

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046896**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.07

(21) Номер заявки
202190095

(22) Дата подачи заявки
2019.07.26

(51) Int. Cl. **A01C 11/00** (2006.01)
A01C 7/00 (2006.01)
A01G 1/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

**(54) ТРАНСГЕННЫЙ ОБЪЕКТ КУКУРУЗЫ MON 95379 И СПОСОБЫ ЕГО
ОБНАРУЖЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/711,810**

(32) **2018.07.30**

(33) **US**

(43) **2021.06.29**

(86) **PCT/US2019/043666**

(87) **WO 2020/028172 2020.02.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК
(US)**

(72) Изобретатель:
**Андерсон Хетер М., Браун Сара Л.,
Карвальо Ренато А., Кастро
Ансидеритон А., Дункманн
Кэтрин М., Эванс Адам Дж.,
Фласинский Станислав, Гриффит
Кара, Шэнь Тяньсян, Смитт Тодд Р.,
Уайндлер Хайди М. (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) Genbank submission KG815221 [database online], 23 December 2014, [retrieved on 2019-11-12]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KG815221>> full document

Genbank submission CP015659 [database online], 23 May 2016, [retrieved on 2019-11-05]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LR584442>> full document

Genbank submission F1982754 [database online], 22 May 2010, [retrieved on 2019-11-12]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FI982754>> full document

Genbank submission BZ318215 [database online], 6 November 2002, [retrieved on 2019-11-12]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BZ318215>> full document

Genbank submission LN503569 [database online], 15 September 2014, [retrieved on 2019-11-12]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LN503569>> full document

Genbank submission AC230033 [database online], 21 September 2013, [retrieved on 2019-11-12]. Retrieved from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC230033>> full document

US-B2-9469880

US-B2-6593273

(57) Изобретение относится к трансгенному объекту кукурузы MON 95379, растениям, клеткам растения, семенам, частям растений, растениям-потомкам и товарным продуктам, содержащим объект MON 95379. Изобретение также относится к полинуклеотидам, специфичным для объекта MON 95379, и способам применения и обнаружения объекта MON 95379, а также растениям, клеткам растений, семенам, частям растений, растениям-потомкам и товарным продуктам, содержащим объект MON 95379.

046896 B1

046896 B1

Ссылка на связанную заявку

В этой заявке заявляется приоритет предварительной заявки США № 62/711810, поданной 30 июля 2018 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Включение перечня последовательностей

Список последовательностей, содержащийся в файле с именем MONS463WO_ST25, который имеет 75 кбайт (измерено в Microsoft Windows®), был создан 26 июля 2019 г., поданный в электронном виде и включенный посредством ссылки.

Область изобретения

Изобретение относится к молекулам рекомбинантной ДНК, присутствующим и/или выделенным из объекта кукурузы MON 95379. Изобретение также относится к трансгенным растениям кукурузы, частям растений и семенам, клеткам и сельскохозяйственным продуктам, содержащим объект кукурузы MON 95379, а также к способам его применения и обнаружения присутствия объекта кукурузы MON 95379. Трансгенные растения кукурузы, части, семена и клетки, содержащие ДНК объекта кукурузы MON 95379, проявляют устойчивость к заражению насекомыми из семейства Lepidoptera.

Уровень техники изобретения

Кукуруза (*zea mays*) - важная сельскохозяйственная культура и основной источник пищи во многих регионах мира. Способы биотехнологии были применены к кукурузе для улучшения агрономических свойств и качества продукта. Одним из таких агрономических признаков является устойчивость к насекомым, которая достигается за счет экспрессии гетерологичных токсинов насекомых, также известных как трансгены, вставленные в геном растения кукурузы.

На экспрессию таких трансгенов в трансгенном растении, части растения, семени или клетке может влиять множество различных факторов, включая элементы, применимые в кассетах, управляющих экспрессией трансгена, и взаимодействие этих элементов внутри кассеты. Это дополнительно усложняется для трансгенной вставки, содержащей две или более кассет экспрессии, при этом каждая кассета экспрессии имеет трансген, придающий отдельный признак, также известный как мультигенный трансгенный объект. Коммерчески пригодный мультигенный трансгенный объект требует, чтобы каждый из трансгенов в трансгенной вставке экспрессировался способом, необходимым для каждого признака. Чтобы достичь этого, сначала создают и тестируют отдельные кассеты экспрессии на растениях, и кассеты экспрессии, которые демонстрируют наилучшую активность против насекомых, но не приводят к отрицательным фенотипам из-за экспрессии, выбирают для каждого признака. Затем выбранные кассеты экспрессии для одного признака объединяются с выбранными кассетами экспрессии для другого признака в единую конструкцию. Множественные конструкции созданы с применением различных ориентаций для обеспечения наилучшей устойчивости и предотвращения возникновения отрицательных фенотипов или отрицательных агрономических факторов, таких как более низкая урожайность. Конструкции тестируются, чтобы убедиться, что все кассеты экспрессии хорошо работают вместе и каждый трансген правильно экспрессируется. Затем выбранную комбинацию и ориентацию кассет экспрессии применяют в качестве единой трансгенной вставки для получения сотен трансгенных объектов, каждый объект является результатом случайной вставки конструкции в другое место генома. Каждый трансгенный объект уникален по своему молекулярному профилю и точке хромосомной вставки. Из-за вариабельности, связанной с созданием объекта, каждый уникальный объект должен быть проанализирован на протяжении нескольких поколений растений - на каждом этапе оценки молекулярной характеристики, эффективности экспрессии белка и агрономии - чтобы выбрать лучший объект для коммерческого применения. На характеристики объекта в трансгенном растении, части растения, семени или клетке и, следовательно, на его эффективность могут влиять геномное местоположение вставки трансгена. Конкретно, на эффективность объекта могут влиять цис- и/или транс-факторы относительно сайта интеграции или структуры хроматина. Объекты могут иметь одну и ту же трансгенную вставку и, тем не менее, иметь разные уровни экспрессии трансгена и разные характеристики среди тканей и на стадиях развития, в различных зародышевых плазмах или в определенных условиях роста. Между некоторыми объектами также могут быть нежелательные фенотипические или агрономические различия. Следовательно, необходимо произвести и проанализировать большое количество отдельных объектов трансформации растений, чтобы выбрать объект, имеющий превосходные свойства по сравнению с желаемым признаком, а также оптимальные фенотипические и сельскохозяйственные характеристики, необходимые для того, чтобы сделать его пригодным для коммерческих целей. Кроме того, создание мультигенного объекта для коммерческого применения требует тщательной молекулярной характеристики, тестирования в теплице и полевых испытаний в течение нескольких лет, в разных местоположениях и при различных условиях, чтобы можно было собрать обширные агрономические, фенотипические и молекулярные данные. Затем полученные данные должны быть проанализированы учеными и агрономами, чтобы выбрать объект, который будет пригоден для коммерческих целей. После выбора такой объект может быть затем интрогрессирован с применением способов скрещивания растений в качестве единственного локуса, имеющего несколько признаков устойчивости к насекомым, в новую зародышевую плазму, подходящую для конкретных местных условий выращивания, и комбинирован/объединен путем скрещивания с другими различными объектами, придающими признаки, отличные от признаков, обеспечиваемых объектом данного изобретения.

Сущность изобретения

Изобретение относится к новому трансгенному объекту кукурузы, MON 95379, который обеспечивает инсектицидный контроль над вредителями *Lepidopteran* кукурузы. Изобретение также относится к трансгенным растениям, клеткам растения, семенам, частям растения и товарным продуктам, содержащим объект MON 95379. В другом варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к полинуклеотидам, специфичным для объекта MON 95379 и растений, клеток растения, семян, частей растения, растений-потомков и товарных продуктов, содержащих объект MON 95379. В еще одном варианте осуществления данного изобретения, представлены способы, относящиеся к объекту MON 95379.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к молекуле рекомбинантной ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и ее полного комплемента.

В одном варианте осуществления данного изобретения, молекула рекомбинантной ДНК получена из объекта кукурузы MON 95379 в образце семени, содержащем указанный объект, депонированный под номером доступа в ATCC PTA-125027.

Другой аспект изобретения относится к молекуле ДНК, содержащей полинуклеотидный сегмент достаточной длины для функционирования в качестве ДНК-зонда, который специфически гибридизуется в строгих условиях гибридизации с ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, при этом обнаружение гибридизации указанной молекулы ДНК при указанных строгих условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении присутствия ДНК объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, образец включает растение кукурузы, клетку растения кукурузы, семя кукурузы, часть растения кукурузы, растение-потомок кукурузы, обработанное семя кукурузы, корм для животных, содержащий кукурузу, кукурузное масло, кукурузную муку крупного помола, кукурузную муку, кукурузные хлопья, кукурузные отруби, макаронные изделия из кукурузы, кукурузную биомассу и топливные продукты, произведенные из кукурузы и ее частей.

Еще один аспект изобретения относится к паре молекул ДНК, содержащих первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, отличную от первой молекулы ДНК, которые функционируют как праймеры ДНК при совместном применении в реакции амплификации с образцом, содержащим матричную ДНК объекта кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, диагностического в отношении присутствия указанной ДНК объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце, при этом указанный ампликон содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

Другой вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ обнаружения присутствия сегмента ДНК, диагностического в отношении ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, при этом указанный способ включает: а) приведение в контакт образца с молекулой ДНК, которая функционирует как зонд и специфически гибридизуется при строгих условиях с объектом кукурузы MON 95379; б) подвергание указанного образца и указанной молекулы ДНК строгим условиям гибридизации; и с) обнаружение гибридизации указанной молекулы ДНК с указанной ДНК в указанном образце, при этом указанное обнаружение является диагностическим признаком в отношении присутствия указанной ДНК объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце.

Еще один вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ обнаружения присутствия сегмента ДНК, диагностического в отношении ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, при этом способ включает: а) приведение указанного образца в контакт с парой молекул ДНК по данному изобретению; б) проведение реакции амплификации, достаточной для получения ампликона ДНК; и с) обнаружение присутствия указанного ампликона ДНК в указанной реакционной смеси, при этом указанный ампликон ДНК содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

Другой вариант осуществления данного изобретения представляет собой растение кукурузы, часть растения кукурузы, клетку кукурузы или их часть, содержащую рекомбинантную полинуклеотидную молекулу, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Это растение кукурузы, часть растения кукурузы, клетка кукурузы или их часть являются инсектицидными, если они содержатся в рационе насекомых-вредителей *Lepidopteran*. Вредители *Lepidopteran* могут включать осеннюю совку (*Spodoptera frugiperda*), совку кукурузную (*Helicoverpa zed*), огнёвку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), огнёвку сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), и малого кукурузного мотылька (*Elastopalpus lignosellus*). Кроме того, растение кукурузы можно дополнительно определить как потомство любого поколения растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379.

Еще один вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ защиты растения кукурузы от заражения насекомыми, при этом указанный способ включает обеспечение в рационе насе-

комых-вредителей *Lepidopteran* инсектицидно эффективного количества клеток или тканей растения кукурузы, содержащих объект кукурузы MON 95379. Опять же, предполагаемые насекомые-вредители *Lepidopteran* включают осеннюю совку (*Spodoptera frugiperda*), совку кукурузную (*Helicoverpa zed*), огнёвку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), огнёвку сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), и малого кукурузного мотылька (*Elasmopalpus lignosellus*).

Другой вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ получения растения кукурузы, устойчивого к насекомым, включающий: а) половое скрещивание двух разных растений кукурузы с по меньшей мере одним из двух разных растений кукурузы, содержащих ДНК трансгенных объектов кукурузы MON 95379; б) отбор образцов семени или ткани от потомства на стадии (а); с) обнаружение в указанном образце со стадии (б) потомства, содержащего ДНК объект кукурузы MON 95379; и d) отбор указанного потомства, содержащего ДНК объекта кукурузы MON 95379.

Еще один вариант осуществления данного изобретения представляет собой семя кукурузы, неживой растительный материал кукурузы или микроорганизм, содержащий обнаруживаемое количество нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 или их полных комплементов.

Еще одним вариантом осуществления данного изобретения является товарный продукт, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и их полных комплементов. Предполагаемые товарные продукты включают цельное или переработанное семя кукурузы, корм для животных, содержащий кукурузу, кукурузное масло, кукурузную муку крупного помола, кукурузную муку, кукурузные хлопья, кукурузные отруби, кукурузную биомассу и топливные продукты, полученные с использованием кукурузы и частей кукурузы.

Другой вариант осуществления данного изобретения представляет собой растение кукурузы, часть растения кукурузы или семя кукурузы, содержащие ДНК, функционирующую в качестве матрицы, при тестировании в способе амплификации ДНК, в котором получают ампликон, диагностический в отношении присутствия ДНК объекта MON 95379.

Еще один вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ определения зиготности растения кукурузы или семени кукурузы, содержащих объект MON 95379, включающий: а) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с парой праймеров, которая способна продуцировать ампликон одного из токсинов, кодирующий последовательности, кодирующие *Cry1B.868* или *Cry1Da_7*; б) приведение в контакт указанного образца, содержащего ДНК кукурузы, с парой праймеров, способной продуцировать ампликон внутреннего стандарта, который, как известно, является однокопийным и гомозиготным в растении кукурузы; с) приведение в контакт образца ДНК с набором зондов, который содержит по меньшей мере первый зонд, который специфически гибридизуется с одной из кодирующих последовательностей токсина, кодирующих *Cry1B.868* или *Cry1Da_7*, и второй зонд, который специфически гибридизуется с геномной ДНК внутреннего стандарта, которая, как известно, является однокопийной и гомозиготной в растении кукурузы; d) выполнение реакции амплификации ДНК с использованием ПЦР в реальном времени и определение значений пороговых циклов (значений C_t) ампликона, соответствующего последовательности, кодирующей токсин, и однокопийному гомозиготному внутреннему стандарту; e) вычисление разницы (ΔC_t) между значением C_t однокопийного гомозиготного ампликона внутреннего стандарта и значением C_t ампликона последовательности, кодирующей токсин; и f) определение зиготности, где ΔC_t около нуля (0) указывает на гомозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379 и ΔC_t около одного (1) указывает на гетерозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379. В некоторых вариантах осуществления этого способа пары праймеров выбраны из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21 в сочетании с SEQ ID NO: 22; и зонды представляют собой SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 23. В других вариантах осуществления данного изобретения, пары праймеров выбраны из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 24 в сочетании с SEQ ID NO: 25; и зонды представляют собой SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 26. В еще одном варианте осуществления этого изобретения ΔC_t около одного (1), указывает на гетерозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379, находится в диапазоне от 0,75 до 1,25.

Дополнительный вариант осуществления данного изобретения представляет собой способ обнаружения зиготности растения кукурузы или семени кукурузы, содержащих объект MON 95379, включающий: а) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с набором пар праймеров, содержащих по меньшей мере две разные пары праймеров, способных продуцировать первый ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379, и второй ампликон диагностический в отношении нативной геномной ДНК кукурузы, не содержащей объект MON 95379; i) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с образцом и набором пар праймеров; ii) обнаружение в реакционной смеси для амплификации нуклеиновой кислоты первого ампликона, диагностического в отношении объекта MON

95379 или второго ампликона, диагностического в отношении нативной геномной ДНК кукурузы, не содержащей объекта MON 95379, при этом присутствие только первого ампликона является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гомозиготных по объекту MON 95379, и присутствие как первого ампликона, так и второго ампликона является диагностическим признаком растения кукурузы или семени кукурузы, гетерозиготных по объекту MON 95379; или b) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с набором зондов, который содержит по меньшей мере первый зонд, который специфически гибридизуется с ДНК объекта MON 95379, и по меньшей мере второй зонд, который специфически гибридизуется с геномной ДНК кукурузы, которая была нарушена вставкой гетерологичной ДНК объекта MON 95379 и не гибридизуется с ДНК объекта MON 95379; i) гибридизация набора зондов с образцом в строгих условиях гибридизации, при этом обнаружение гибридизации только первого зонда в условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гомозиготных по объекту MON 95379, и при этом обнаружение гибридизации как первого зонда, так и второго зонда в условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гетерозиготных по объекту MON 95379. В одном из вариантов осуществления этого способа набор праймеров содержит последовательность SEQ ID NO: 15 в сочетании с SEQ ID NO: 16, и SEQ ID NO: 15 в сочетании с SEQ ID NO: 27. В другом варианте осуществления этого способа набор зондов содержит последовательность SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 28.

Вышеупомянутые и другие аспекты изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена последовательность объекта кукурузы MON 95379. Горизонтальные линии и прямоугольники соответствуют положениям последовательности SEQ ID NO: 1 ([1]), SEQ ID NO: 2 ([2]), SEQ ID NO: 3 ([3]), SEQ ID NO: 4 ([4]), SEQ ID NO: 5 ([5]), SEQ ID NO: 6 ([6]), SEQ ID NO: 7 ([7]), SEQ ID NO: 8 ([8]), SEQ ID NO: 9 ([9]), SEQ ID NO: 11 ([11]) и SEQ ID NO: 12 ([12]) относительно SEQ ID NO: 10 ([10]). Горизонтальные стрелки, обозначенные SQ51219 (SEQ ID NO: 15) ([15]), SQ21524 (SEQ ID NO: 16) ([16]), SQ50998 (SEQ ID NO: 21) ([21]), SQ50997 (SEQ ID NO: 22) ([22]), SQ50485 (SEQ ID NO: 24) ([24]) и SQ50484 (SEQ ID NO: 25) ([25]), представляют собой приблизительное положение множеств праймеров, которые можно применять для обнаружения объекта кукурузы MON 95379. Горизонтальные стрелки, обозначенные PB10269 (SEQ ID NO: 17) ([17]), PB50340 (SEQ ID NO: 23) ([23]), PB50138 (SEQ ID NO: 26) ([26]), представляют собой приблизительное положение ДНК-зонда, который можно применять для обнаружения объекта кукурузы MON 95379. "E" представляет собой энхансерный элемент, "P" представляет собой промоторный элемент, "L" представляет собой лидерный элемент (5' UTR), "I" представляет собой интронный элемент, "T" представляет собой 3' UTR, "Cry1B.868" представляет собой элемент кодирующей последовательности Cry1B.868, "Cry1Da_7" представляет собой элемент кодирующей последовательности Cry1Da_7, "LoxP" представляет собой сайт, в котором произошло удаление маркера Cre-рекомбиназы, оставив один из двух сайтов LoxP после удаления маркера, и "LB" представляет собой левую границу T-ДНК.

Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение касет T-ДНК до интеграции с образованием объекта MON 95379, после интеграции и после Cre-вырезания. Верхний горизонтальный прямоугольник представляет касетку T-ДНК в плазмидном векторе, применяемом для трансформации объекта MON 95379, представленного как SEQ ID NO: 13 ([13]) ("T-ДНК перед интеграцией"). Горизонтальные стрелки ниже представляют отдельные генетические элементы, содержащиеся в двух касетах трансгенов. "LB" представляет собой левый граничный элемент T-ДНК, "E" представляет собой энхансерный элемент, "P" представляет собой промоторный элемент, "L" представляет собой лидерный элемент (5' UTR), "I" представляет собой интронный элемент, "T" представляет собой 3' UTR, "Cry1B.868" представляет собой элемент кодирующей последовательности Cry1B.868, "Cry1Da_7" представляет собой элемент кодирующей последовательности Cry1Da_7, "CP4" представляет собой селективный маркер CP4, "TS" представляет целевую последовательность, "LoxP" представляет сайт, в котором происходит вырезание маркера Cre-рекомбиназы, и "RB" представляет собой правый граничный элемент T-ДНК. Средний горизонтальный прямоугольник "Вставленная T-ДНК после интеграции" представляет касетку T-ДНК, интегрированную в геном кукурузы после трансформации, при этом правая граница T-ДНК (RB) была потеряна во время интеграции. Нижний горизонтальный прямоугольник "Вставленная T-ДНК после Cre-вырезания" представляет собой интегрированную касетку T-ДНК после того, как касета с селективным маркером CP4 была вырезана, оставив после себя один из двух сайтов LoxP и участок LB.

Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение процесса скрещивания для получения безмаркерного объекта кукурузы MON 95379. Объекты ("объекты") поколения R_0 - это объекты, которые были получены из начальной трансформации с помощью бинарного вектора для трансформации, применяемого для генерации объекта кукурузы MON 95379. Последующие поколения "R" (R_1 , и R_2) представляют собой последовательные поколения, полученные в результате самоопыления растений, полученных от исходного объекта R_0 , что привело к объекту кукурузы MON 95379. Объекты R_2 , которые являются гомозиготными по вставке T-ДНК, перекрестно опыляются с элитной трансгенной линией кукурузы,

содержащей кассету трансгена для экспрессии Cre-рекомбиназы, что приводит к поколению F₁, в котором многие из потомков утратили кассету с селективным маркером CP4 за счет вырезания Cre-рекомбиназы. Гемизиготные T-ДНК-положительные, CP4-отрицательные растения отбираются и самоопыляются, что приводит к образованию поколения F₂. Растения F₂ гомозиготные по вставленному аллелю T-ДНК без маркера CP4 и лишённые кассеты трансгена Cre-рекомбиназы, отбираются и самоопыляются, давая начало поколению F₃. Растения поколения F₃ являются самоопыляемыми, давая чистую линию семени F4 Gold Standard.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность из 50 нуклеотидов, представляющую 5'-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 1 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 838-887.

SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность из 50 нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения интегрированной кассеты экспрессии трансгена и геномной ДНК кукурузы. SEQ ID NO: 2 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14156-14205.

SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность из 100 нуклеотидов, представляющую 5-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 3 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 813-912.

SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность из 100 нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения интегрированной кассеты экспрессии трансгена и геномной ДНК кукурузы. SEQ ID NO: 4 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14131-14230.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность из 200 нуклеотидов, представляющую 5-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 5 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 763-962.

SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность из 200 нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения интегрированной кассеты экспрессии трансгена и геномной ДНК кукурузы. SEQ ID NO: 6 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14081-14280.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность из 1160 нуклеотидов, представляющую 5-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 7 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 1-1160.

SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность из 1178 нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения интегрированной кассеты экспрессии трансгена и геномной ДНК кукурузы. SEQ ID NO: 8 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14039-15216.

SEQ ID NO: 9 представляет собой нуклеотидную последовательность из 13318 нуклеотидов, соответствующую вставленной трансгенной T-ДНК объекта кукурузы MON 95379.

SEQ ID NO: 10 представляет собой нуклеотидную последовательность из 15216 нуклеотидов, соответствующую нуклеотидной последовательности контига 5'-фланкирующей последовательности геномной нуклеотидной последовательности ДНК, вставленной нуклеотидной последовательности T-ДНК в объекте MON 95379, и 3'-фланкирующей последовательности геномной нуклеотидной последовательности ДНК; и включает SEQ ID NO: 11 (нуклеотиды 1-862), SEQ ID NO: 9 (нуклеотиды 863-14180) и SEQ ID NO: 12 (нуклеотиды 14181-15216).

SEQ ID NO: 11 представляет собой нуклеотидную последовательность из 862 нуклеотидов, представляющую 5'-фланкирующую последовательность геномной ДНК кукурузы до вставленной T-ДНК. SEQ ID NO: 11 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 1-862.

SEQ ID NO: 12 представляет собой нуклеотидную последовательность из 1036 нуклеотидов, представляющую 3'-фланкирующую последовательность геномной ДНК кукурузы после вставленной T-ДНК. SEQ ID NO: 12 найдена в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14181-15216.

SEQ ID NO: 13 представляет собой нуклеотидную последовательность из 18376 нуклеотидов, представляющую кассету трансгена, содержащуюся в бинарном векторе для трансформации плазмиды, применяемому для трансформации кукурузы с получением объекта кукурузы MON 95379.

SEQ ID NO: 14 представляет собой нуклеотидную последовательность из 35 нуклеотидов, представляющую сайты LoxP, применяемую для Cre-опосредованного вырезания и рекомбинации. Оставшийся сайт LoxP после вырезания маркера можно найти в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 1080-1114.

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность из 20 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ51219, применяемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, и идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 833-852 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 16 представляет собой нуклеотидную последовательность из 30 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ21524, применяемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 905-934 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 17 представляет собой нуклеотидную последовательность из 16 нуклеотидов, соответ-

ствующую зонду, обозначенному как PB10269, применяемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 886-901 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 18 представляет собой нуклеотидную последовательность из 24 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ20222, применяемому в качестве внутреннего контроля для анализа объекта и зиготности для MON 95379, и который гибридизируется с участком генома кукурузы.

SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность из 28 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ20221, применяемому в качестве внутреннего контроля для анализа объекта и зиготности для MON 95379, и который гибридизируется с участком генома кукурузы.

SEQ ID NO: 20 представляет собой нуклеотидную последовательность из 29 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PB50237, применяемому в качестве внутреннего контроля для анализа объекта и зиготности для MON 95379, и который гибридизируется с участком генома кукурузы.

SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность из 20 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ50998, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1B.868 в SEQ ID NO: 10; и идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 2809-2828 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 22 представляет собой нуклеотидную последовательность из 20 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ50997, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1B.868 в SEQ ID NO: 10; и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 2852-2871 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 23 представляет собой нуклеотидную последовательность из 18 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PB50340, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1B.868 в SEQ ID NO: 10; и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 2833-2850 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 24 представляет собой нуклеотидную последовательность из 19 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ50485, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1Da_7 в SEQ ID NO: 10; и идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 12820-12838 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 25 представляет собой нуклеотидную последовательность из 18 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как SQ50484, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1Da_7 в SEQ ID NO: 10; и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 12855-12872 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 26 представляет собой нуклеотидную последовательность из 14 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PB50138, применяемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с кодирующей последовательностью Cry1Da_7 в SEQ ID NO: 10; и идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 12840-12853 SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 27 представляет собой нуклеотидную последовательность из 21 нуклеотидов, соответствующую праймеру для термической амплификации, обозначенному как PNEG DNA, используемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с участком геномной ДНК кукурузы, которая была удалена, когда Т-ДНК применялась для создания объекта MON 95379 вставленного в геном кукурузы. Ампликон, полученный из комбинации праймеров SQ51219 и PNEG DNA, является диагностическим признаком в отношении аллеля дикого типа, в котором отсутствует объект MON 95379 вставленной Т-ДНК.

SEQ ID NO: 28 представляет собой нуклеотидную последовательность из 14 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PRBNEG DNA, используемому в анализе зиготности для объекта MON 95379, и гибридизируется с участком геномной ДНК кукурузы, который был удален, когда Т-ДНК применялась для создания объекта MON 95379, вставленного в геном кукурузы.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение относится к трансгенному объекту кукурузы - MON 95379 - который обеспечивает инсектицидный контроль над вредителями *Lepidoptera* кукурузы путем экспрессии Cry1B.868 и Cry1Da_7. В частности, экспрессия белков-ингибиторов насекомых Cry1B.868 и Cry1Da_7 в объекте кукурузы MON 95379 обеспечивает устойчивость к насекомым-вредителям *Lepidoptera* осенней совке (*Spodoptera frugiperda*), совке кукурузной (*Helicoverpa zea*), огнёвке кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), огнёвке сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), и малому кукурузному мотыльку (*Elas-*

torpalpus lignosellus). Объект MON 95379 удовлетворит большую потребность в борьбе с этими насекомыми на рынке кукурузы, поскольку химические инсектициды часто не обеспечивают адекватный контроль над этими насекомыми или требуют многократного применения в течение вегетационного периода, что увеличивает поступление химических пестицидов в окружающую среду и добавляет стоимость производству кукурузы.

Следует понимать, что ссылка на объект MON 95379 эквивалентна ссылке на объект MON 95379; они взаимозаменяемы и представляют собой один и то же трансгенный объект кукурузы.

Методы трансформации растений применяются для случайной вставки чужеродной ДНК (также известной как трансгенная ДНК) в хромосому генома клетки для получения генетически модифицированной клетки, также называемой "трансгенной" или "рекомбинантной" клеткой. С помощью этого метода трансформируются многие отдельные клетки, каждая из которых приводит к уникальному "трансгенному объекту" или "объекту" из-за случайной вставки чужеродной ДНК в геном. Затем трансгенное растение регенерирует из каждой отдельной трансгенной клетки. В результате каждая клетка трансгенного растения содержит уникально вставленный трансгенный объект в качестве стабильной части его генома. Это трансгенное растение затем можно применять для получения растений-потомков, каждое из которых содержит уникальный трансгенный объект. Объект кукурузы MON 95379 был получен с помощью Agrobacterium-опосредованного процесса трансформации незрелых зародышей кукурузы с помощью одной бинарной системы Т-ДНК. В этой системе был использован штамм Agrobacterium, имеющий один бинарный плазмидный вектор с одной Т-ДНК. Конструкция Т-ДНК содержала две кассеты трансгена для экспрессии последовательностей, кодирующих токсин насекомых, кодирующих Cry1B.868 и Cry1Ba_7, и кассету трансгена, применяемую для отбора трансформированных клеток кукурузы с использованием селекции глифосатом (CP4). Конструкция Т-ДНК представляет собой SEQ ID NO: 13 и проиллюстрирована на фиг. 2 ("Т-ДНК перед интеграцией"). Во время интеграции правая граница Т-ДНК была потеряна, как показано на фиг. 2 ("Вставленная Т-ДНК после интеграции"). Кассета для селекции глифосатом была фланкирована с обеих сторон сайтами узнавания LoxP, которые распознаются Cre-рекомбиназой, полученной из фага Enterobacteria P1 (Larry Gilbertson (2003) Cre-lox recombination: Cre-active tools for plant biotechnology. TRENDS in Biotechnology, 21:12, 550-555).

Как конкретно описано в данном документе, объект кукурузы MON 95379 был получен в результате комплексного процесса исследований и разработок, в ходе которого: (1) сотни плазмидных векторных конструкций, которые различались в отношении кодирующих последовательностей для инсектицидных белков, кодирующих последовательностей для транскрипционных регуляторных элементов, а также количества и ориентации кассет в конструкциях, были разработаны и трансформированы в клетки кукурузы для создания тысяч объектов, которые были протестированы и проанализированы, что привело к отбору конструкции, применяемой для получения объекта MON 95379; (2) сотни клеток кукурузы были трансформированы конструкцией, применимой для получения объекта MON 95379, создавая популяцию трансгенных растений, в которых каждое растение содержало уникальный трансгенный объект, который был регенерирован и протестирован; (3) последний объект MON 95379 был отобран после тщательного многолетнего процесса отбора объектов, включающего тестирование и анализ молекулярных характеристик, эффективности, экспрессии белка и агрономических свойств при разных генетических фонах; и (4) кассету для селекции глифосатом в объекте кукурузы MON 95379 удаляли посредством *in vivo* Cre-вырезания для создания конечного "безмаркерного" объекта MON 95379. Таким образом, был получен объект кукурузы MON 95379, который был отобран как уникальный превосходный объект, пригодный для целей широкомасштабного применения в агрономии.

Плазмидная ДНК, вставленная в геном объекта кукурузы MON 95379, была охарактеризована при помощи подробного молекулярного анализа. Этот анализ включал: номер вставки (количество сайтов интеграции в геноме кукурузы), местоположение геномной вставки (конкретный сайт в геноме кукурузы, где произошла вставка), количество копий (количество копий Т-ДНК внутри одного локуса), а также целостность вставленной трансгенной ДНК. Подробный молекулярный анализ продемонстрировал, что интегрированная Т-ДНК, содержащая кассеты экспрессии Cry1B.868 и Cry1Ba_7, оставалась интактной после интеграции и Cre-вырезания кассеты для селекции глифосатом (CP4). В контексте данного документа термин "кассета экспрессии" или "кассета" означает молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую комбинацию различных элементов, которые должны экспрессироваться трансформированной клеткой. В табл. 1 представлен список элементов, содержащихся в последовательности SEQ ID NO: 10, последовательности ДНК, которая соответствует объекту кукурузы MON 95379.

Описание объекта кукурузы MON 95379

Элемент	Положение в SEQ ID NO: 10	Описание
5'-фланкирующая последовательность ДНК	1-862	Последовательность ДНК, фланкирующая 5'-конец трансгенной вставки.
Левый граничный участок	863-1044	Участок ДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , содержащий левую граничную последовательность.
LoxP	1080-1114	Последовательность узнавания для сайт-специфичной рекомбиназы из фага <i>Enterobacteria phage P1</i> .
T-Os.LTP:1	1225-1524	3'-нетранслируемая область гена белок-подобного переносчика липидов (LTP) из <i>Oryza sativa</i> (рис).
Cry1B.868	1534-5133	Кодирующая последовательность химерного токсина насекомых, содержащая домены 1 и 2 Cry1Be2, домен 3 Cry1Ca и домен протоксина Cry1Ab3.
I-Zm.UbqM1-1:1:16	5160-6212	Инtron, полученный из гена убквитина 1 <i>Zea mays Mexicana</i> .
L-Zm.UbqM1-1:1:4	6213-6290	5' UTR, полученную из гена убквитина 1 <i>Zea mays Mexicana</i> .
P-Zm.UbqM1-1:1:5	6291-7167	Промотор, полученный из гена убквитина 1 <i>Zea mays Mexicana</i> .
E-FMV.35S-1:1:2	7195-7731	Энхансер 35S гена из вируса мозаики норичника (FMV).
P-SETit.Tip-1:1:1	7743-8659	Промотор гена интегрального белка мембраны тонопласта из <i>Setaria italica</i> (просо итальянское).
L-SETit.Tip-1:1:1	8660-8723	5' UTR гена интегрального белка мембраны тонопласта из <i>Setaria italica</i> (просо итальянское).
I-Os.Act15-1:1:1	8732-10024	Первый инtron гена Actin 15 (Act 15) из <i>Oryza sativa</i> (рис).
Cry1Da_7	10043-13543	Кодирующая последовательность токсина насекомых Cry1Da с аминокислотными модификациями для повышения эффективности.
T-Os.GOS2-1:1:1	13560-14027	3'-нетранслируемая область из гена GOS2, кодирующая фактор инициации трансляции из <i>Oryza sativa</i> (рис).
3'-фланкирующая последовательность	14181-15216	Последовательность ДНК, фланкирующая 3'-конец трансгенной вставки.

Объект кукурузы MON 95379 характеризуется как вставка в единственный локус в геноме кукурузы, приводящая к двум новым локусам или последовательностям соединения (например, последовательностям, указанным в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, и SEQ ID NO: 8) охватывающая часть вставленной ДНК и геномную ДНК кукурузы, о появлении которых неизвестно в естественных условиях, в геноме кукурузы или других трансгенных объектах кукурузы - они уникальны для объекта MON 95379. Эти последовательности соединения пригодны для обнаружения присутствия объекта MON 95379 в клетках кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы и растениях кукурузы или в продуктах из растений кукурузы, таких как товарные продукты из кукурузы. В данном документе описаны молекулярные зонды ДНК и пары праймеров, которые были разработаны для применения в идентификации присутствия этих различных сегментов соединения в биологических образцах, содержащих или предположительно содержащих клетки кукурузы, семена кукурузы, части растений кукурузы или ткань растения кукурузы, которые содержат объект MON 95379.

Образец предназначен для обозначения композиции, которая представляет собой практически чистую ДНК кукурузы или композицию, содержащую ДНК кукурузы. В любом случае образец является биологическим образцом, то есть, он содержит биологические материалы, включая ДНК, полученную

прямо или косвенно из генома объекта кукурузы MON 95379, но не ограничиваясь ими. "Прямо" относится к способности квалифицированного специалиста напрямую получать ДНК из генома кукурузы путем разрушения клеток кукурузы (или путем получения образцов кукурузы, которые содержат разрушенные клетки кукурузы) и экспонирования геномной ДНК для целей обнаружения. "Косвенно" относится к способности квалифицированного специалиста получить целевую или конкретную эталонную ДНК, то есть, новый и уникальный сегмент соединения, описанный в данном документе как диагностический в отношении присутствия объекта MON 95379 в конкретном образце, другими способами, отличными от непосредственного получения ДНК путем разрушения клеток кукурузы или получения образца кукурузы, который содержит разрушенные клетки кукурузы. Такие косвенные пути включают амплификацию сегмента ДНК, который содержит последовательность ДНК, на которую нацелен конкретный зонд, созданный для связывания со специфичностью с последовательностью-мишенью, или амплификацию сегмента ДНК, который можно измерить и охарактеризовать, то есть, измеренный путем отделения от других сегментов ДНК через некоторую эффективную матрицу, такую как агарозный или акриламидный гель или тому подобное, или характеризуемый прямым анализом последовательности ампликонов или клонированием ампликона в вектор и прямым секвенированием вставленного ампликона, присутствующего в таком векторе, но не ограничиваются ими.

Подробный молекулярный анализ продемонстрировал, что объект MON 95379 содержит одну вставку Т-ДНК с одной копией каждой из кассет экспрессии *Cry1B.868* и *Cry1Da_7*. Никаких дополнительных элементов из трансформирующей конструкции, кроме частей левого граничного участка *Agrobacterium tumefaciens*, применяемых для переноса трансгенной ДНК из плазмиды для трансформации растений в геном кукурузы, не было идентифицировано в объекте MON 95379. Наконец, термическая амплификация, дающая специфические ампликоны, диагностического в отношении присутствия объекта MON 95379 в образце, и анализ последовательности ДНК были выполнены для определения произвольно назначенных 5'- и 3'- последовательностей соединения вставки в геном растения, чтобы подтвердить организацию элементов внутри вставки, и определить полную последовательность ДНК вставленной трансгенной ДНК (SEQ ID NO: 9). SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность, представляющую 5-последовательность геномной ДНК кукурузы LH244 из восьмисот шестидесяти двух (862) пар оснований (п.о.), фланкирующую вставленную последовательность Т-ДНК, представленную как SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность, представляющую последовательность 3'-конца геномной ДНК кукурузы LH244 из одной тысячи тридцати шести (1036) пар оснований (и.о.), фланкирующую вставленную последовательность Т-ДНК, представленную как SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность, представляющую 5'-последовательность геномной ДНК кукурузы LH244 из восьмисот шестидесяти двух (862) пар оснований (п.о.), фланкирующую вставленную последовательность Т-ДНК в сочетании с двести девяносто восемью (298) п.о. вставленной последовательности Т-ДНК, представленной как SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность, представляющую сто сорок две (142) п.о. вставленной последовательности Т-ДНК с 3'-последовательностью геномной ДНК кукурузы LH244 из тысячи тридцати шести (1036) п.о., фланкирующей вставленную последовательность Т-ДНК, представленную как SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 10 соответствует объекту кукурузы MON 95379 и содержит непрерывную последовательность (контиг), содержащую 5'-фланкирующую последовательность LH244, вставку трансгена объекта MON 95379 и 3'-фланкирующую последовательность LH244, и, таким образом, содержит последовательности соединения вставки в геном растения.

Если в данном документе не указано иное, термины следует понимать в соответствии с их обычным использованием специалистами в соответствующей области техники. Определения общих терминов в молекулярной биологии можно найти в Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; и Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994, наряду с другими источниками, известными специалистам в данной области техники. В контексте данного документа, термин "кукуруза" означает виды, принадлежащие к роду *Zea*, предпочтительно *Zea mays* и включает все разновидности растений, которые могут быть скрещены с растениями кукурузы, содержащими объект MON 95379, включая дикорастущие виды кукурузы, а также те растения, которые принадлежат к роду *Zea*, которые допускают скрещивание между видами.

