je charakterizována jednou z následujících vlastností nebo oběma:

- 1) genomová DNA rostlin ozimé řepky olejky nebo semen, buněk nebo pletiv rostliny poskytnou alespoň dva soubory restrikčních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

I) jeden soubor BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi

805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp,

II) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp,

III) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp,

IV) jeden soubor HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp,

příčemž každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravitelnou štěpením plazmidu pTHW118 enzymem HpaI, a/nebo

2) genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.

27. Hybridní semena rostlin ozimé řepky získatelná způsobem podle nároku 25 nebo 26.

28. Způsob přípravy buněk nebo rostlin transgenní ozimé řepky olejky vyznačující se tím, že zahrnuje inzerci rekombinantní DNA molekuly do části chromozómové DNA buňky ozimé řepky olejky, kterážto molekula je v podstatě podobná sekvenci SEKV. ID. Č. 22, a regeneraci rostliny ozimé řepky olejky z transformované buňky ozimé řepky olejky.

29. Způsob podle nároku 28, kde rekombinantní DNA molekul je gen samčí sterility a regenerovaná rostlina je rostlina se

samčí sterilitou.

30. Způsob přípravy buněk nebo rostlin transgenní ozimé řepky olejky vyznačující se tím, že zahrnuje inzerci rekombinantní DNA molekuly do části chromozómové DNA buňky ozimé řepky olejky, kterážto molekula je v podstatě podobná sekvenci SEKV. ID. Č. 34, a regeneraci rostliny ozimé řepky olejky z transformované buňky ozimé řepky olejky.
31. Způsob podle nároku 21, kde rekombinantní DNA molekul je gen obnovy fertility a regenerovaná rostlina je obnovitel fertility schopný po křížení s rostlinou se samčí sterilitou poskytnout potomstvo se samčí fertilitou.
32. Transgenní buňka nebo rostlina ozimé řepky získatelná způsobem podle kteréhokoliv z nároků 28 až 31.
33. Způsob identifikace transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo pletiv, obsahující elitní událost MS-BN1, vyznačující se tím, že zahrnuje stanovení toho, zda genomová DNA rostliny, buněk nebo pletiv má jednu z následujících vlastností nebo obě:
- 1) genomová DNA rostliny, buňky, pletiva nebo semen je schopna poskytnout alespoň dva soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:
 - I) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2266 bp, a jeden délky více než 14 kbp,
 - II) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde jeden má délku mezi 1159 a 1700 bp, výhodně přibližně 1,4 kbp, a druhý má délku více než 14 kbp,
 - III) jeden soubor HpaI fragmentů, jeden délky mezi 1986 a 2140 bp, výhodně délky přibližně 1990 bp a jeden délky

mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2229 bp,

IV) jeden soubor AflIII fragmentů, jeden délky mezi 514 a 805 bp, výhodně délky přibližně 522 bp, a jeden délky mezi 2140 a 2450 bp, výhodně přibližně 2250 bp, a jeden délky mezi 2450 a 2838 bp, výhodně přibližně 2477 bp,

V) jeden soubor NdeI fragmentů, oba délky mezi 5077 a 14057 bp, výhodně jeden délky přibližně 6500 bp a jeden délky přibližně 10 kbp,

příčemž každý z restrikčních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 3942 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barnázy připravenou štěpením plazmidu pTHW107 enzymem HindIII, a/nebo

2) genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce s dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

34. Způsob podle nároku 33 vyznačující se tím, že zahrnuje stanovení toho, zda genomová DNA transgenní rostliny, jejích pletiv nebo buněk může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 260 a 300 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

35. Souprava pro identifikaci transgenní rostliny, jejích buněk nebo pletiva obsahujících elitní událost MS-BN1, vyznačující se tím, že obsahuje PCR sondy, z nichž jedna rozpoznává sekvence v transgenu, další rozpoznává rostlinou DNA sekvenci ve 3' sousedícím úseku SEKV. ID. Č. 13 nebo 5' sousedící sekvenci SEKV. ID. Č. 18 události

MS-BN1, pro použití v PCR identifikačním protokolu.

36. Souprava podle nároku 35 pro identifikaci transgenní rostliny, jejích buněk nebo pletiva obsahujících elitní událost MS-BN1, vyznačující se tím, že obsahuje PCR sondy mající nukleotidovou sekvenci SEKV. ID. Č. 12 a SEKV. ID. Č. 19.

37. Způsob identifikaci transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo pletiv obsahujících elitní událost RF-BN1, vyznačující se tím, že zahrnuje stanovení jedné nebo obou z následujících charakteristik genomové DNA transgenní rostliny nebo jejích buněk nebo pletiv:

1) genomová DNA rostlin ozimé řepky olejky nebo semen, buněk nebo pletiv rostliny poskytnou alespoň dva soubory restričních fragmentů vybraných ze skupiny, kterou tvoří:

I) jeden soubor BamHI fragmentů, kde jeden má délku mezi 805 a 1099 bp, výhodně přibližně 814 bp, jeden má délku mezi 1700 a 1986 bp, jeden má délku mezi 2450 a 2838 bp a jeden má délku mezi 5077 a 14057 bp,

II) jeden soubor EcoRI fragmentů, jeden délky mezi 805 a 1159 bp, jeden délky mezi 1986 a 2450 bp a dva délky mezi 5077 a 14057 bp,

III) jeden soubor EcoRV fragmentů, kde oba mají délku mezi 5077 a 14057 bp,

IV) jeden soubor HindIII fragmentů, kde jeden má délku mezi 1700 a 2140 bp a dva mají délku mezi 2450 a 2838 bp,

přičemž každý z restričních fragmentů je schopen hybridizace v podmínkách standardní stringence, s fragmentem o velikosti 2182 bp obsahujícím sekvenci PTA29-barstar připravenou štěpením plazmidu pTHW118 enzymem HpaI, a/nebo

- 2) genomová DNA může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
38. Způsob podle nároku 37 vyznačující se tím, že zahrnuje stanovení toho, zda genomová DNA transgenní rostliny, jejích buněk nebo pletiv může být použita k amplifikaci DNA fragmentu o velikosti mezi 195 a 235 bp, s použitím polymerázové řetězové reakce se dvěma primery majícími nukleotidové sekvence SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
39. Souprava pro identifikaci transgenní rostliny, jejích buněk nebo pletiva obsahujících elitní událost RF-BN1, vyznačující se tím, že obsahuje PCR sondy, z nichž jedna rozpoznává sekvence v transgenu, a další rozpoznává rostlinou DNA sekvenci v 3' sousedícím úseku SEKV. ID. Č. 24 nebo 5' sousedící SEKV. ID. Č. 30 události RF-BN1, pro použití v PCR identifikačním protokolu.
40. Souprava podle nároku 39, pro identifikaci transgenní rostlin, jejích buněk nebo pletiva obsahujících elitní událost RF-BN1, vyznačující se tím, že obsahuje PCR sondy mající nukleotidovou sekvenci SEKV. ID. Č. 23 a SEKV. ID. Č. 41.
41. Souprava pro identifikaci elitní události MS-BN1 v biologických vzorcích vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden PCR primer nebo sondu, která rozpoznává sekvence v 3' nebo 5' sousedícím úseku události MS-BN1.