Данное изобретение относится к трансгенным растениям, трансформированным конструкцией ДНК, содержащей кассеты экспрессии, экспрессирующие токсические количества инсектицидных белков *Cry1B.868* и *Cry1Da_7*. Под токсичным количеством понимается эффективное количество, инсектицидное количество, инсектицидно-эффективное количество, целевое количество, подавляющее насекомых, эффективное пестицидное количество, количество в рационе насекомых отряда *Lepidoptera*, которое является инсектицидным, и другие аналогичные термины следует понимать в соответствии с их обычным использованием специалистами в соответствующей области техники. Растения кукурузы, трансформированные в соответствии с описанными в данном документе способами и с конструкцией ДНК, устойчивы к насекомым-вредителям *Lepidoptera*.

Трансгенное "растение" получают путем трансформации растительной клетки с гетерологичной ДНК, то есть, конструкцией полинуклеиновой кислоты, которая имеет ряд эффективных характеристик,

представляющих интерес, регенерации растения в результате вставки трансгена в геном клетки растения, и отбора конкретного растения, характеризующегося вставкой в конкретное местоположение генома и количеством эффективных характеристик регенерированного трансгенного растения. Термин "объект" относится к ДНК исходного трансформанта, содержащей вставленную ДНК и фланкирующие геномные последовательности, непосредственно прилегающие к вставленной ДНК. Такая ДНК уникальна, и ожидается, что она будет передана потомству, которое получит вставленную ДНК, включая трансген представляющий интерес, в результате полового скрещивания родительской линии, которая содержит вставленную ДНК (например, исходный трансформант и потомство в результате самоопыления), и родительской линии, не содержащей вставленной ДНК. Данное изобретение также относится к исходному растению-трансформанту и потомству трансформанта, которое содержит гетерологичную ДНК. Такое потомство может быть получено в результате полового ауткросса между растениями, содержащими объект, и другим растением, при этом потомство содержит гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания с рекуррентным родителем объект присутствует в потомстве скрещивания в том же хромосомном местоположении.

В контексте данного документа, термин "рекомбинантный" относится к неприродной ДНК, белку или организму, которые обычно не встречаются в природе и были созданы при помощи вмешательства человека. "Молекула рекомбинантной ДНК" представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые в естественных условиях не встречаются вместе и являются результатом вмешательства человека. Например, молекула ДНК, которая состоит из комбинации по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных друг другу, таких как молекула ДНК, которая содержит трансген, и геномная ДНК растения, прилегающая к трансгену, представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК.

Термины "ДНК" и "молекула ДНК", упомянутые в данном документе, относятся к молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Молекула ДНК может иметь геномное или синтетическое происхождение и обычно идет в направлении от 5' (слева) конца до 3' (справа) конца. В контексте данного документа, термин "последовательность ДНК" относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Условно считается, что последовательности ДНК по изобретению и их фрагменты раскрываются со ссылкой только на одну цепь из двух цепей комплементарной последовательности ДНК. Подразумевается по смыслу и намерению, что комплементарные последовательности представленных в данном документе последовательностей (последовательности комплементарной цепи), также упоминаемые в данной области техники как обратные комплементарные последовательности, находятся в пределах объема изобретения и специально предназначены для того, чтобы быть в пределах объема заявленного предмета изобретения.

В контексте данного документа, термин "фрагмент" относится к меньшей части целого. Например, фрагменты последовательности SEQ ID NO: 10 будут включать последовательности, которые представляют собой по меньшей мере около 12 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 13 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 14 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 15 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 16 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 17 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 18 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 19 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 20 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 25 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 30 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 35 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 40 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 45 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 50 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 60 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 70 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 80 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 90 последовательных нуклеотидов, или по меньшей мере около 100 последовательных нуклеотидов полной последовательности SEQ ID NO: 10.

Ссылка в этой заявке на "изолированную молекулу ДНК" или эквивалентный термин или фразу предназначена для обозначения того, что эта молекула ДНК присутствует сама по себе или в комбинации с другими композициями, но не в ее природном окружении. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, последовательность интрона, нетранслируемая лидерная последовательность, последовательность промотора, последовательность терминации транскрипции и т.п., которые естественным образом обнаруживаются в ДНК генома организма, не считаются "изолированными" до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том местоположении внутри генома, в котором он обнаружен в природе. Однако каждый из этих элементов и подчасти этих элементов будут "изолированы" в рамках объема данного описания, пока элемент не находится в геноме организма и в том местоположении в геноме, в котором он обнаружен в природе. Точно так же нуклеотидная последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет изолированной нуклеотидной последовательностью при условии, что нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, из которой последовательность, кодирующая белок, обнаружена в природе. Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность встречающегося в природе инсектицидного белка, будет считаться

изолированной для целей данного описания. Для целей данного описания любая трансгенная нуклеотидная последовательность, то есть, нуклеотидная последовательность ДНК, вставленная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться изолированной нуклеотидной последовательностью независимо от того присутствует ли она в плазмиде или аналогичной структуре, применяемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии, или присутствует в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из растения или бактерии. В любых обстоятельствах изолированная молекула ДНК представляет собой химическую молекулу, независимо от того, упоминается ли она как нуклеиновая кислота, последовательность нуклеиновой кислоты, полинуклеотидная последовательность и т.п. Это новая молекула по изобретению, которая демонстрирует промышленную применимость как в случае, когда она присутствует в растительной клетке или в геноме растения, так и когда присутствует вне растительной клетки, и, следовательно, проявляет и предназначена для демонстрации такой полезности независимо от того, где находится молекула.

Последовательность ДНК участка, охватывающего соединение посредством связывания фосфодиэфирной связью одного конца трансгенной вставки с фланкирующей последовательностью геномной ДНК кукурузы, называется "соединением". Соединение представляет собой точку соединения трансгенной вставки и фланкирующей последовательности ДНК как одной непрерывной молекулы. Одно соединение находится на 5'-конце трансгенной вставки, а другое находится на 3'-конце трансгенной вставки, упоминаемой в контексте данного документа как соединение 5'-конца и 3'-конца, соответственно. "Последовательность соединения" относится к последовательности ДНК любой длины, которая охватывает соединение 5'-конца или 3'-конца объекта. Последовательности соединения объекта кукурузы MON 95379 очевидны для специалиста в данной области техники с применением последовательности SEQ ID NO: 10. Примеры последовательностей соединения объекта MON 95379 представлены как SEQ ID NO: 1-8. Фиг. 1 иллюстрирует физическое расположение последовательностей соединений, расположенных от 5'-конца до 3'-конца, относительно SEQ ID NO: 10. Последовательности соединения объекта MON 95379 могут присутствовать как часть генома растения, семени или клетки, содержащего объект MON 95379. Идентификация любой одной или более последовательностей соединений в образце растения, части растения, семени или клетки указывает на то, что ДНК была получена из кукурузы, содержащей объект MON 95379, и является диагностическим признаком в отношении присутствия объекта MON 95379.

Последовательности соединения для объекта MON 95379 могут быть представлены последовательностью из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10. Например, последовательности соединений могут быть произвольно представлены нуклеотидными последовательностями, представленными как последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. Альтернативно, последовательности соединения могут быть произвольно представлены нуклеотидными последовательностями, представленными как последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4. Альтернативно, последовательности соединения могут быть произвольно представлены нуклеотидными последовательностями, представленными как последовательности SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6. Альтернативно, последовательности соединения могут быть произвольно представлены нуклеотидными последовательностями, представленными как последовательности SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8. Эти нуклеотиды связаны фосфодиэфирной связью и в объекте кукурузы MON 95379 присутствуют как часть генома рекомбинантной растительной клетки.

Идентификация одной или более из последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10 в образце, полученном из растения кукурузы, семени кукурузы или части растения кукурузы, является диагностическим признаком того, что ДНК была получена из объекта кукурузы MON 95379. Таким образом, изобретение относится к молекуле ДНК, которая содержит по меньшей мере одну из нуклеотидных последовательностей, представленных как последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Любой сегмент ДНК, полученный из трансгенного объекта кукурузы MON 95379, который достаточен для включения по меньшей мере одной из последовательностей, представленных как последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, входит в объем изобретения. Кроме того, любой полинуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную любой из последовательностей, описанных в данном параграфе, находится в пределах объема изобретения.

Изобретение относится к иллюстративным молекулам ДНК, которые можно применять в качестве праймеров или зондов для обнаружения присутствия ДНК, полученной из растения кукурузы, содержащей ДНК объекта MON 95379 в образце. Такие праймеры или зонды специфичны для последовательности нуклеиновой кислоты-мишени и, как таковые, применимы для идентификации последовательности нуклеиновой кислоты объекта кукурузы MON 95379 способами по описанному в данном документе изобретению.

"Зонд" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая комплементарна цепи нуклеи-

новой кислоты-мишени и может применяться в способах гибридизации. Зонд может быть присоединен к обычной обнаруживаемой метке или репортерной молекуле, например, к радиоактивному изотопу, лиганду, хемиллюминесцентному агенту или ферменту. Такой зонд комплементарен цепи нуклеиновой кислоты-мишени и, в случае данного изобретения, цепи ДНК из объекта MON 95379, будь то из растения, содержащего объект MON 95379, или из образца, который содержит ДНК объекта MON 95379. Зонды по данному изобретению содержат не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также полиамиды и другие материалы зонда, которые специфически связываются с последовательностью ДНК-мишени и могут применяться для обнаружения присутствия этой последовательности ДНК-мишени. Иллюстративные последовательности ДНК, применимые в качестве зонда для обнаружения объекта кукурузы MON 95379, представлены как: SEQ ID NO: 17 (PB10269), SEQ ID NO: 23 (PB50340); SEQ ID NO: 26 (PB50138).

"Праймер" обычно представляет собой молекулу ДНК, которая создана для применения в определенных способах отжига или гибридизации, которые включают термическую амплификацию. Пара праймеров может применяться с матричной ДНК (такой как образец геномной ДНК кукурузы) в термической амплификации (такой как полимеразная цепная реакция (ПЦР)) пригодны для получения ампликона, при этом ампликон, полученный в результате такой реакции, будет иметь последовательность ДНК, соответствующую последовательности матричной ДНК, расположенной между двумя сайтами, где праймеры гибридизуются с матрицей.

Праймер обычно создан для гибридизации с комплементарной цепью ДНК-мишени с образованием гибрида между праймером и цепью ДНК-мишени, и присутствие праймера является точкой распознавания полимеразой для начала удлинения праймера (то есть, полимеризации дополнительных нуклеотидов в удлиняющуюся нуклеотидную молекулу) с использованием в качестве матрицы цепи ДНК-мишени. Пары праймеров относятся к применению двух праймеров, связывающих противоположные цепи двухцепочечного нуклеотидного сегмента с целью линейной амплификации полинуклеотидного сегмента между положениями, нацеленными на связывание отдельными членами пары праймеров, обычно в реакции термической амплификации или других стандартных способах амплификации нуклеиновых кислот. Иллюстративные молекулы ДНК, применяемые в качестве праймеров, представлены как SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27.

Пара праймеров SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 применима в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, которая отличается от первой молекулы ДНК, и каждая из них имеет достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве праймеров ДНК, которые при применении вместе в реакции термической амплификации с ДНК-матрицей, полученной из объекта кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, диагностического в отношении ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце. Пара праймеров SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22 применима в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, которая отличается от первой молекулы ДНК, и каждая из них имеет достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве праймеров ДНК, которые при применении вместе в реакции термической амплификации с ДНК-матрицей, полученной из объекта кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, диагностического в отношении зиготности ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце. Пара праймеров SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 применима в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, которая отличается от первой молекулы ДНК, и каждая из них имеет достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве праймеров ДНК, которые при применении вместе в реакции термической амплификации с ДНК-матрицей, полученной из объекта кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, диагностического в отношении зиготности ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце. Пара праймеров SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19 применима в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, которая отличается от первой молекулы ДНК, и каждая из них имеет достаточную длину смежных нуклеотидов локуса в пределах генома кукурузы для функционирования в качестве праймеров ДНК, которые при совместном применении в реакции термической амплификации с матричной ДНК, полученной из объекта кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, который служит внутренним контролем как для диагностики объекта кукурузы MON 95379, так и для зиготности объекта кукурузы MON 95379 ДНК в образце.

ДНК-зонды и ДНК-праймеры обычно имеют длину одиннадцать (11) полинуклеотидов или более, часто восемнадцать (18) полинуклеотидов или более, двадцать четыре (24) полинуклеотида или более или тридцать (30) полинуклеотидов или более. Такие зонды и праймеры выбираются так, чтобы они имели достаточную длину для специфичной гибридизации с последовательностью-мишенью в условиях гибридизации высокой строгости. Предпочтительно зонды и праймеры в соответствии с данным изобретением имеют полное сходство последовательности с последовательностью-мишенью, хотя зонды, отличающиеся от последовательности-мишени, которые сохраняют способность гибридизоваться с последовательностями-мишенями, могут быть созданы обычными способами.

Зонды нуклеиновых кислот и праймеры по данному изобретению гибридизуются в строгих условиях с молекулой-мишенью ДНК. Для идентификации присутствия ДНК из трансгенного растения в образ-

це можно применять любой стандартный способ гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот. Молекулы полинуклеиновой кислоты, также упоминаемые как их сегменты или фрагменты нуклеиновых кислот, способны специфически гибридизоваться с другими молекулами нуклеиновых кислот при определенных обстоятельствах.

В контексте данного описания упоминается, что две молекулы полинуклеиновой кислоты способны специфически гибридизоваться друг с другом, если две молекулы способны образовывать антипараллельную двухцепочечную структуру нуклеиновой кислоты. Упоминается, что молекула нуклеиновой кислоты является "комплементом" другой молекулы нуклеиновой кислоты, если они демонстрируют полную комплементарность. В контексте данного документа, упоминается, что молекулы демонстрируют "полную комплементарность", когда каждый нуклеотид одной из молекул комплементарен нуклеотиду другой. Две молекулы упоминаются как "минимально комплементарные", если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной стабильностью, чтобы позволить им оставаться отожженными друг с другом по меньшей мере в обычных условиях "низкой строгости". Точно так же упоминается, что молекулы являются "комплементарными", если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной стабильностью, чтобы позволить им оставаться отожженными друг с другом в стандартных условиях "высокой строгости". Обычные строгие условия описаны Sambrook et al., 1989, and by Haymes et al., In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Таким образом, отклонения от полной комплементарности допустимы, если такие отклонения не полностью исключают способность молекул образовывать двухцепочечную структуру. Для того чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила праймером или зондом, она должна быть достаточно комплементарной по последовательности, чтобы иметь возможность образовывать стабильную двухцепочечную структуру при конкретных используемых концентрациях растворителя и соли.

В контексте данного описания, практически гомологичная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая будет специфически гибридизоваться с комплементом последовательности нуклеиновой кислоты, с которой ее сравнивают, в условиях высокой строгости. Соответствующие условия строгости, которые способствуют гибридизации ДНК, например, $6,0 \times$ хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при около 45°C с последующей промывкой $2,0 \times$ SSC при 50°C , известны специалистам в данной области техники или могут быть найдены в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Например, концентрация соли на стадии промывки может быть выбрана от низкой строгости при около $2,0 \times$ SSC при 50°C до высокой строгости при около $0,2 \times$ SSC при 50°C . Кроме того, температура на стадии промывки может быть повышена от условий низкой строгости при комнатной температуре, около 22°C , до условий высокой строгости при около 65°C . И температура, и соль могут изменяться, либо температура или концентрация соли могут поддерживаться постоянными, в то время как другая переменная изменяется. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, полинуклеиновая кислота по данному изобретению будет специфически гибридизоваться с одной или более молекулами нуклеиновой кислоты, указанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или их комплементами или их фрагментами в условиях умеренной строгости для например при около при $2,0 \times$ SSC и около 65°C . В особенно предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота по данному изобретению будет специфически гибридизоваться с одной или более молекулами нуклеиновой кислоты, указанными в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или их комплементами или фрагментами в условиях высокой строгости. В одном аспекте данного изобретения, молекула предпочтительной маркерной нуклеиновой кислоты данного изобретения имеет последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8, или SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10, или их комплементы, или их фрагменты. Гибридизация зонда с молекулой-мишенью ДНК может быть обнаружена любым количеством способов, известных специалистам в данной области техники, они могут включать флуоресцентные метки, радиоактивные метки, метки на основе антител и хемилюминесцентные метки, но не ограничиваются ими.

Что касается амплификации последовательности нуклеиновой кислоты-мишени (например, с помощью ПЦР) с использованием конкретной пары праймеров для амплификации, "строгие условия" - это условия, которые позволяют паре праймеров гибридизоваться только с последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени, с которой праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплемент), мог бы связываться и предпочтительно производить уникальный продукт амплификации, ампликон, в реакции термической амплификации ДНК. Термин "специфичный для (последовательности-мишени)" указывает на то, что зонд или праймер гибридизуются в строгих условиях гибридизации только с последовательностью-мишенью в образце, содержащем последовательность-мишень. В контексте данного описания, "амплифицированная ДНК" или "ампликон" относится к продукту способа амплификации полинуклеиновой кислоты, направленного на молекулу-мишень полинуклеиновой кисло-

ты, которая является частью матрицы полинуклеиновой кислоты. Например, чтобы определить, содержит ли растение кукурузы, полученное в результате полового скрещивания, геномную ДНК трансгенного растения из растения кукурузы, содержащего объект MON 95379 по данному изобретению, ДНК, которая экстрагируется из образца ткани растения кукурузы, может быть подвергнута способу амплификации полинуклеиновой кислоты с использованием пары праймеров, которая включает первый праймер, полученный из последовательности геномной ДНК в участке, фланкирующем гетерологичную вставленную ДНК объекта MON 95379, и удлиняется полимеразой с 5'-конца до 3'-конца в направлении вставленной ДНК. Второй праймер получен от гетерологичной вставленной молекулы ДНК, удлиненной полимеразой от 5'-конца до 3'-конца в направлении фланкирующей последовательности геномной ДНК, из которой получен первый праймер. Ампликон может иметь длину от суммарной длины пары праймеров плюс одна пара нуклеотидных оснований, или плюс около пятьдесят пар нуклеотидных оснований, или плюс около двести пятьдесят пар нуклеотидных оснований, или плюс около четырехста пятьдесят пар нуклеотидных оснований, или более. Альтернативно, пара праймеров может быть получена из геномной последовательности по обе стороны от вставленной гетерологичной ДНК, чтобы получить ампликон, который включает всю полинуклеотидную последовательность вставки (например, прямой праймер, выделенный из геномной части на 5'-конце SEQ ID NO: 10 и обратный праймер, выделенный из геномной части на 3'-конце SEQ ID NO: 10, который амплифицирует молекулу ДНК, содержащую вставленную последовательность ДНК (SEQ ID NO: 9), идентифицированную в данном документе в геноме объекта MON 95379). Член пары праймеров, полученный из геномной последовательности растения, смежной со вставленной трансгенной ДНК, расположен на расстоянии от вставленной последовательности ДНК, это расстояние может варьироваться от одной пары нуклеотидных оснований до около двадцати тысяч пар нуклеотидных оснований. Применение термина "ампликон" специально исключает димеры праймеров, которые могут образовываться в реакции термической амплификации ДНК. Для практических целей следует создать праймеры, которые производят ампликоны ограниченного диапазона размеров, например, от 100 до 1000 оснований. Ампликоны меньшего размера (более короткая длина полинуклеотида) в целом более надежно продуцируются в реакциях термической амплификации, позволяют сократить время цикла и могут быть легко разделены и визуализированы на агарозных гелях или адаптированы для применения в конечных точках TAQMAN®-подобных анализов. Меньшие ампликоны могут быть получены и обнаружены способами, известными в области обнаружения ампликонов ДНК. Кроме того, ампликоны, полученные с применением пар праймеров, могут быть клонированы в векторы, размножены, выделены и секвенированы или могут быть секвенированы напрямую способами, хорошо известными в данной области техники. Любая пара праймеров, полученная из комбинации SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 9 или комбинации SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 9, которые применимы в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379 или его потомства, является аспектом изобретения. Любая отдельная изолированная молекула полинуклеотидного праймера ДНК, содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 11, или ее комплемент, которые могут быть применимы в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379 или его потомства, является аспектом изобретения. Любая отдельная изолированная молекула полинуклеотидного праймера ДНК, содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 12, или ее комплемент, которые могут быть применимы в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении растения, содержащего объект MON 95379, или его потомства, является аспектом изобретения. Любая отдельная изолированная молекула полинуклеотидного праймера ДНК, содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 9, или ее комплемент, которые могут быть применимы в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379 или его потомства, является аспектом изобретения.