42. Souprava podle nároku 41 vyznačující se tím, že alespoň jeden PCR primer rozpoznává sekvence v rostlinné DNA v SEKV. ID. Č. 13.
43. Souprava podle nároku 42 vyznačující se tím, že primer rozpoznávající sekvence v rostlinné DNA v SEKV. ID. Č. 13 obsahuje sekvenci SEKV. ID. Č. 19.
44. Souprava podle kteréhokoliv z nároků 41 až 43 vyznačující se tím, že dále obsahuje alespoň druhý PCR primer nebo sondu, která rozpoznává sekvence v cizorodé DNA MS-BN2.
45. Souprava podle nároku 44 vyznačující se tím, že primer rozpoznávající sekvenci v cizorodé DNA MS-BN1 obsahuje sekvenci SEKV. ID. Č. 12.
46. Primer pro použití v MS-BN1 PCR identifikačním protokolu, který má sekvenci, která za optimalizovaných PCR podmínek specificky rozpoznává sekvenci v 5' nebo 3' sousedícím úseku MS-BN1.
47. Primer podle nároku 46, který má alespoň 80% sekvenční identitu se sekvencí rostlinné DNA SEKV. ID. Č. 13 nebo SEKV. ID. Č. 18 nebo komplementární sekvenci.
48. Primer podle nároku 47 obsahující sekvenci SEKV. ID. Č. 19.
49. Primer obsahující sekvenci SEKV. ID. Č. 12.
50. Způsob pro potvrzení čistoty osiva vyznačující se tím, že zahrnuje detekci MS-BN1 specifické DNA sekvence pomocí specifického primeru nebo sondy, která specificky

rozpoznává 5' nebo 3' sousedící úsek MS-BN1, ve vzorcích semen.

51. Způsob screeningu osiva na přítomnost MS-BN1 vyznačující se tím, že zahrnuje detekci MS-BN1 specifické DNA sekvence pomocí specifického primeru nebo sondy, která specificky rozpoznává 5' nebo 3' sousedící úsek MS-BN1, ve vzorcích šarže osiva.
52. Souprava pro identifikaci elitní události RF-BN1 v biologických vzorcích vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden PCR primer nebo sondu, která rozpoznává sekvence v 3' nebo 5' sousedícím úseku události RF-BN1.
53. Souprava podle nároku 52 vyznačující se tím, že alespoň jeden PCR primer rozpoznává sekvenci rostlinné DNA v SEKV. ID. Č. 24.
54. Souprava podle nároku 53 vyznačující se tím, že primer rozpoznávající sekvenci v rostlinné DNA v SEKV. ID. Č. 24 obsahuje sekvenci SEKV. ID. Č. 41.
55. Souprava podle kteréhokoliv z nároků 52 až 54 vyznačující se tím, že dále obsahuje alespoň druhý PCR primer nebo sondu, která rozpoznává sekvenci v cizorodé DNA MS-BN2.
56. Souprava podle nároku 55 vyznačující se tím, že primer rozpoznávající sekvenci v cizorodé DNA RF-BN1 obsahuje sekvenci SEKV. ID. Č. 23.
57. Primer pro použití v RF-BN1 PCR identifikačním protokolu,

který má sekvenci, která za optimalizovaných PCR podmínek specificky rozpoznává sekvenci v 5' nebo 3' sousedícím úseku MS-BN1.

58. Primer podle nároku 57, který má alespoň 80% sekvenční identitu se sekvencí rostlinné DNA SEKV. ID. Č. 24 nebo SEKV. ID. Č. 30 nebo komplementární sekvenci.
59. Primer podle nároku 58 obsahující sekvenci SEKV. ID. Č. 41.
60. Primer obsahující sekvenci SEKV. ID. Č. 23.
61. Způsob potvrzení čistoty osiva vyznačující se tím, že zahrnuje detekci RF-BN1 specifické DNA sekvence pomocí specifického primeru nebo sondy, která specificky rozpoznává 5' nebo 3' sousedící úsek události RF-BN1, ve vzorcích semen.
62. Způsob screeningu osiva na přítomnost RF-BN1 vyznačující se tím, že zahrnuje detekci RF-BN1 specifické DNA sekvence pomocí specifického primeru nebo sondy, která specificky rozpoznává 5' nebo 3' sousedící úsek RF-BN1, ve vzorcích šarže osiva.