Амплификацию полинуклеиновой кислоты можно осуществить любым из различных способов амплификации полинуклеиновой кислоты, известных в данной области техники, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Способы амплификации известны в данной области техники и описаны, среди прочего, в патентах США № 4683195 и 4683202 и в PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Способы ПЦР-амплификации были разработаны для амплификации геномной ДНК до 22 т.п.н. (тысяча пар нуклеотидов) и до 42 т.п.н. ДНК бактериофага (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Эти способы, а также другие способы, известные в области амплификации ДНК, могут быть применены в практике данного изобретения. Последовательность вставки гетерологичной ДНК или фланкирующей последовательности геномной ДНК из объекта кукурузы MON 95379 может быть верифицирована (и, при необходимости, исправлена) путем амплификации таких молекул ДНК из семени кукурузы, содержащего ДНК объекта MON 95379, или растений кукурузы, выращенных из семян кукурузы, содержащих ДНК объекта MON 95379, депонированного в АТСС под номером доступа № РТА-125027, с использованием праймеров, полученных из последовательностей, предложенных в данном документе, с последующим стандартным секвенированием ДНК ПЦР-ампликона или его клонированных фрагментов ДНК.

Диагностический ампликон, полученный этими способами, может быть обнаружен множеством

способов. Одним из таких способов является генетический двоичный анализ (Nikiforov, et al. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994), где создан ДНК-олигонуклеотид, который перекрывает как смежную фланкирующую последовательность геномной ДНК, так и вставленную последовательность ДНК. Олигонуклеотид иммобилизуют в лунках микротитровального планшета. После ПЦР интересующего участка (с применением одного праймера во вставленной последовательности и одного в смежной фланкирующей последовательности геномной последовательности) одноцепочечный продукт ПЦР может быть гибридизован с иммобилизованным олигонуклеотидом и служить в качестве матрицы для реакции удлинения одного основания с применением ДНК-полимеразы и меченых дидезоксинуклеотидтрифосфатов (ddNTP), специфичных для ожидаемого следующего основания. Считывание может быть флуоресцентным или основанным на ИФА. Сигнал указывает на присутствие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно основание. Другой способ - это способ пиросеквенирования, описанный Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00:18-24, 2000). В этом способе создается олигонуклеотид, который перекрывает смежную геномную ДНК и вставку соединения ДНК. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом ПЦР из представляющего интерес участка (один праймер во вставленной последовательности и один во фланкирующей последовательности геномной последовательности) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденозина 5'-фосфосульфата и люциферина. DNTP добавляются индивидуально, и их включение дает измеряемый световой сигнал. Световой сигнал указывает на присутствие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно или несколько оснований.

Флуоресцентная поляризация, описанная Chen, et al., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) представляет собой способ, который можно использовать для обнаружения ампликона по данному изобретению. С применением этого способа создается олигонуклеотид, который перекрывает геномную фланкирующую последовательность и вставленное соединение ДНК. Олигонуклеотид гибридизуют с одноцепочечным продуктом ПЦР из представляющего интерес участка (один праймер во вставленной ДНК и один во фланкирующей последовательности геномной ДНК) и инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы и флуоресцентно меченного ddNTP. Удлинение на одно основание приводит к включению ddNTP. Включение можно измерить как изменение в поляризации с помощью флуорометра. Изменение в поляризации указывает на присутствие трансгена/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации и удлинения на одно основание.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени - это возможность отслеживать ход ПЦР по мере его проведения (то есть, в реальном времени). Данные собираются на протяжении всего процесса ПЦР, а не в конце ПЦР. В ПЦР в реальном времени реакции характеризуются моментом времени во время цикла, когда амплификация мишени впервые обнаруживается, а не количеством мишени, накопленным после фиксированного количества циклов. В анализе ПЦР в реальном времени положительная реакция обнаруживается по накоплению флуоресцентного сигнала. Чем выше начальное число копий нуклеиновой кислоты-мишени, тем скорее наблюдается значительное увеличение флуоресценции. Значение порогового цикла (значение Ct) определяется как количество циклов, необходимое для того, чтобы флуоресцентный сигнал пересек пороговое значение (то есть, превысил уровень фона). Уровни Ct обратно пропорциональны количеству нуклеиновой кислоты-мишени в образце (то есть, чем ниже значение Ct, тем больше количество нуклеиновой кислоты-мишени в образце).

Taqman® (PE Applied Biosystems, г. Фостер-Сити, штат Калифорния) описан как способ обнаружения и количественной оценки присутствия последовательности ДНК с использованием ПЦР в реальном времени и полностью понятен в инструкциях, предоставленных производителем. Вкратце, создан олигонуклеотидный зонд FRET, который перекрывает геномную фланкирующую последовательность и вставку соединения ДНК. Зонд FRET и праймеры для ПЦР (один праймер во вставке последовательности ДНК и один во фланкирующей геномной последовательности) циклируются в присутствии термостабильной полимеразы и dNTP. Гибридизация зонда FRET приводит к расщеплению и высвобождению флуоресцентного фрагмента вдали от фрагмента гашения на зонде FRET. Флуоресцентный сигнал указывает на присутствие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Молекулярные маяки были описаны для применения при обнаружении последовательности, как описано в Tuangi, et al. (*Nature Biotech.* 14:303-308, 1996). Вкратце, создан олигонуклеотидный зонд FRET, который перекрывает геномную фланкирующую последовательность и вставку соединения ДНК. Уникальная структура зонда FRET приводит к тому, что он содержит вторичную структуру, которая удерживает флуоресцентный и гасящий фрагменты в непосредственной близости. Зонд FRET и праймеры для ПЦР (один праймер во вставке последовательности ДНК и один во фланкирующей геномной последовательности) циклируются в присутствии термостабильной полимеразы и dNTP. После успешной амплификации ПЦР, гибридизация зонда FRET с последовательностью-мишенью приводит к удалению вторичной структуры зонда и пространственному разделению флуоресцентного и гасящего фрагментов. В результате возникает флуоресцентный сигнал. Флуоресцентный сигнал указывает на присутствие фланкирующей/трансгенной последовательности вставки вследствие успешной амплификации и гибри-

дизации. Наборы для обнаружения ДНК, основанные на способах амплификации ДНК, содержат молекулы праймеров ДНК, которые специфически гибридизуются с ДНК-мишенью и амплифицируют диагностический ампликон в соответствующих условиях реакции. Набор может включать способ обнаружения на основе агарозного геля или любое количество способов обнаружения диагностического ампликона, которые известны в данной области техники. Наборы для обнаружения ДНК могут быть разработаны с использованием описанных в данном документе композиций и могут быть применены для идентификации ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце и могут применяться в способах скрещивания растений кукурузы, содержащих ДНК объекта MON 95379. Набор, содержащий праймеры ДНК, гомологичные или комплементарные любой части геномного участка кукурузы, как указано в SEQ ID NO: 10, и любой части вставленной трансгенной ДНК, как указано в SEQ ID NO: 10, представляет собой объект изобретения. Молекулы ДНК можно применять в способах амплификации ДНК (ПЦР) или в качестве зондов в способах гибридизации полинуклеиновых кислот, то есть, в Саузерн-блоттинге, нозерн-блоттинге. Наборы по данному изобретению могут также необязательно содержать реагенты или инструкции для выполнения описанных в данном документе реакций обнаружения или диагностики.

Зонды и праймеры по данному изобретению могут иметь полную идентичность последовательности с последовательностью-мишенью, хотя праймеры и зонды, отличающиеся от последовательности-мишени, которые сохраняют способность гибридизоваться преимущественно с последовательностями-мишенями, могут быть созданы обычными способами. Для того чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила праймером или зондом, она должна быть достаточно комплементарной по последовательности, чтобы иметь возможность образовывать стабильную двухцепочечную структуру при конкретных используемых концентрациях растворителя и соли. Любой обычный способ гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот может быть использован для идентификации присутствия трансгенной ДНК из объекта кукурузы MON 95379 в образце. Зонды и праймеры обычно имеют длину по меньшей мере около 11 нуклеотидов, по меньшей мере около 18 нуклеотидов, по меньшей мере около 24 нуклеотидов или по меньшей мере около 30 нуклеотидов или более. Такие зонды и праймеры специфически гибридизуются с последовательностью-мишенью ДНК в строгих условиях гибридизации. Обычные строгие условия описаны в Sambrook et al., 1989, и в Naumes et al., In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Любое количество способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, может быть использовано для выделения и манипулирования молекулой ДНК или ее фрагментом, описанным в изобретении, включая способы термической амплификации. Молекулы ДНК или их фрагменты также могут быть получены другими способами, такими как прямой синтез фрагмента химическими средствами, как это обычно практикуется с использованием автоматического синтезатора олигонуклеотидов.

Молекулы ДНК и соответствующие нуклеотидные последовательности, предложенные в данном документе, поэтому полезны, среди прочего, для идентификации объекта кукурузы MON 95379, обнаружения присутствия ДНК, полученной из объекта трансгенной кукурузы MON 95379 в образце, и мониторинга образцов на присутствие и/или отсутствие объекта кукурузы MON 95379 или частей растений, полученных из растений кукурузы, содержащих объект MON 95379. Изобретение относится к растениям кукурузы, клеткам растений кукурузы, семенам кукурузы, частям растений кукурузы (таким как пыльца, семяпочка, пестичные столбики, колос, пыльник, початок, ткань корня, ткань стебля, ткань листа), растениям-потомкам кукурузы и товарным продуктам кукурузы. Эти растения кукурузы, клетки растений кукурузы, семена кукурузы, части растений кукурузы, растения-потомки кукурузы и товарные продукты кукурузы содержат обнаруживаемое количество полинуклеотида по изобретению, например, такого как полинуклеотид, имеющий по меньшей мере одну из последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Растения кукурузы, клетки растений, семена, части растений и растения-потомки по изобретению также могут содержать один или более дополнительных трансгенов. Такой дополнительный трансген может быть любой нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок или молекулу РНК, придающую желаемый признак, включая, повышенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность использования воды, повышенную урожайность, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян и/или повышенную устойчивость к гербицидам, но не ограничиваясь ими. Изобретение относится к растениям кукурузы, клеткам растений кукурузы, семенам кукурузы, частям растений кукурузы (таким как пыльца, семяпочка, пестичные столбики, колос, пыльник, початок, ткани корня, ткани стебля, ткани листьев), растениям-потомкам кукурузы, полученным из трансгенного растения кукурузы, содержащего ДНК объекта MON 95379. Репрезентативный образец семя кукурузы, содержащий ДНК объекта MON 95379, был депонирован в соответствии с Будапештским соглашением с Американской коллекцией типовых культур (ATCC®). Репозиторий ATCC присвоил семени, содержащему ДНК объект MON 95379, с номером указания патентного депонирования РТА-125027.

Изобретение относится к микроорганизму, содержащему молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, присутст-

вующую в его геноме. Примером такого микроорганизма является трансгенная клетка растения. Микроорганизмы, такие как клетка растения по данному изобретению, пригодны для многих промышленных применений, включая: (i) применение в качестве исследовательского инструмента для научных исследований или промышленных исследований; (ii) применение в культуре для получения эндогенных или рекомбинантных углеводов, липидов, нуклеиновых кислот или белковых продуктов или небольших молекул, которые могут применяться для последующих научных исследований или в качестве промышленных продуктов; и (iii) применение с современными способами культивирования тканей растений для получения трансгенных растений или культур тканей растений, которые затем могут быть использованы для сельскохозяйственных исследований или производства, но не ограничиваясь ими. При производстве и применении микроорганизмов, таких как трансгенные клетки растений, используются современные микробиологические способы и вмешательство человека для создания искусственного уникального микроорганизма. В этом процессе рекомбинантная ДНК вставляется в геном клетки растения для создания трансгенной клетки растения, которая является отдельной и уникальной по сравнению со встречающимися в природе клетками растений. Затем эту трансгенную клетку растения можно культивировать так же, как клетки бактерий и дрожжей, используя современные методы микробиологии, и она может существовать в недифференцированном одноклеточном состоянии. Новый генетический состав и фенотип трансгенной клетки растения представляет собой технический эффект, созданный интеграцией гетерологичной ДНК в геном клетки. Другой аспект изобретения представляет собой способ применения микроорганизма по изобретению. Способы использования микроорганизмов по изобретению, таких как трансгенные клетки растения, включают: (i) способы получения трансгенных клеток путем интеграции рекомбинантной ДНК в геном клетки и последующего применения этой клетки для получения дополнительных клеток, обладающих такой же гетерологичной ДНК; (ii) способы культивирования клеток, которые содержат рекомбинантную ДНК, с использованием современных методов микробиологии; (iii) способы получения и очистки эндогенных или рекомбинантных углеводов, липидов, нуклеиновых кислот или белковых продуктов из культивируемых клеток; и (iv) способы применения современных методов культивирования тканей растений с трансгенными клетками растения для получения трансгенных растений или культур трансгенных тканей растений.

Растения по данному изобретению могут передавать потомству ДНК объекта MON 95379, включая трансген, вставленный в объект MON 95379 кукурузы. В контексте данного изобретения, "потомство" включает любое растение, клетку растения, семя и/или регенерируемую часть растения, содержащую ДНК объекта MON 95379, полученную из растения-предка и/или содержащую молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Растения, потомство и семена могут быть гомозиготными или гетерозиготными по трансгену объекта MON 95379. Потомство может быть выращено из семян, полученных от растения, содержащего объект кукурузы MON 95379, и/или из семян, полученных от растения, опыленного пыльцой растения, содержащего объект кукурузы MON 95379.

Растения-потомки можно подвергать самоопылению (также известно как "самооплодотворение") для получения истинной селекционной линии растений, то есть, растений, гомозиготных по трансгену. Самоопыление соответствующего потомства может дать растения, гомозиготные по обоим добавленным экзогенным генам.

Альтернативно, растения-потомки можно подвергать непреднамеренному скрещиванию например, скрещивать с другим неродственным растением, чтобы получить сортовое или гибридное семя или растение. Другое неродственное растение может быть трансгенным или нетрансгенным. Таким образом, сортовое или гибридное семя или растение по изобретению может быть получено половым скрещиванием первого родителя, у которого отсутствует специфичная и уникальная ДНК объекта кукурузы MON 95379, со вторым родителем, содержащим объект кукурузы MON 95379, в результате чего получается гибрид, содержащий специфичную и уникальную ДНК объекта кукурузы MON 95379. Каждый родитель может быть гибридом или инбредным/сортным при условии, что в результате скрещивания или селекции получено растение или семя по изобретению, то есть, семя, имеющее по меньшей мере один аллель, содержащий ДНК объекта кукурузы MON 95379 и/или молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Таким образом, два разных трансгенных растения могут быть скрещены с получением гибридного потомства, которое содержит два независимо сегрегированных, добавленных экзогенных гена. Например, объект MON 95379, содержащий *Cry1B.868* и *Cry1Da_7*, придающие кукурузе устойчивость к насекомым, может быть скрещен с другими трансгенными растениями кукурузы для получения растения, имеющего характеристики обоих трансгенных родителей. Одним из примеров этого может быть скрещивание объекта MON 95379, содержащего *Cry1B.868* и *Cry1Da_7*, придающих устойчивость к *Lepidopteran* кукурузы, с растением, имеющим один или более дополнительных признаков, таких как устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым или устойчивость к засухе, в результате чего получается растение-потомок или семя, которые обладают устойчивостью к насекомым-вредителям *Lepidopteran* и имеют по меньшей мере один

или более дополнительных признаков. Также предполагается обратное скрещивание с родительским растением и непреднамеренное скрещивание с нетрансгенным растением, а также вегетативное размножение. Описания других способов скрещивания, которые обычно используются для разных признаков и культур, можно найти в одной из нескольких ссылок, например, Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Растения, потомство, семена, клетки и части растений по данному изобретению могут также содержать один или более дополнительный признак(ов) кукурузы или трансгенных объектов, в частности, введенных путем скрещивания растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379, с другим растением кукурузы, содержащим дополнительный признак(и) или трансгенные объекты. Такой признак(и) или трансгенные объекты включают, повышенную устойчивость к насекомым, толерантность к гербицидам, повышенную эффективность использования воды, повышенную урожайность, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семени, улучшенное питательное качество, производство гибридного семени или устойчивости к болезни или устойчивость к грибкам, но не ограничиваются ими. Трансгенные объекты кукурузы известны специалистам в данной области техники. Например, список таких признаков предоставляется Службой инспекции здоровья животных и растений (APHIS) Министерства сельского хозяйства США (USDA), и его можно найти на их веб-сайте: www.aphis.usda.gov. Таким образом, два или более трансгенных объекта могут быть объединены в семени-потомке или растении-потомке путем скрещивания двух родительских растений, каждое из которых содержит один или более трансгенных объектов, сбора семени-потомка и отбора семени-потомка или растений-потомков, которые содержат два или более трансгенных объекта. Эти шаги можно повторять до тех пор, пока не будет достигнута желаемая комбинация трансгенных объектов в потомстве. Также предполагается обратное скрещивание с родительским растением и непреднамеренное скрещивание с нетрансгенным растением, а также вегетативное размножение.

Изобретение относится к части растения, полученной из растений кукурузы, содержащих объект MON 95379. В контексте данного документа, термин "часть растения" относится к любой части растения, которая состоит из материала, полученного из растения кукурузы, содержащего объект MON 95379. Части растения включают пыльцу, семяпочки, пестичные столбики, колос, пыльник, початок, ткань корня, ткань стебля и ткань листа, но не ограничиваются ими. Части растений могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми и/или нерегенерируемыми.

Изобретение относится к товарному продукту, полученному из растений кукурузы, содержащих объект MON 95379, и который содержит определяемое количество нуклеиновой кислоты, специфичной для объекта MON 95379. В контексте данного документа, термин "товарный продукт" относится к любой композиции или продукту, который состоит из материала, полученного из растения кукурузы, цельного или переработанного зерна кукурузы, или одной или более клеток растения и/или частей растения, содержащих ДНК объекта кукурузы MON 95379. Нежизнеспособные товарные продукты включают, нежизнеспособные семена, целые или обработанные семена, части семени и части растений; корм для животных, содержащий кукурузу, кукурузное масло, кукурузную муку грубого помола, кукурузную муку, кукурузные хлопья, кукурузные отруби, макаронные изделия из кукурузы, кукурузную биомассу и топливные продукты, полученные с использованием кукурузы и ее частей, но не ограничиваются ими. Жизнеспособные товарные продукты включают, семена, растения и клетки растения, но не ограничиваются ими. Таким образом, растения кукурузы, содержащие объект MON 95379, можно использовать для производства любого товарного продукта, обычно получаемого из кукурузы. Любой такой товарный продукт, полученный из растений кукурузы, содержащих объект MON 95379, может содержать по меньшей мере обнаруживаемое количество специфичной и уникальной ДНК, соответствующей объекту кукурузы MON 95379, и, в частности, может содержать обнаруживаемое количество полинуклеотида, содержащего молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Можно использовать любой стандартный способ обнаружения нуклеотидных молекул, включая описанные в данном документе способы обнаружения. Товарный продукт входит в объем изобретения, если существует какое-либо обнаруживаемое количество молекулы ДНК, имеющей по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 в товарном продукте. Растения кукурузы, клетки растений кукурузы, семена кукурузы, части растений кукурузы (такие как пыльца, семяпочка, пестичные столбики, колос, пыльник, початок, ткань корня, ткань стебля, ткань листа), растения-потомки кукурузы и товарные продукты по данному изобретению следовательно, полезны, среди прочего, для выращивания растений с целью получения семени и/или частей растений, содержащих объект кукурузы MON 95379 для сельскохозяйственных целей, для получения потомства, содержащего объект кукурузы MON 95379 для селекции растений и использование с микробиологическими методами для промышленных и исследовательских целей, а также для продажи потребителям.

Предоставлены способы получения устойчивого к насекомым растения кукурузы, содержащего последовательности ДНК, специфичные и уникальные для объекта MON 95379 по изобретению. Трансген-

ные растения, используемые в этих способах, могут быть гомозиготными или гетерозиготными по трансгену. Растения-потомки, полученные этими способами, могут быть сортовыми или гибридными растениями; могут быть выращены из семян, полученных от растения, содержащего объект кукурузы MON 95379, и/или из семян, полученных от растения, опыленного пыльцой растения, содержащего объект кукурузы MON 95379; и могут быть гомозиготными или гетерозиготными по трансгену. Растения-потомки могут быть впоследствии подвергнуты самоопылению для создания истинной селекционной линии растений, то есть, растений, гомозиготных по трансгену, или, альтернативно, может быть произведено непреднамеренное скрещивание, например, скрещивание с другим неродственным растением, для получения сортового или гибридного семени или растения.

Представлены способы обнаружения присутствия ДНК, полученной из клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379, в образце. Один способ состоит из: (i) извлечения образца ДНК по меньшей мере из одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК по меньшей мере с одним праймером, который способен продуцировать последовательность ДНК, специфичную для ДНК объекта MON 95379, в условиях, подходящих для секвенирования ДНК; (iii) выполнение реакции секвенирования ДНК; и затем (iv) подтверждение того, что нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, специфичную для объекта MON 95379, конструкции, содержащейся в ней, например, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Другой способ состоит из: (i) извлечения образца ДНК по меньшей мере из одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК с парой праймеров, которая способна продуцировать ампликон из ДНК объекта MON 95379 в условиях, подходящих для амплификации ДНК; (iii) проведение реакции амплификации ДНК; и затем (iv) обнаружение молекулы ампликона и/или подтверждение того, что нуклеотидная последовательность ампликона содержит нуклеотидную последовательность, специфичную для объекта MON 95379, например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Ампликон должен быть специфичным для объекта MON 95379, таким как ампликон, содержащий SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8, или SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10. Обнаружение нуклеотидной последовательности, специфичной для объекта MON 95379 в ампликоне, является определяющим и/или диагностическим в отношении присутствия ДНК, специфичной для объекта MON 95379 кукурузы в образце. Пример пары праймеров, способной продуцировать ампликон из ДНК объекта MON 95379 в условиях, подходящих для амплификации ДНК, представлен как SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16. Другие пары праймеров могут быть легко созданы специалистом в данной области техники и могут дать ампликон, содержащий SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 8, при этом такая пара праймеров содержит по меньшей мере один праймер в геномном участке, фланкирующем вставку, и второй праймер во вставке. Другой способ обнаружения присутствия ДНК, полученной из клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379 в образце, состоит из (i) извлечения образца ДНК по меньшей мере из одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК с ДНК-зондом, специфичным для ДНК объекта MON 95379; (iii) позволяя зонду и образцу ДНК гибридизоваться в строгих условиях гибридизации; и затем (iv) обнаружение гибридизации между зондом и образцом ДНК-мишени. Пример последовательности ДНК-зонда, которая специфична для объекта MON 95379, представлен как SEQ ID NO: 17. Другие зонды могут быть легко созданы специалистом в данной области техники, и они будут содержать по меньшей мере один фрагмент геномной ДНК, фланкирующий вставку, и по меньшей мере один фрагмент ДНК вставки, такой как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 10. Обнаружение гибридизации зонда с образцом ДНК является диагностическим признаком присутствия в образце ДНК, специфичной для объекта кукурузы MON 95379. В качестве альтернативы отсутствие гибридизации является диагностическим признаком отсутствия ДНК, специфичной для объекта кукурузы MON 95379 в образце.

Представлены наборы для обнаружения ДНК, которые можно использовать для идентификации ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, и также можно применять в способах скрещивания растений кукурузы, содержащих соответствующую ДНК объекта. Такие наборы содержат праймеры ДНК и/или зонды, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Один пример такого набора содержит по меньшей мере одну молекулу ДНК с достаточной длиной непрерывных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве ДНК-зонда, пригодного для обнаружения присутствия и/или отсутствия ДНК, полученной из трансгенных растений кукурузы, содержащих объект MON 95379, в образце. ДНК, полученная из трансгенных растений кукурузы, содержащих объект MON 95379, будет

содержать молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Представлена молекула ДНК, достаточная для применения в качестве ДНК-зонда, которая может применяться для определения, обнаружения или диагностики присутствия и/или отсутствия ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, представлена как SEQ ID NO: 17. Другие зонды могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники и должны содержать по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39 или по меньшей мере 40 смежных нуклеотидов из SEQ ID NO: 10 и быть достаточно уникальными для ДНК объекта кукурузы MON 95379, чтобы идентифицировать ДНК, полученную из этого объекта.

Другой тип набора содержит пару праймеров, пригодных для получения ампликона, пригодного для обнаружения присутствия и/или отсутствия ДНК, полученной из трансгенного объекта кукурузы MON 95379 в образце. В таком наборе может использоваться способ, включающий приведение в контакт образца ДНК-мишени с парой праймеров, как описано в данном документе, затем выполнение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, достаточной для получения ампликона, содержащего молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, а затем обнаружение присутствия и/или отсутствия ампликона. Такой способ может также включать секвенирование ампликона или его фрагмента, которое будет определять, то есть, диагностировать присутствие ДНК, специфичной для объекта кукурузы MON 95379, в образце ДНК-мишени. Другие пары праймеров могут быть легко созданы специалистом в данной области техники и должны содержать по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29 или по меньшей мере 30 смежных нуклеотидов последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, но не ограничиваясь ими, и быть достаточно уникальными для ДНК объекта кукурузы MON 95379, чтобы идентифицировать ДНК, полученную из объекта. Наборы и способы обнаружения по изобретению пригодны, среди прочего, для идентификации объекта кукурузы MON 95379, выбора сортов растений или гибридов, содержащих объект кукурузы MON 95379, обнаружения присутствия ДНК, полученной из трансгенного растения кукурузы, содержащего объект MON 95379 в образце, и мониторинг образцов на присутствие и/или отсутствие растений кукурузы, содержащих объект MON 95379, или частей растений, полученных из растений кукурузы, содержащих объект MON 95379.

Последовательности вставки гетерологичной ДНК, последовательности соединения или фланкирующей последовательности из объекта кукурузы MON 95379 можно верифицировать (и при необходимости скорректировать) путем амплификации таких последовательностей из объекта с использованием праймеров, полученных из последовательностей, представленных в данном документе, с последующим стандартным секвенированием ДНК ампликона или клонированной ДНК. Представлены способы обнаружения зиготности трансгенного аллеля ДНК, полученной из клетки кукурузы, ткани кукурузы, семян кукурузы или растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379 в образце. Один способ состоит из: (i) извлечения образца ДНК из по меньшей мере одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК с парой праймеров, способной продуцировать первый ампликон, диагностический для объекта MON 95379; (iii) приведение в контакт образца ДНК с парой праймеров, способной давать второй ампликон, диагностический для геномной ДНК нативной кукурузы, не содержащей объекта MON 95379; (iv) проведение реакции амплификации ДНК; и затем (v) обнаружение ампликонов, при этом присутствие только первого ампликона является диагностическим признаком гомозиготного объекта ДНК MON 95379 в образце, а присутствие как первого ампликона, так и второго ампликона является диагностическим признаком растения кукурузы, гетерозиготного по аллелю объекта MON 95379. Иллюстративный набор пар праймеров представлен как SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, которые обеспечивают ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379; и SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 27, которые обеспечивают ампликон, диагностический для невставленной геномной ДНК кукурузы дикого типа, не содержащей объект MON 95379. Набор зондов также может быть включен в такой способ амплификации для применения в формате ПЦР в реальном времени с применением наборов пар праймеров, описанных выше. Иллюстративный набор зондов представлен как SEQ ID NO: 17 (диагностический в отношении ампликона для объекта MON 95379) и SEQ ID NO: 28 (диагностический в отношении ампликона для геномной ДНК кукурузы дикого типа, не содержащей объекта MON 95379).

Другой способ определения зиготности состоит из: (i) извлечения образца ДНК по меньшей мере из одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК с набором зондов, который содержит по меньшей мере первый зонд, который специфически гибридизуется с ДНК объекта MON 95379, и по меньшей мере второй зонд, который специфически гибридизуется с геномной ДНК кукурузы, которая была нарушена вставкой гетерологичной ДНК объекта MON 95379 и не гибридизуется с ДНК объекта MON 95379; (iii) гибридизацию набора зондов с образцом в строгих условиях гибридизации, при этом обнаружение гибридизации только первого зонда в условиях гибридизации является диагностическим в отношении гомозиготного аллеля ДНК объекта MON 95379 в образце; и при этом обнаружение гибридизации как первого зонда, так и второго зонда в условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении гетерозиготного аллеля объекта MON 95379 в образце ДНК. Еще один способ определения зиготности состоит из (i) извлечения образца ДНК по меньшей мере из одной клетки кукурузы, ткани кукурузы, семени кукурузы или растения кукурузы; (ii) приведение в контакт образца ДНК с парой праймеров, которая способна продуцировать ампликон одной из последовательностей, кодирующих токсин, кодирующих Cry1B.868 или Cry1Da_7; (iii) приведение в контакт образца ДНК с парой праймеров, способной продуцировать ампликон внутреннего стандарта, который, как известно, является однокопийным и гомозиготным в растении кукурузы; (iv) приведение в контакт образца ДНК с набором зондов, который содержит по меньшей мере первый зонд, который специфически гибридизуется с одной из последовательностей, кодирующих токсин, кодирующих Cry1B.868 или Cry1Ba_7, и по меньшей мере второй зонд, который специфически гибридизуется с внутренним стандартом геномной ДНК, который, как известно, является однокопийным и гомозиготным в растении кукурузы; (v) проведение реакции амплификации ДНК с применением ПЦР в реальном времени и определение значений пороговых циклов (значений Ct) ампликона, соответствующего последовательности, кодирующей токсин, и гомозиготному однокопийному внутреннему стандарту; (vi) вычисление разницы (ΔCt) между значением Ct однокопийного гомозиготного ампликона внутреннего стандарта и значением Ct ампликона последовательности, кодирующей токсин; и (vii) определение зиготности, где ΔCt около нуля (0) указывает на гомозиготность вставленной Т-ДНК, а ΔCt около единицы (1) указывает на гетерозиготность вставленной Т-ДНК. Гетерозиготные и гомозиготные объекты различаются единицей значения ΔCt равной приблизительно единице (1). Учитывая нормальную изменчивость, наблюдаемую при ПЦР в реальном времени из-за множества факторов, таких как эффективность амплификации и идеальные температуры отжига, диапазон "около единицы (1)" определяется как ΔCt от 0,75 до 1,25. Пары праймеров и зонды для вышеуказанного способа определения зиготности могут либо амплифицировать и обнаруживать ампликоны из кодирующей последовательности Cry1B.868 и внутреннего стандарта, либо амплифицировать и обнаруживать ампликоны из кодирующей последовательности Cry1Da_7 и внутреннего стандарта. Иллюстративные пары праймеров для обнаружения ампликонов, соответствующих кодирующей последовательности Cry1B.868 и внутреннему стандарту, представлены как SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 (внутренний стандарт) и SEQ ID NO: 21 в сочетании с SEQ ID NO: 22 (Cry1B.868). Сопутствующие иллюстративные зонды представлены как SEQ ID NO: 20 (внутренний стандарт) и SEQ ID NO: 23 (Cry1B.868). Иллюстративные пары праймеров для обнаружения ампликонов, соответствующих кодирующей последовательности Cry1Ba_7 и внутреннему стандарту, представлены как SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 (внутренний стандарт) и SEQ ID NO: 24 в сочетании с SEQ ID NO: 25 (Cry1Da_7). Сопутствующие иллюстративные зонды представлены как SEQ ID NO: 20 (внутренний стандарт) и SEQ ID NO: 26 (Cry1Ba_7).

Информация о депонировании.

Депонирование репрезентативного образца семени кукурузы, содержащего объект MON 95379, было произведено 20 апреля 2018 года в соответствии с Будапештским соглашением с Американской коллекцией типовых культур (ATCC), имеющей адрес 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, почтовый индекс 20110, и ему был присвоен регистрационный номер ATCC PTA-125027. Доступ к депонированиям будет доступен во время рассмотрения заявки, предоставленной Уполномоченному по патентам и товарным знакам и лицам, определенным Уполномоченным как имеющие на это право по запросу. После выдачи патента все ограничения на доступность для общественности будут безвозвратно сняты.

Депонирование будет храниться в депозитории в течение тридцати (30) лет, или пяти (5) лет после последнего запроса, или в течение срока действия патента, в зависимости от того, что дольше, и будет заменяться по мере необходимости в течение этого срока.

Примеры

Следующие ниже примеры включены для более полного описания изобретения. Подведены итоги создания и тестирования ста двадцати пяти (125) конструкций, создания около десяти тысяч семисот восьмидесяти пяти (10785) объектов (как доказательств концепции, так и коммерческих) и анализа сотен тысяч отдельных растений в течение шести (6) лет посредством строгих молекулярных, агрономических и полевых испытаний, необходимых для создания и отбора объекта кукурузы MON 95379.

Примеры демонстрируют некоторые предпочтительные варианты осуществления данного изобре-

тения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, описанные в примерах, которые следуют ниже, представляют подходы, которые, по мнению изобретателей, хорошо работают при практическом применении изобретения, и, таким образом, их можно рассматривать как примеры предпочтительных способов их применения. Однако специалисты в данной области техники должны, в свете данного описания, принять во внимание, что многие изменения могут быть внесены в конкретные описанные варианты осуществления данного изобретения и все же можно получить подобный или аналогичный результат, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

Пример 1. Тестирование кассет экспрессии, создание конструкции, тестирование растения и выбор конструкции.

На экспрессию трансгена в растениях влияет множество различных факторов. Должна быть найдена правильная комбинация инсектицидных белков и различных элементов экспрессии, управляющих экспрессией у растений, но не приводящих к отклонениям от фенотипа. Кроме того, помимо самих элементов экспрессии, их комбинации и ориентации в кассете, на экспрессию трансгенов в растениях, как известно, влияет положение хромосомной вставки, возможно, из-за структуры хроматина (например, гетерохроматина) или близости регуляторных элементов транскрипции (например, энхансеров) рядом с сайтом интеграции (Kurt Weising et al., (1988) *Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications*. *Annu. Rev. Genet.* 22: 421-77). Например, у растений и у других организмов наблюдалось, что уровни экспрессии введенного гена из одной и той же конструкции могут сильно варьироваться среди объектов с разными положениями хромосомной вставки. Различные положения хромосомных вставок могут также вызывать различия в пространственных или временных паттернах экспрессии, которые могут не соответствовать паттернам, ожидаемым от регуляторных элементов транскрипции, присутствующих во введенной генной конструкции.

По этим причинам часто необходимо создавать и проверять большое количество конструкций и событий трансформации, чтобы идентифицировать конструкцию, а затем объект, который демонстрирует оптимальную экспрессию введенных представляющих интерес генов, но при этом не дает агрономических или фенотипических нетипичных типов.

По этим причинам разработка трансгенного растения кукурузы, содержащего инсектицидные белки, которые были активны против *Lepidopterans* без какого-либо отрицательного влияния на агрономические признаки, урожайность или успешность пирамидирования, потребовала обширных исследований, разработок и анализа. В частности, в течение шести (6) лет были созданы, протестированы и проанализированы приблизительно десять тысяч семьсот восемьдесят пять (10785) доказательств концепции и коммерческих трансгенных объектов, полученных из ста двадцати пяти (125) различных конструкций плазмидных векторов.

В этом примере описывается создание и тестирование ста двадцати пяти (125) различных конструкций на растениях кукурузы для определения предпочтительной конструкции для создания объекта. Каждая конструкция различалась в отношении кодирующих последовательностей инсектицидных белков и регуляторных элементов транскрипции. Было проведено тестирование, чтобы выбрать лучшую конструкцию для использования в экспрессии инсектицидных белков в растениях. Каждая конструкция имела уникальную конфигурацию, которая варьировалась в зависимости от состава кассеты экспрессии (как инсектицидных белков, так и элементов экспрессии), ориентации и того, были ли белки нацелены на хлоропласт.

В первоначальном доказательстве концепции и стадии развития сто семнадцать (117) конструкций, содержащих различные комбинации из двадцати шести (26) отдельных промоторов, двадцати шести (26) отдельных интронов и десяти (10) отдельных последовательностей, кодирующих токсин насекомых, были использованы для генерации приблизительно шести тысяч (6000) трансформированных объектов.

После первоначальной молекулярной характеристики на присутствие трансгена(ов) были отобраны пять тысяч пятьдесят два (5052) однокопийных и двухкопийных трансформированных объектов кукурузы для дальнейшей характеристики и тестирования эффективности. Эти объекты оценивали по фенотипическим или агрономическим нетипичным типам, уровню экспрессии белков токсинов насекомых и эффективности против выбранных видов насекомых-вредителей *Lepidopteran*. Полученные в результате данные об эффективности и экспрессии белков вместе с любой информацией, касающейся фенотипических и агрономических нетипичных типов, были использованы для устранения неэффективных белков, элементов экспрессии и комбинаций и были использованы для создания меньшего числа коммерческих бинарных плазмидных конструкций для трансформации, которые будут использоваться в следующем этапе разработки.

На следующем этапе разработки были созданы восемь (8) новых конструкций. Эти конструкции содержали комбинации от двух (2) до четырех (4) кассет экспрессии трансгена токсина насекомых в различных ориентациях (конвергентных или расходящихся). Эти восемь (8) конструкций использовали для генерации в общей сложности пяти тысяч семисот тридцати трех (5733) трансформированных объектов (также называемых "трансформантами"). После формирования побегов в культуре на основании визуальных характеристик и раннего молекулярного анализа отбирали подмножество трансформированных объектов. Всего было отобрано восемьсот двадцать три (823) трансформированных объекта, пересажен-

ных в горшки и выращенных для дальнейшего изучения.

Полученные трансформированные объекты поколения R_0 анализировали на эффективность против выбранных видов *Lepidopteran*, экспрессию белка токсина, здоровье растений, возврат семян, а также фенотипические и агрономические нетипичные типы. Поколение R_0 объектов также были охарактеризованы на молекулярном уровне, чтобы гарантировать целостность кассеты и правильную вставку в геном кукурузы. Многие объекты были исключены из тестирования из-за невозможности пройти агрономический анализ и тестирование молекулярных характеристик. Кроме того, одна (1) из восьми (8) конструкций была исключена из дальнейшего исследования на этой стадии R_0 , потому что она производила объекты с нетипичными фенотипами. В дополнение к этим агрономическим проблемам, более поздние проведенные исследования механизма действия ("МОА") продемонстрировали, что белок токсина насекомых, содержащийся в этой конструкции, продемонстрировал перекрытие МОА с коммерчески доступным белком. Исследования механизма действия проводились на одном из белков насекомых, общих для четырех (4) из восьми (8) конструкций. Эти исследования продемонстрировали, что этот белок насекомых имеет перекрывающийся МОА с коммерчески доступным белком. Белки, которые демонстрируют аналогичный или перекрывающийся МОА с используемым в данное время коммерческим инсектицидным белком, нежелательны из-за развития устойчивости, которая может сделать белок с аналогичным МОА неэффективным против популяций насекомых. Таким образом, эти четыре (4) конструкции и полученные при помощи них объекты были исключены. Как отмечалось ранее, одна (1) из четырех (4) исключенных конструкций также продуцировала объекты с нетипичными фенотипами на стадии R_0 . На следующем этапе разработки сто пятьдесят (150) объектов, полученных из оставшихся четырех (4) конструкций, были дополнительно оценены в поколении F_1 (гетерозиготный гибрид)/ R_1 (гомозиготный инбред) и R_2 на эффективность, возврат семян и сегрегацию, фенотипические и агрономические нетипичные типы и дальнейшую молекулярную характеристику. Две (2) конструкции из оставшихся четырех (4) конструкций были исключены из дальнейшего исследования на этой стадии из-за несоответствия одному или более критериям для продвижения, оставив объекты, полученные при помощи (2) конструкций, для дальнейшей оценки. Семьдесят семь (77) объектов, сорок одно (41) получено из конструкции, используемой для генерации объекта MON 95379 ("Конструкция MON95"), и тридцать шесть (36) объектов, полученных из другой конструкции ("Конструкция 1"), были оценены как инбриды R_2 и гибриды F_1 по эффективности, возвращению семян и сегрегации, фенотипическим и агрономическим нетипичным типам и дальнейшей молекулярной характеристике. Основываясь на результатах этих оценок, объекты, связанные с Конструкцией 1, были де-приоритизированы, отложены и сохранены. Таким образом, многочисленные раунды тестирования и сравнения различных конструкций показали, что кассета трансгена, представленная как SEQ ID NO: 13, Конструкция MON95, была лучшим вариантом в отношении эффективности против насекомых-вредителей *Lepidopteran* видов осенней совки (FAW, *Spodoptera frugiperda*), совки кукурузной (CEW, *Helicoverpa zea*), огнёвки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*), огнёвки сахарного тростника (SCB, *Diatraea saccharalis*), и малого кукурузного мотылька (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*), с лучшими молекулярными характеристиками и агрономическими характеристиками. Табл. 2 иллюстрирует количество полученных трансформированных объектов ("Трансформированные"), количество трансформированных объектов, выбранных для роста как объекты R_0 ("Пересаженные"), и точки, в которых каждая соответствующая конструкция была исключена в процессе оценки, исследования и разработки, что привело к выбору Конструкции MON95.

Таблица 2

Выбор конструкции объекта

Конструкция	Трансформированные	Пересаженные	Исключено
Конструкция MON 95	1202	210	
Конструкция 1	799	173	Отложенные на основе данных R_2 и F_1
Конструкция 2	679	113	$R_2/F_1/R_1$
Конструкция 3	1344	20	МОА/ R_0
Конструкция 4	232	41	$R_2/F_1/R_1$
Конструкция 5	544	88	МОА
Конструкция 6	584	95	МОА
Конструкция 7	349	83	МОА

Пример 2. Полевые испытания, молекулярное тестирование и отбор объектов.

В этом примере описывается молекулярная характеристика, анализ и тестирование в полевых испытаниях объектов, созданных с помощью Конструкции MON95 в нескольких местоположениях в течение нескольких лет, которые привели к выбору финального объекта, MON 95379.

В табл. 3 показан процесс, применяемый для выбора финального объекта, MON 95379. Во время скрининга трансформантов R₀ были получены двести десять (210) трансформированных объектов R₀ из Конструкции MON95 и отобраны для роста. Из начальных двухсот десяти (210) выбранных трансформированных объектов R₀ сто сорок семь объектов (147) были исключены из-за опасений, касающихся эффективности, экспрессии белка, возврата семян и здоровья растений или молекулярных характеристик. Осталось шестьдесят три (63) объекта для анализа и тестирования на следующем этапе разработки, на стадии скрининга F₁ и на стадии питомника R₁. На этой стадии одиннадцать (11) объектов были исключены из-за проблем с эффективностью тепличных испытаний. Еще три (3) объекта были исключены из-за недостаточного возврата семян из питомника и/или анализа сегрегации полученного семени. Наконец, еще пять (5) объектов были удалены из-за проблем, обнаруженных в молекулярных характеристиках, и три (3) объекта были удалены из-за проблем, обнаруженных в молекулярном Саузерн-блоттинге, оставив сорок один (41) объект для анализа в следующем поколении. На стадии тестирования R₂/F₁ два (2) из оставшихся сорока одного (41) объекта были исключены из-за проблем, обнаруженных при дальнейшем определении молекулярных характеристик методом, Саузерн-блоттинга, и осталось тридцать девять (39) объектов.

Для остальных тридцати девяти (39) объектов выполняли две различные параллельные стадии тестирования: 1) дальнейшие полевые испытания; и 2) Sge-вырезание кассеты для селекции и производство семян золотого стандарта. Объекты исключали на каждой из этих одновременных параллельных стадий тестирования. Во время Sge-вырезания одиннадцать (11) объектов были исключены из-за проблем, обнаруженных в молекулярных характеристиках после sge-вырезания кассеты для селекции глифосатом. Кроме того, еще шесть (6) объектов были исключены из-за проблем, обнаруженных в молекулярных характеристиках при производстве семян золотого стандарта.

Во время одновременных полевых испытаний, основанных на данных, собранных в полевых испытаниях в 2016 г. в США, еще четыре (4) объекта были исключены из-за проблем с эффективностью, а еще двенадцать (12) объектов были исключены из-за агрономических проблем. Затем, на основании данных, собранных в ходе полевых испытаний в Бразилии, еще один объект был исключен из-за проблем с эффективностью. Затем биоинформатический анализ, проведенный во время полевых испытаний в 2017 г., в США, привел к исключению еще трех (3) объектов из дальнейшего тестирования, в результате чего остались два объекта: объект 1 и MON 95379. После дальнейшего анализа агрономии объектов из нескольких полевых испытаний в США, Бразилии, Аргентине и Пуэрто-Рико, объект MON 95379 был выбран в качестве объекта для коммерциализации, поскольку он имел более высокий рейтинг, чем объект 1, если для каждого объекта сравнивали молекулярные характеристики, экспрессию белка, эффективность и агрономию.

Селекция объекта MON 95379

			Оставшиеся объекты
Стадия	Анализ	Исключенные объекты	210
Комм. Скрининг TFN R₀	Эффективность	21	63
	Экспрессия	6	
	Возврат семян/здоровье растений	51	
	Молекулярная характеристика	69	
R₁/F₁	Эффективность в теплице	11	41
	Молекулярная характеристика	5	
	Возврат в питомник/сегрегация	3	
	Молекулярный Саузерн-блоттинг	3	
R₂/F₁	Молекулярный Саузерн-блоттинг	2	39
Сге-вырезание	Молекулярная характеристика после вырезания CP4	11	28
Семя золотого стандарта	Молекулярная характеристика	6	22
Поле в США в 2016 г.	Эффективность	4	6
	Агрономия	12	
Поле в Бразилии	Эффективность	1	5
Поле в США в 2017 г.	Биоинформатический молекулярный анализ	3	2
Коммерческий отбор	Дальнейший анализ молекулярных характеристик, экспрессии белка, эффективности и агрономии на основе множественных полевых испытаний	1	MON 95379

Пример 3. Сге-вырезание кассеты для селекции глифосатом в объекте кукурузы MON 95379.

В этом примере описано удаление кассеты для селекции глифосатом из объекта кукурузы MON 95379 посредством Сге-вырезания *in vivo*. Кассету для селекции глифосатом использовали для отбора трансформированных объектов. Путем удаления кассеты для селекции был создан "безмаркерный" объект, при этом в финальном объекте остались только кассеты экспрессии инсектицидного белка. На фиг. 3 показан процесс скрещивания, использованный для создания безмаркерного объекта кукурузы MON 95379. Незрелые зародыши кукурузы сорта LH244 трансформировали с применением *Agrobacterium*-опосредованного процесса трансформации с Конструкцией MON95 (представленной как SEQ ID NO: 13 и проиллюстрированной на фиг. 2). Конструкция MON95 содержит три (3) кассеты экспрессии: две (2) кассеты для экспрессии инсектицидных белков *Cry1B.868* и *Cry1Ba_7* и одну кассету, применяемую для селекции трансформированных клеток растений с применением селекции глифосатом. Кассета для селекции была фланкирована с обеих сторон сайтами узнавания *LoxP* Сге-рекомбиназы. После трансформации трансформанты R₀ подвергали самоопылению в течение двух (2) поколений, в течение которых многие объекты были исключены на основании различных анализов, таких как эффективность, экспрессия белка, возврат семян и здоровье растений, а также молекулярной характеристики. К поколению R₂ осталось тридцать девять (39) объектов от начальных двухсот десяти (210) объектов. Тридцать девять (39) гомозиготных объектов поколения R₂ были скрещены с элитной линией трансформированных растений кукурузы, экспрессирующей фермент Сге-рекомбиназу, полученный из фага *Enterobacteria P1*.

Эта стадия, на которой объекты поколения R₂ были скрещены с растениями, экспрессирующими Сге-рекомбиназу, идентифицирована как "Сге скрещивание". В частности, на этой стадии растения поколения R₂ без метелки (женские), гомозиготные по SEQ ID NO: 13, подвергали перекрестному опылению с трансгенными растениями кукурузы (мужскими), гомозиготными по кассете трансгена, используемой для экспрессии фермента Сге-рекомбиназы. Сге-рекомбиназа, экспрессируемая мужской донорской пыльцой, после осадения на ткань пестичных столбиков женского растения, содержащего SEQ ID NO: 13. Когда пыльцевая трубка входит в зародышевый мешок, пыльцевая трубка разрывается, высвобождая

два сперматозоида донора мужской особи, экспрессирующего Cre-рекомбиназу. Ядро одного сперматозоида сливается с ядром яйцеклетки, образуя зиготу. Другое ядро сперматозоида сливается с одним из двух полярных ядер, которое, в свою очередь, сливается с другим полярным ядром, тем самым образуя первичное ядро эндосперма. Таким образом, при применении растения, экспрессирующего Cre-рекомбиназу, в качестве донора пыльцы мужской особи, как зародыш, так и эндосперм полученного скрещивания будут экспрессировать Cre-рекомбиназу по мере того, как клетки делятся и развиваются, превращаясь в зерно кукурузы (то есть, семя). Cre-рекомбиназа связывается с инвертированными повторами в сайте LoxP и катализирует кроссинговер в спейсерном участке из восьми пар оснований двух сайтов LoxP, фланкирующих кассету экспрессии, что приводит к вырезанию кассеты с маркером с одним сайтом LoxP, остающимся в интегрированной T-ДНК из-за рекомбинации (см. фиг. 2, "Вставленная T-ДНК после Cre-вырезания").

Потомство F₁, полученное в результате Cre скрещивания, отбирали из-за отсутствия кассеты для селекции CP4 и позволяли самоопыляться. Посредством этого процесса два аллеля - аллель Cre-рекомбиназы и аллель T-ДНК, использованная для генерации объекта MON 95379 - сегрегируются в полученной популяции F₂, в результате чего потомство становится гомозиготным или гетерозиготным по одному или обоим аллелям.

Было отобрано потомство F₂, которое продемонстрировало отсутствие аллеля Cre-рекомбиназы и гомозиготность по SEQ ID NO: 9, трансгенной вставленной T-ДНК после Cre-вырезания. Это отобранное потомство F₂ самоопылялось, давая поколение F₃ гомозиготное по SEQ ID NO: 9.

В результате дальнейшего самоопыления было получено семя потомства F₃ (семя F₄), которое были проанализированы на чистоту и обозначено как "семя золотого стандарта". F₄ было первым поколением семени золотого стандарта. Вырезание маркерной кассеты для селекции глифосатом не влияло на экспрессию *Cry1B.868* и *Cry1Da_7*. Удаление кассеты для селекции глифосатом из объекта кукурузы MON 95379 посредством Cre-вырезания обеспечило объект трансгенной кукурузы, устойчивый к вредителям *Lepidopteran*, без добавления толерантности к глифосату в финальном объекте. Это "безмаркерный" объект обеспечивает гибкость при построении селекционных стеков кукурузы с другими трансгенными объектами кукурузы, чтобы обеспечить множество продуктов, включающих объект MON 95379, и обеспечивая множество вариантов предоставления дополнительных признаков в финальных селекционных стеках.

Пример 4. Объект кукурузы MON 95379 демонстрирует устойчивость к насекомым-вредителям *Lepidopteran* осенней совке, совке кукурузной, огнёвке кукурузной юго-западной, мотыльку сахарного тростника.

В этом примере описывается активность объекта MON 95379 против насекомых-вредителей *Lepidopteran*. Белки токсина насекомых *Cry1B.868* и *Cry1Da7* при совместной экспрессии в объекте кукурузы MON 95379 обеспечивают устойчивость к осенней совке (*Spodoptera frugiperda*), совке кукурузной (*Helicoverpa zea*), огнёвке кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*) и огнёвке сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*).

После трансформации и вставки Конструкции MON95 сорок один (41) объект R₀ был отобран для биотеста с использованием дисков листьев. Биологические анализы с использованием дисков листьев растений были выполнены аналогично описанному в патенте США № 8344207. Нетрансформированное растение кукурузы LH244 применяли для получения ткани, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Планшеты, содержащие лунки с одним насекомым на диск листа в каждой лунке, инкубировали в течение трех (3) дней. Через три (3) дня пластины были исследованы. Если было съедено по меньшей мере пятьдесят процентов (50%) диска листа в отрицательном контроле, измерения проводили на дисках листа трансгенных объектов. Если менее пятидесяти процентов (50%) дисков листа в отрицательном контроле еще не были съедены, насекомым позволяли продолжать питаться до достижения цели в пятьдесят процентов (50%). Измерения поврежденности листа ("балльные оценки поврежденности листьев" или "LDR") и смертности проводили для каждой лунки. Было определено среднее значение каждого показателя. Оценки поврежденности листьев варьировались от одного (1) до одиннадцати (11) баллов и отражают процент съеденного диска листа. В табл. 4 показана балльная шкала оценки поврежденности листьев, используемая для анализов диска листа R₀. По этой балльной шкале оценки отрицательные контроли всегда будут иметь LDR по меньшей мере 10.

Таблица 4
Балльная шкала оценки поврежденности листьев (LDR) для анализов диска листа R₀

Балльная оценка поврежденности листьев (LDR)	Размер повреждения в результате питания
1	≤ 5 %
2	≤ 10 %
3	≤ 15 %
4	≤ 20 %
5	≤ 25 %
6	≤ 30 %
7	≤ 35 %
8	≤ 40 %
9	≤ 45 %
10	≤ 50 %
11	> 50 %

В табл. 5 показаны средние балльные оценки поврежденности листьев для сорока одного (41) объекта, трансформированных с помощью Конструкции MON95, включая объект MON 95379. Как видно из Табл. 5, экспрессия двух инсектицидных белков Cry1B.868 и Cry1Da_7 обеспечивала устойчивость к осенней совке (FAW), совке кукурузной (CEW) и огнёвке кукурузной юго-западной (SWCB). LDR для отрицательных контролей составляли от 10 до 11. FAW и SWCB потребляли только приблизительно пять процентов (5%) диска листа объекта MON 95379 по сравнению с отрицательными контролями, которые съедали по меньшей мере пятьдесят процентов (50%) диска листа. Что касается CEW, было съедено только приблизительно 6,25% дисков листа по сравнению с отрицательными контролями, которые съедали по меньшей мере пятьдесят процентов (50%) дисков листа. Кроме того, сто процентов (100%) FAW и CEW погибли после поедания объекта MON 95379, содержащегося в дисках листа.

Таблица 5

Средняя балльная оценка поврежденности листьев (LDR) и средняя смертность для растений R₀, экспрессирующих Cry1B.868 и Cry1Da_7

Объект	Средняя LDR FAW	Средняя LDR CEW	Средняя LDR SWCB
MON 95379	1,00	1,25	1,00
Объект 2	1,00	2,00	1,00
Объект 3	1,00	1,00	1,00
Объект 4	1,00	1,25	1,00
Объект 5	1,00	1,50	1,00
Объект 6	1,00	3,25	1,00
Объект 7	1,00	2,25	1,00
Объект 8	1,00	1,50	1,00
Объект 9	1,00	1,75	1,00
Объект 10	1,00	2,25	1,25
Объект 11	1,00	1,75	1,00
Объект 12	1,00	1,25	1,00
Объект 13	1,00	1,25	1,00
Объект 14	1,00	3,75	1,00
Объект 15	1,00	1,00	1,00
Объект 16	1,00	1,25	1,25
Объект 17	1,00	3,00	1,00
Объект 18	1,00	1,25	1,00
Объект 19	1,00	1,75	1,25
Объект 20	1,00	1,00	1,25
Объект 21	1,00	5,00	1,00
Объект 22	1,00	1,33	1,00
Объект 23	1,00	1,00	1,00
Объект 24	1,00	1,50	1,00
Объект 25	1,00	1,25	1,00
Объект 26	1,00	2,33	1,25
Объект 27	1,00	1,25	1,00
Объект 28	1,00	1,50	1,00
Объект 29	1,00	1,00	1,00
Объект 30	1,00	2,00	1,00
Объект 31	1,00	2,50	1,50
Объект 32	1,00	1,00	1,00
Объект 33	1,00	1,67	1,00
Объект 34	1,00	3,00	1,00
Объект 35	1,00	1,25	1,00
Объект 36	1,00	1,50	1,00
Объект 37	1,00	2,50	1,00
Объект 38	1,00	3,50	1,25
Объект 39	1,00	1,00	1,25
Объект 40	1,00	1,00	1,00
Объект 41	1,00	1,25	1,00

Сорок один (41) объект скрещивали с нетрансгенными растениями сорта 93ID13. Были отобраны гетерозиготные растения-потомки F₁, которые содержали Конструкцию MON95. Около пяти (5) растений F₁ для каждого объекта были искусственно заражены в теплице каждым видом насекомых-вредителей. Что касается FAW, приблизительно сорок (40) новорожденных насекомых использовали для заражения каждого растения F₁ на стадии мутовки V6-V8. Что касается SWCB, приблизительно тридцать (30) новорожденных насекомых использовали для заражения каждого растения F₁ на стадии мутовки V6-V10. Измерения поврежденности листьев FAW и SWCB проводили приблизительно через четырнадцать (14) дней после заражения. Табл. 6 и 7 показывают балльные шкалы оценки поврежденности, используемые для оценки поврежденности листьев.

Балльная шкала оценки поврежденности листьев
для растений кукурузы, зараженных FAW

Балльная оценка поврежденности листьев (LDR)	Описание
0	Без видимых повреждений
1	На листьях мутовки присутствуют только точечные повреждения
2	На листьях мутовки присутствуют точечные и небольшие круглые повреждения
3	Небольшие круглые повреждения и 1-3 маленьких удлиненных повреждения на листьях мутовки и свернутых листьях
4	4-6 небольших и средних удлиненных повреждения на 1-3 листьях мутовки и свернутых листьях
5	4-6 крупных удлиненных повреждения присутствуют на 1-3 листьях мутовки и свернутых листьях и/или 1-3 маленьких или средних, однородных или неравномерных повреждений, или повреждения присутствуют на листьях мутовки и/или свернутых листьях
6	4-6 крупных удлиненных поражений присутствуют на 4-6 листьях мутовки и свернутых листьях и/или 4-6 больших однородных отверстий до отверстий неправильной формы, изъеденных на листьях мутовки и свернутых листьях
7	7+ удлиненных поражений всех размеров, присутствующих на нескольких мутовках и свернутых листьях, плюс 4-6 больших однородных отверстий до отверстий неправильной формы, изъеденных на листьях мутовки и свернутых листьях
8	7+ удлиненных поражений всех размеров на большинстве мутовок и свернутых листьях плюс 7+ средне- и крупноразмерных однородных отверстий до отверстий неправильной формы, изъеденных на листьях мутовки и свернутых листьях
9	Листья мутовки и свернутые листья почти полностью уничтожены, также как и растение, демонстрирующее признаки задержки роста

Таблица 7

Балльная шкала оценки поврежденности листьев
для растений кукурузы, зараженных SWCB

Балльная оценка поврежденности листьев (LDR)	Описание
0	Без повреждений
1	Небольшое количество точечных или мелких отверстий на листьях
2	Небольшое количество сквозных повреждений на нескольких присутствующих
3	Сквозные повреждения часто встречающиеся на нескольких листьях
4	Несколько листьев с пробоинами и продолговатыми поражениями
5	Несколько листьев с удлинненными
	поражениями
6	Несколько листьев с удлинненными поражениями - 2,5 см длиной
7	Длинные поражения часто встречаются на ~ 50 % листьев
8	Длинные поражения часто встречаются на ~ 70 % листьев
9	Большинство или все листья с длинными поражениями

Зараженные SWCB растения F_1 также оценивали на длину перфорирования стебля, вызванного SWCB. Чтобы определить длину перфорирования стебля, стебли кукурузы ломали примерно на уровне глаз, а верхнюю часть использовали для проверки на предмет повреждений от просверливания. Стебли были разделены с помощью двуручного ножа, и длина туннеля, просверленного SWCB, была измерена в сантиметрах (см). В этих экспериментах длина туннеля была ограничена десятью сантиметрами (10 см).

Кроме того, пять (5) растений F_1 для каждого объекта также были заражены CEW для измерения степени повреждения, нанесенного CEW початку кукурузы. Примерно сорок (40) нимф CEW использовали для заражения каждого растения и помещали на зеленые пестичные столбики растений стадии R_1 . Через двадцать один (21) день после заражения развивающиеся початки исследовали, и повреждение регистрировали как повреждение початка в $см^2$.

В табл. 8 показаны средние балльные оценки поврежденности листьев для объектов F_1 зараженных FAW и SWCB, длины просверленного стебля, вызванного SWCB, и повреждения початка, вызванного CEW, где "Н/И" означает, что исследование не проводилось.

Таблица 8

Средние балльные оценки поврежденности листьев трансгенных растений кукурузы F₁, зараженных FAW и SWCB, длины просверливания стебля, вызванного SWCB, и поврежденность початков, вызванного CEW

Объект	LDR FAW	LDR SWCB	Длина туннеля SWCB (см)	Поврежденность початка CEW (см ² повреждения)
MON 95379	0,30	1,00	0,00	3,25
Объект 2	0,50	1,00	0,00	3,25
Объект 3	0,30	1,00	0,00	0,00
Объект 4	0,30	1,30	0,00	2,30
Объект 5	1,00	1,00	0,00	1,00
Объект 6	0,30	1,00	0,00	0,00
Объект 7	0,80	0,50	0,00	3,00
Объект 8	0,50	1,00	0,00	0,00
Объект 9	1,30	0,80	0,00	0,25
Объект 10	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 11	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 12	0,30	1,00	0,00	3,50
Объект 13	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 14	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 15	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 16	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 17	0,50	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 18	0,00	1,30	0,00	2,50
Объект 19	0,80	1,30	0,00	0,00
Объект 20	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 21	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 22	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 23	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 24	0,50	0,50	2,50	2,75
Объект 25	0,00	1,50	2,25	0,00
Объект 26	0,30	1,30	0,00	3,00
Объект 27	0,50	1,50	2,50	1,25
Объект 28	0,30	1,00	1,00	1,75
Объект 29	0,30	1,00	1,00	0,25
Объект 30	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 31	0,30	1,00	0,00	2,50
Объект 32	0,50	1,00	0,00	0,25
Объект 33	0,50	1,00	0,00	2,25
Объект 34	0,30	1,00	0,00	1,50
Объект 35	0,30	1,30	1,25	0,00
Объект 36	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
Объект 37	0,50	1,00	0,00	1,50
Объект 38	1,30	1,00	0,00	0,50
Объект 39	0,00	1,00	1,75	2,00
Объект 40	0,30	0,50	1,25	1,75
Объект 41	0,00	0,80	0,00	2,25
Отрицательный контроль	7,80	9,00	10,00	13,25

Как можно видеть в табл. 8, поврежденность листьев кукурузы MON 95379 была минимальной как для FAW, так и для SWCB по сравнению с отрицательными контролями. По существу, как только насекомые начали питаться листом объекта MON 95379 F₁, экспрессия инсектицидных белков Cry1B.868 и Cry1Da_7 в листьях кукурузы, содержащих объект MON 95379, заставила насекомое прекратить питание листом. Образование туннелей SWCB не наблюдалось в объекте MON 95379, в то время как отрицатель-

ные контроли показали обширное образование туннелей. Что касается повреждения початка CEW, повреждение початка было намного меньше по сравнению с отрицательным контролем и было сопоставимо с повреждением початка, наблюдаемым в нескольких коммерчески доступных трансгенных объектах кукурузы. Заражение в масштабах, используемых в анализах F₁, было намного выше, чем обычно наблюдается в природе. Анализы F₁ продемонстрировали, что объект кукурузы MON 95379 обеспечивает превосходный контроль над FAW, SWCB и CEW. Летом 2016 года потомство F₁ от оставшихся тридцати девяти (39) объектов после R2/F1 описанных в примере 2/табл. 3, было проанализировано на устойчивость к FAW, CEW и SWCB в полевых экспериментах с применением искусственного заражения. Для анализа устойчивости применяли множество местоположений.

Устойчивость к FAW оценивали в трех (3) местоположениях: Джерсвилл, Иллинойс; Томасборо, Иллинойс; и Юнион-Сити, Теннесси. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Сорок (40) новорожденных насекомых FAW применяли для заражения каждого растения дважды, на ранней и средней стадии средней мутовки (вегетативная стадия V4 и V7). Балльные оценки поврежденности листа при питании определяли с применением шкалы, представленной в табл. 6.

Устойчивость к SWCB оценивали в трех (3) местоположениях: в одном (1) в Джонсборо, Арканзас, и в двух (2) в Юнион-Сити, Теннесси. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Тридцать (30) новорожденных насекомых SWCB использовали для заражения каждого растения на стадии средней мутовки (V7-V8). Во время сбрасывания пятидесяти процентов (50%) пыльцы растения снова заражали тридцатью (30) новорожденными насекомыми SWCB на одно растение. Поврежденность стебля туннелями оценивали, как описано ранее. Устойчивость к CEW оценивали в пяти (5) местоположениях: Джерсвилл, Иллинойс, Джонсборо, Арканзас, Монмут, Иллинойс, Томасборо, Иллинойс, и Юнион-Сити, Теннесси. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Растения были заражены, когда песчаные столбики только появлялись и были зелеными, и начиналось некоторое образование початков (стадии с R1 по R3). Для заражения использовали полоски яиц CEW. Каждая полоска содержала примерно сорок (40) яиц. По одной (1) полоске помещали между початком и стеблем каждого растения, при этом яйца были обращены к початку и расположены близко к песчаным столбикам. Оценку поврежденности початка проводили через двадцать один (21) -двадцать восемь (28) дней после заражения. К этому времени насекомое развилось с личиночной стадии до стадии куколки. Поврежденность початков измеряли, как описано ранее.

Для FAW и SWCB использовались данные из всех трех (3) местоположений. Для CEW из-за различных полевых условий можно было использовать только данные из Джонсборо, Арканзас. В табл. 9 показаны средние балльные оценки поврежденности листьев FAW, длины туннелей, сделанных SWCB, и измерения поврежденности початков CEW для каждого из тестируемых объектов и отрицательного контроля.

Таблица 9

Средние балльные оценки поврежденности листьев FAW, длина туннеля сделанного SWCB и поврежденность початка CEW для полевых испытаний 2016 г.

Объект	LDR FAW	Длина туннеля SWCB (см)	Поврежденность початка CEW (см ²)
MON 95379	1,56	0,37	2,86
Объект 2	1,28	1,84	4,41
Объект 3	1,33	0,14	3,28
Объект 4	2,01	0,11	3,00
Объект 5	1,83	0,89	4,09
Объект 6	1,46	1,09	2,89
Объект 7	1,67	0,39	3,40
Объект 8	1,44	0,72	3,19
Объект 9	1,59	0,00	3,98
Объект 10	2,85	0,35	2,96
Объект 11	1,50	2,59	2,84
Объект 12	1,39	0,42	3,04
Объект 13	1,74	0,00	3,34
Объект 14	2,52	1,22	3,01
Объект 15	1,53	0,22	3,09
Объект 16	1,50	1,61	3,24
Объект 17	2,31	1,72	2,80
Объект 18	1,70	0,13	4,02
Объект 19	1,28	1,00	3,96
Объект 20	1,28	0,52	2,79
Объект 21	1,39	0,39	3,55
Объект 22	1,72	0,94	4,34
Объект 23	1,86	0,22	3,04
Объект 24	1,93	0,00	3,60
Объект 25	1,57	0,06	2,28
Объект 26	1,65	0,00	2,28
Объект 27	1,65	0,28	2,73
Объект 28	1,63	2,72	3,60
Объект 29	2,62	0,78	3,42
Объект 30	4,78	12,59	5,25
Объект 31	1,78	1,81	3,79
Объект 32	1,63	0,00	3,08
Объект 33	1,37	0,00	3,40
Объект 34	1,80	0,19	3,20
Объект 35	2,20	0,84	3,99
Объект 36	1,96	0,22	3,78
Объект 37	1,35	0,06	3,07
Объект 38	1,22	0,27	3,94
Объект 39	1,46	0,14	2,87
Отрицательный контроль	7,15	7,21	32,25

Как показано в табл. 9, объект кукурузы MON 95379 обеспечивал превосходный контроль над FAW, SWCB и CEW по сравнению с отрицательным контролем. Уровень заражения в этих анализах был намного выше, чем тот, который обычно встречается в поле в естественных условиях, что демонстрирует превосходные характеристики объекта MON 95379 при высоком давлении насекомых. Во время одно-временных полевых испытаний и Сге-вырезания кассеты для селекции и производства семян золотого стандарта была проведена дальнейшая характеристика объектов. В результате обширных молекулярных характеристик, эффективности, экспрессии и агрономических исследований объекты были исключены из тестирования, при этом осталось два (2) объекта: объект 1 и MON 95379. Объект 1 был деприоритизиро-

ван на основании наблюдаемого снижения урожайности в агрономических исследованиях, при этом остался объект MON 95379 для продвижения. В течение вегетационного периода 2016-2017 гг. в Аргентине объект MON 95379 был проанализирован на устойчивость к FAW, CEW и SCB в умеренных и субтропических регионах в условиях естественного заражения. Балльные оценки поврежденности листьев FAW определяли для объекта MON 95379, выращенного в субтропическом регионе Аргентины, с применением шкалы, представленной в табл. 6. Данные об образовании туннелей SCB были получены для объекта MON 95379 из двух (2) местоположений в среднеширотном регионе Аргентины. Данные о поврежденности початка CEW были получены для объекта MON 95379 из двух (2) местоположений в умеренных регионах и трех (3) местоположений в субтропических регионах Аргентины. В табл. 11 показаны средние балльные оценки поврежденности листьев FAW, длина туннеля, сделанного SCB, и повреждение початков CEW в условиях естественного заражения для объекта MON 95379 и отрицательного контроля в течение вегетационных сезонов в Аргентине 2016-2017 г.

Таблица 10

Средние балльные оценки поврежденности листьев FAW, длина туннеля, сделанного SCB, и поврежденность початков CEW для полевых испытаний в Аргентине в 2016-2017 гг.

Объект	FAW (LDR)	Длина туннеля SCB (см)	Поврежденность початка CEW (см ²)
MON 95379	1,27	0,00	1,32
Отрицательный контроль	7,48	4,43	5,83

Как видно из табл. 10, объект MON 95379 обеспечивал устойчивость к FAW, SCB и CEW по сравнению с отрицательным контролем в условиях естественного заражения в Аргентине.

Объект MON 95379 также оценивали на устойчивость к FAW, устойчивому к коммерчески доступному объекту кукурузы (MON89034, которая экспрессирует Cry1a.105 и Cry2Ab2) в течение трех (3) вегетационных сезонов в Пуэрто-Рико (январь 2016 г., июль 2016 г. и январь 2017 г.). В табл. 11 показаны средние балльные оценки поврежденности листьев на основе шкалы, представленной в табл. 6, для каждого из трех (3) вегетационных сезонов по сравнению с объектом MON89034 и отрицательным контролем.

Таблица 11

Средние балльные оценки поврежденности листа для объекта MON 95379 и объекта MON89034, зараженных FAW естественным путем устойчивым к объекту MON89034

Объект	Январь 2016	Июль 2016	Январь 2017
MON 95379	2,30	2,22	1,40
MON89034	5,68	4,54	7,36
Отрицательный контроль	8,73	6,84	9,00

Как видно из табл. 11, объект кукурузы MON 95379 продемонстрировал устойчивость к FAW, устойчивому к объекту MON89034, при высоком естественном давлении по сравнению с отрицательным контролем.

Летом 2017 г. объект MON 95379 был оценен на устойчивость к FAW, SWCB и CEW в США с применением способов, аналогичных описанным для лета 2016 г. Устойчивость к FAW оценивали в трех (3) местоположениях: Джерсвилл, Иллинойс; Томасборо, Иллинойс; и Монмаут, Иллинойс. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Сорок (40) новорожденных насекомых FAW использовали для заражения каждого растения два раза. Первое заражение осуществляли примерно на стадии V5. Второе заражение растений в Монмуте, Иллинойс, и Джерсвилле, Иллинойс, осуществляли примерно на стадии V8. Из-за низкого уровня вылупления и плохой погоды повторное заражение в Томасборо, Иллинойс, было невозможным. Балльные оценки поврежденности листьев FAW при их питании определяли с применением шкалы, представленной в табл. 6. Устойчивость к SWCB оценивали в трех (3) местоположениях: в одном (1) в Джонсборо, Арканзас и в двух (2) в Юнион-Сити, Иллинойс. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Сорок (30) новорожденных насекомых SWCB использовали для заражения каждого растения два раза. В нормальных условиях первое заражение проводится на стадии средней мутовки (V7-V8) в половине ряда, но заражение было отложено примерно на неделю. Тем не менее, было установлено сильное давление насекомых. Во время сбрасывания пятидесяти процентов (50%) пыльцы вторая половина ряда растений была заражена тридцатью (30) новорожденными насеко-

мыми SWCB на одно растение. Поврежденность стебля туннелями оценивали, как описано ранее.

Устойчивость к CEW исследовали в шести (6) местоположениях: Джерсвилле, Иллинойс, Джонсборо, Арканзас, Парагоулд, Арканзас, Монмаут, Иллинойс, и в двух местоположениях в Юнион-Сити, Теннесси. В каждом местоположении каждый объект анализировали на трех (3) полевых участках с применением одного (1) ряда на участок и тридцати (30) семян на ряд. Из-за нехватки насекомых, заражения в Монмуте, Иллинойс, и в Джерсвилле, Иллинойс, были заражены на две (2) или три (3) недели позже, чем когда пестичные столбики только появились и были зелеными. В Монмауте приблизительно двадцать два (22) новорожденных насекомых были использованы для заражения каждого растения. В Джерсвилле, Иллинойс, от двадцати трех (23) до двадцати четырех (24) новорожденных насекомых были использованы для заражения частично раскрытых початков кукурузы. В Джонсборо, Арканзас, в один (1) из трех (3) рядов поступило приблизительно тридцать (30) новорожденных насекомых на растение, а в другие два (2) ряда поступило от шестнадцати (16) до (18) новорожденных насекомых на растение. В Парагоулд, Арканзас, все три (3) ряда получили примерно тридцать (30) новорожденных насекомых на растение. Заражение было отложено в двух местоположениях в Юнион-Сити, Теннесси, из-за доступности насекомых. В обоих местоположениях было получено по восемнадцать (18) новорожденных насекомых на одно растение. Оценку поврежденности початка проводили через двадцать один (21) - двадцать восемь (28) дней после заражения. Поврежденность початков выражали, как описано ранее. Искусственные инвазии проводили как на растениях содержащего маркер, так и безмаркерного объекта MON 95379. Кроме того, были также проведены анализы с применением естественного давления насекомых в местоположениях для растений содержащего маркер объекта MON 95379. В табл. 12 и 13 показаны балльные оценки поврежденности листа FAW, длина туннелей, сделанных SWCB, и поврежденность початка CEW для растений содержащего маркер и безмаркерного объекта MON 95379.

Таблица 12

Средние балльные оценки поврежденности листа FAW, длина туннеля, сделанного SWCB, и поврежденность початка CEW для растений объекта MON 95379 до Сге-вырезания маркера для селекции в условиях искусственного и естественного заражения

Объект	До Сге-вырезания маркера CP4				Длина туннеля, сделанного SWCB, для искусственного заражения (см)
	Искусственное заражение FAW (LDR)	Естественное заражение FAW (LDR)	Искусственное заражение CEW (см2)	Естественное заражение CEW (см2)	
MON 95379	1,17	1,15	4,93	5,81	0,00
Отрицательный контроль	7,08	8,15	8,49	14,57	14,34

Таблица 13

Средние балльные оценки поврежденности листьев FAW, длина туннеля, сделанного SWCB, и поврежденность початков CEW для безмаркерных растений объекта MON 95379 при искусственном заражении

Объект	После Сге-вырезания маркера CP4		
	Искусственное заражение FAW (LDR)	Искусственное заражение CEW (см2)	Длина туннеля, сделанного SWCB, для искусственного заражения (см)
MON 95379	1,20	5,39	0,27
Отрицательный контроль	7,08	8,49	14,34

Как видно из табл. 12 и 13, объект MON 95379 обеспечивал устойчивость к FAW, SWCB и CEW в искусственных (с маркерами и без маркеров) и естественных (без маркеров) условиях заражения.

В 2018 г. гибридное скрещивание объекта MON 95379 с объектом MON89034 было исследовано на устойчивость к FAW в полевых испытаниях в Бразилии в условиях естественного заражения. Полевые испытания проводились в Санта-Элена-де-Гояс, штат Гояс. В этом местоположении есть популяции FAW, устойчивые к объекту трансгенной кукурузы MON89034. Высаживали трансгенные растения кукурузы, соответствующие скрещиванию объектов MON 95379 × MON89034, объекта MON89034 и обычного растения кукурузы (отрицательный контроль). На стадии V6 баллы оценки поврежденности листа были определены для шестидесяти (60) растений, соответствующих скрещиванию объектов MON 95379 × MON89034, тридцати (30) растений, соответствующих объекту MON89034, и тридцати (30) отрицательных контролей с применением шкалы, представленной в табл. 6. Кроме того, для каждого растения регистрировали количество новорожденных насекомых FAW, личинок размером более двух миллиметров (2 мм) и менее или равных 1,5 см, и личинок размером более чем 1,5 см. В табл. 14 показаны средние

балльные оценки поврежденности листьев для скрещивания объектов MON 95379 × MON89034, объекта MON89034 и отрицательного контроля, наряду с количеством новорожденных насекомых и личинок, наблюдаемых на растениях кукурузы.

Таблица 14

Средняя балльная оценка поврежденности листьев FAW и количество новорожденных насекомых и личинок из Бразилии, полевые испытания 2018 г. для скрещивания объектов MON 95379 × MON89034, объекта MON89034 и отрицательного контроля

Объект	FAW (LDR)	Новорожденные насекомые	Личинки > 2 мм и ≤ 1,5 см	Личинки > 1,5 см
MON 95379 × MON89034	0,62	0	0	0
MON89034	1,47	6	16	0
Отрицательный контроль	5,20	0	22	9

Как видно из табл. 14, скрещивание объектов MON 95379 × MON89034 обеспечивало устойчивость к FAW в условиях естественного заражения по сравнению с отрицательным контролем. Скрещивание объектов MON 95379 × MON89034 также показало лучшие результаты, чем объект MON89034, в условиях, когда FAW, устойчивые к объекту MON89034, находятся в популяции FAW. Что касается новорожденных насекомых и личинок, то они не наблюдались на растениях, соответствующих скрещиванию объектов MON 95379 × MON89034. Новорожденные насекомые и личинки размером от двух (2) миллиметров до полутора (1,5) сантиметров наблюдались на растениях объекта MON89034. Наблюдалось, что у растений отрицательного контроля было даже больше личинок, чем у растений объекта MON89034, и у них были личинки, которые выросли более чем на 1,5 см.

Пример 5. Анализ активности объекта кукурузы MON 95379 против малого кукурузного мотылька.

В этом примере описывается анализ активности объекта трансгенной кукурузы MON 95379 против насекомых-вредителей *Lepidopteran*, малого кукурузного мотылька (*LSCB*, *Elasmopalpus lignosellus*).

Объект MON 95379 выращивали в теплице вместе с растениями отрицательного контроля и заражали новорожденными насекомыми *LSCB*. Десять (10) растений трансформанта MON 95379 и девять (9) растений отрицательного контроля выращивали в индивидуальных горшках. Через девять (9) дней после высаживания каждое растение заражали десятью (10) новорожденными насекомыми *LSCB* на растение. Через двадцать два (22) дня после заражения растения исследовали и оценили повреждение по балльной шкале оценки поврежденности 0-4, как представлено в табл. 15.

Таблица 15

Балльная шкала оценки поврежденности растений *LSCB*

Балльная оценка поврежденности <i>LSCB</i>	Тяжесть повреждения	Описание
0	Без повреждения	Растения без повреждения
1	Легкое повреждение	Растения с царапинами на листьях и/или стеблях
2	Среднее повреждение	Растения с поврежденными частями стебля
3	Серьезное повреждение	Растения с поврежденными частями стебля и симптомами мертвого початка
4	Мертвое растение	Мертвые растения

Полученные оценки поврежденности *LSCB* для каждого растения представлены в табл. 16.

Таблица 16
Повреждение растений LSCB для
каждого зараженного растения

Растение	MON 95379	Отрицательный контроль
1	0	4
2	0	2
3	0	3
4	0	3
5	0	4
6	0	3
7	0	3
8	0	4
9	0	4
10	0	

Как видно из табл. 16, LSCB вызывал обширное повреждение растений отрицательного контроля, четыре (4) из которых были оценены как "мертвые", четыре (4) из которых были оценены как "серьезно поврежденные" и только одно (1) оценено как "средне поврежденное". Напротив, растения объекта MON 95379, зараженные LSCB, не продемонстрировали повреждений.

Объект трансгенной кукурузы MON 95379 обеспечивает устойчивость к малому кукурузному мотыльку (LSCB, *Elasmopalpus lignosellus*).

Пример 6. Объект кукурузы MON 95379 обеспечивает стабильную урожайность и аналогичные агрономические показатели для нетрансформированных растений кукурузы LH244.

Этот пример демонстрирует, что трансгенный объект кукурузы MON 95379 обеспечивает стабильные урожаи и агрономические свойства, аналогичные нетрансформированным растениям кукурузы LH244 в полевых условиях. Полевые испытания были проведены с растениями, соответствующими объекту MON 95379, перед Сге-вырезанием кассеты для селекции глифосатом для определения различных аспектов урожайности и агрономии по сравнению с контрольными растениями. Урожайность была рассчитана и выражена в бушелях на акр (бушель/акр). Высоту растения и высоту початка измеряли в дюймах (д). Пятьдесят процентов (50%) сбрасывания пыльцы и пятьдесят процентов (50%) выметывания пестичных столбиков выражали в днях после высаживания (DAP - days after planting). Тестовый вес, который представляет собой измерение объемной плотности или веса единицы объема зерна, выражали в фунтах на бушель (фунт/бушель). Министерство сельского хозяйства США установило стандартный тестовый вес бушеля кукурузы как пятьдесят шесть фунтов на бушель (56 фунт/бушель) при содержании влаги 15,5%. Процент влаги в зернах кукурузы выражали на основе сырого веса. Содержание влаги - это количество воды в семени, обычно выражаемое в процентах. Он может быть выражен либо на основе сырого веса (где он выражается в процентах от сырого веса семян), либо на основе сухого веса (где он выражается в процентах от сухого веса семян). Определение процента влажности губительно для семян. Процент влажности (влажная масса) можно рассчитать по простой формуле:

$$M_{wb} = (W_w / (W_w + W_d)) \times 100,$$

где W_w равно весу воды и W_d равно весу сухого вещества.

В вегетационный период 2016 г. в США определяли урожайность и агрономические показатели для инбридов и гибридов объекта MON 95379 до Сге-вырезания кассеты с маркером для глифосата. Табл. 17 и 18 показывают урожайность и агрономические характеристики, измеренные для инбридов и гибридов объекта MON 95379, соответственно. Растениями отрицательного контроля для сравнений инбридов был нетрансформированный сорт LH244. Гибриды, содержащие объект MON 95379, были созданы путем перекрестного опыления инбридного объекта MON 95379 с сортом кукурузы 93ID13, а нетрансформированный контроль представлял собой скрещивание LH244 × 93ID13.

Таблица 17

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Высота растения (дюйм)		Высота початка (дюйм)		50 % сбрасывание пыльцы (DAP)		50 % выметывание пестичных столбиков (DAP)	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	111,08	5,17	85,40	2,72	41,29	1,45	65,11	2,00	65,77	2,05
LH244	114,18	5,02	82,05	2,32	38,73	1,33	62,60	1,79	63,54	1,82

Таблица 18

Урожайность и агрономия гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379 x 93IDI3	203,48	7,04	58,78	0,61	16,04	0,42
LH244 x 93IDI3	196,45	6,81	58,31	0,61	15,89	0,43

Как видно из табл. 17 и 18, урожайность и другие агрономические показатели для объекта MON 95379 в полевых испытаниях в США в 2016 г. были относительно одинаковыми как для инбридов, так и для гибридов по сравнению с контролями. Вариабельность между инбридами и гибридами и их соответствующими контролями находилась в допустимых пределах и демонстрирует отсутствие отрицательного воздействия на урожай и другие агрономические характеристики, вызванного вставкой T-ДНК в геном кукурузы по объекту MON 95379.

Урожайность и агрономия также изучались в Аргентине в течение вегетационного периода 2016-2017 годов для инбредных и гибридных объектов MON 95379 до Cre-вырезания кассеты с маркером для глифосата. Табл. 19 и 20 показывают урожайность и агрономические характеристики, измеренные для инбридов объекта MON 95379. Растениями отрицательного контроля для сравнений инбридов был нетрансформированный сорт LH244. Гибриды, содержащие объект MON 95379, были созданы путем перекрестного опыления объектов MON89034 x MON895379. Трансгенным контролем был объект MON88017 x объект MON89034. Нетрансгенный контроль представлял собой скрещивание LH244 x 93IDI3. Табл. 21 показывает урожай и агрономические характеристики, измеренные для гибридов объекта MON 95379, где "Н/Р" означает, что значение не было рассчитано.

Таблица 19

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Высота растения (дюйм)		Высота початка (дюйм)		50 % сбрасывание пыльцы (DAP)		50 % выметывание пестичных столбиков (DAP)	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	113,39	4,57	73,89	1,05	38,38	0,95	64,32	0,60	64,68	0,62
LH244	105,49	Н/Р	71,69	Н/Р	36,66	Н/Р	64,86	Н/Р	65,17	Н/Р

Таблица 20

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	59,28	0,10	16,54	0,26
LH244	59,32	Н/Р	16,01	Н/Р

Таблица 21

Урожайность и агрономические характеристики гибридов объектов MON 95379 по сравнению с трансгенными и нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON89034 x MON 95379	165,80	5,94	60,06	0,20	15,12	0,18
MON88017 x MON89034	164,87	5,94	59,62	0,20	15,45	0,18
LH244 x 93IDI3	166,82	Н/Р	59,70	Н/Р	15,38	Н/Р

Как видно из табл. 19-21, показатели урожайности и других агрономических характеристик были относительно одинаковыми для инбридов и гибридов объекта MON 95379 по сравнению с контролями.

В 2017 г. урожай и агрономии снова были измерены в полевых испытаниях в США для инбридов и гибридов объектов MON 95379 до Сге-вырезания кассеты с маркером для глифосата. Инбредные и гибридные контроли были аналогичны тем, которые применялись в полевых испытаниях в США в 2016 г. В табл. 22 показаны урожайность и агрономические характеристики инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями, а в табл. 23 и 24 показаны урожайность и агрономические характеристики, измеренные для гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями в полевых испытаниях в США в 2017 г.

Таблица 22

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	116,49	5,45	57,86	0,59	21,16	0,76
LH244	124,46	5,39	58,60	0,58	20,57	0,76

Таблица 23

Урожайность и агрономия гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Высота растения (дюйм)		Высота початка (дюйм)		50 % сбрасывание пыльцы (DAP)		50 % выметывание пестичных столбиков (DAP)	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379 x 93IDI3	213,15	4,84	99,14	2,50	45,27	1,77	56,65	0,93	57,17	1,06
LH244 x 93IDI3	217,86	4,44	97,42	2,28	45,61	1,45	55,87	0,91	56,47	1,04

Таблица 24

Урожайность и агрономия гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379 x 93IDI3	57,98	0,37	19,73	0,51
LH244 x 93IDI3	57,53	0,36	19,74	0,50

Как видно из табл. 22-24, показатель урожайности и других агрономических свойств объекта MON 95379, продемонстрированный в полевых испытаниях в США в 2017 г., был аналогичен нетрансформированным контролям как для инбредных, так и для гибридных линий.

В течение вегетационного периода 2018-2019 годов в Аргентине агрономии и урожайность измерялись в полевых испытаниях инбридов и гибридов для объекта MON 95379 после Сге-вырезания кассеты с маркером для глифосата. Инбредные контроли были аналогичны тем, которые применялись в полевых испытаниях в США в 2017 г. Гибриды были получены путем скрещивания с элитным сортом 80IDM2. В табл. 25 и 26 показаны урожайность и агрономические характеристики инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями, а в табл. 27 показаны урожайность и агрономические характеристики, измеренные для гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями в полевых испытаниях в Аргентине в 2018-2019 гг.

Таблица 25

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Высота растения (дюйм)		Высота початка (дюйм)		50 % сбрасывание пыльцы (DAP)		50 % выметывание пестичных столбиков (DAP)	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	92,81	7,30	85,14	2,45	40,57	2,06	62,74	0,61	63,77	0,65
LH244	103,46	7,68	83,93	1,72	38,57	1,24	62,93	0,61	63,88	0,71

Таблица 26

Урожайность и агрономия инбридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379	59,59	1,52	17,49	0,96
LH244	60,34	0,97	17,24	0,69

Таблица 27

Урожайность и агрономия гибридов объекта MON 95379 по сравнению с нетрансгенными контролями

Объект	Урожайность (бушель/акр)		Тестовый вес (фунт/бушель)		Процент влажности	
	Среднее	СКО	Среднее	СКО	Среднее	СКО
MON 95379 x 80IDM2	206,86	8,37	59,42	0,46	19,03	0,84
LH244 x 80IDM2	207,81	8,11	59,22	0,45	19,12	0,83

Как видно из табл. 25-27, показатель урожайности и других агрономических свойств объекта MON 95379, продемонстрированный в полевых испытаниях в Аргентине в 2017-2018 гг., был аналогичен нетрансформированным контролям как для инбредных, так и для гибридных линий.

Таким образом, объект кукурузы MON 95379 продемонстрировал аналогичную урожайность и другие агрономические свойства в течение четырех (4) отдельных вегетационных сезонов в США и Аргентине. Объект MON 95379 не оказывает отрицательного воздействия на урожай и не вызывает изменения других измеренных агрономических свойств по сравнению с нетрансгенными и трансгенными контролями.

Пример 7. Анализы объект-специфичной конечной точки TAQMAN® объекта кукурузы MON 95379.

В следующем примере описаны способы, пригодные для идентификации присутствия объекта MON 95379 в образце кукурузы. Пара праймеров для ПЦР и зонд были сконструированы с целью идентификации уникального соединения, образованного между геномной ДНК кукурузы и вставленной ДНК трансфоранта MON 95379 в ПЦР объект-специфичной конечной точки TAQMAN®. Примеры условий, использованных для идентификации присутствия объекта MON 95379 в образце кукурузы в ПЦР объект-специфичной конечной точке TAQMAN®, описаны в табл. 28 и табл. 29.

Последовательность олигонуклеотидного прямого праймера SQ21529 (SEQ ID NO: 15) идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 833-852 в SEQ ID NO: 10. Последовательность олигонуклеотидного обратного праймера SQ21524 (SEQ ID NO: 16) идентична обратной комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 905-934 в SEQ ID NO: 10. Последовательность олигонуклеотидного зонда PB10269 (SEQ ID NO: 17) идентична обратной комплементарной нуклеотидной последовательности, соответствующей положениям 886-901 в SEQ ID NO: 10. Праймеры SQ21529 (SEQ ID NO: 15) и SQ21524 (SEQ ID NO: 16) с зондом PB10269 (SEQ ID NO: 17), который может быть помечен флуоресцентной меткой (например, флуоресцентной меткой 6-FAM™), можно применять в ПЦР-анализе конечной точки TAQMAN® для определения присутствия ДНК, полученной из объекта MON 95379, в образце. Помимо SQ21529 (SEQ ID NO: 15), SQ21524 (SEQ ID NO: 16) и PB10269 (SEQ ID NO: 17), специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что другие праймеры и/или зонды могут быть созданы для амплификации или гибридизации с последовательностями в SEQ ID NO: 10, которые уникальны и полезны для обнаружения присутствия ДНК, полученной из объекта MON 95379, в образце. Следуя стандартной лабораторной практике молекулярной биологии, были созданы ПЦР-анализы для идентификации объекта для обнаружения объекта MON 95379 в образ-

це. Параметры либо стандартного ПЦР-анализа или ПЦР-анализа TAQMAN® были оптимизированы для каждого набора пар праймеров и зондов (например, зондов, меченных флуоресцентной меткой, такой как 6-FAM™) применяемых для обнаружения присутствия ДНК, полученной из объекта MON 95379 в образце. Контроль для реакции ПЦР включает праймеры внутреннего контроля и зонд внутреннего контроля (например, VIC®-меченный) специфичный для участка в геноме кукурузы, который применяется в качестве внутреннего контроля, и представляют собой праймеры SQ20222 (SEQ ID NO: 18), SQ20221 (SEQ ID NO: 19) и зонд PB50237, меченный VIC® (SEQ ID NO:20).

Обычно параметры, которые были оптимизированы для обнаружения объекта MON 95379 в образце, включали концентрацию праймера и зонда, количество матричной ДНК и параметры цикла амплификации ПЦР. Контроли для этого анализа включают положительный контроль от кукурузы, содержащей объект MON 95379, отрицательный контроль от нетрансгенной кукурузы и отрицательный контроль, который не содержит матрицы ДНК.

Таблица 28

Компоненты реакции ПЦР MON 95379 объект-специфичной конечной точки TAQMAN®

Шаг	Реагент	Исходная концентрация (л М)	Объем (л Л)	Конечная концентрация (л М)	Комментарии
	Объем реакционной смеси		5		
1	2X Мастер-микс		2,28		1X конечная концентрация
2	Объект-специфичный праймер SQ51219	100	0,05	0,9	
3	Объект-специфичный праймер SQ21524	100	0,05	0,9	
4	Объект-специфичный 6FAM™ зонд PB10269	100	0,01	0,2	Зонд светочувствителен
5	Праймер внутреннего контроля SQ20222	100	0,05	0,9	
6	Праймер внутреннего контроля SQ20221	100	0,05	0,9	
7	Меченный VIC® зонд PB50237 внутреннего контроля	100	0,01	0,2	Зонд светочувствителен
8	Извлеченная ДНК (матричная): • Образцы листьев для анализа • Отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК) • Отрицательный водный контроль (без матричного контроля) • Положительный качественный контроль(-и) ДНК MON 95379		2,5		Для каждой матрицы проводятся отдельные реакции.

Таблица 29

Конечные точки TAQMAN® условий термоциклера

Шаг №	Количество циклов	Настройки
1	1	95°C 20 секунд
2	40	95°C 3 секунды
		60°C 20 секунд
3	1	10°C

Пример 8. Анализы для определения зиготности для объекта MON 95379 с применением TAQMAN® и обнаружения трансгенов токсинов насекомых.

В следующем примере описаны способы, пригодные для идентификации зиготности объекта MON 95379 и обнаружения трансгенов токсина насекомых в объекте MON 95379 в образце кукурузы. Пары праймеров для ПЦР и зонда созданы с целью идентификации конкретных свойств аллелей, положительных и отрицательных в отношении вставки Т-ДНК, которая привела к объекту MON 95379. Анализ зиготности пригоден для определения того, является ли растение, содержащее объект, гомозиготным по ДНК объекта (то есть, содержащим экзогенную ДНК в одном и том же местоположении на каждой хромосоме из хромосомной пары), гетерозиготным по ДНК объекта (то есть, содержащим экзогенную ДНК только на одной хромосоме из хромосомной пары) или дикого типа (то есть, нулевое значение по ДНК объекта).

Способ термической амплификации конечной точки TAQMAN® был использован для создания анализа зиготности для объекта MON 95379. В анализе используются пара праймеров и зонд для обнаружения ампликонов, соответствующих одной из двух кодирующих токсины насекомых последовательностей, кодирующих Cry1B.868 и Cry1Da_7, содержащихся в Т-ДНК, применяемой для генерации объекта кукурузы MON 95379. Кроме того, пара праймеров и зонд применяются для обнаружения однокопийного внутреннего контроля, который расположен в геноме кукурузы и, как известно, присутствует как гомозиготный аллель.

Для этого анализа две (2) пары праймеров и два (2) зонда были смешаны вместе с образцом. Праймерами ДНК, применяемыми в анализе зиготности, который определяет присутствие кодирующей последовательности токсина Cry1B.868, были праймеры SQ50998 (SEQ ID NO: 21) и SQ50997 (SEQ ID NO: 22). ДНК-зонд, меченный VIC®, использованный в анализе зиготности, который определяет присутствие кодирующей последовательности токсина Cry1B.868, представлял собой PB54340 (SEQ ID NO: 23). Праймерами ДНК, применяемыми в анализе зиготности, который определяет присутствие кодирующей последовательности токсина Cry1Ba_7, были праймеры SQ50485 (SEQ ID NO: 24) и SQ50484 (SEQ ID NO: 25). ДНК-зонд, меченный VIC®, использованный в анализе зиготности, который определяет присутствие кодирующей последовательности токсина Cry1Da_7, представлял собой PB50138 (SEQ ID NO: 26). В обоих анализах определения зиготности применяется один и тот же внутренний контроль. Праймерами для внутреннего контроля были SQ20222 (SEQ ID NO: 18) и SQ20221 (SEQ ID NO: 19), и 6FAM™-меченным зондом для внутреннего контроля был PB50237 (SEQ ID NO: 20). Праймеры ДНК и зонд для Cry1B.868 или Cry1Ba_7 смешивали с праймерами и зондом для внутреннего контроля, как показано в табл. 30 и 31.

Таблица 30

ПЦР зиготности объекта кукурузы MON 95379 TAQMAN® для обнаружения Cry1B.868

Шаг	Реагент	Исходная концентрация (лЛ)	Объем (лЛ)	Конечная концентрация (лМ)	Комментарии
	Объем реакционной смеси		5		
1	2X Мастер-микс		2,4		1X конечная

					концентрация
2	Сгу1В.868-специфический праймер SQ50998	100	0,0225	0,45	
3	Сгу1В.868-специфический праймер SQ50997	100	0,0225	0,45	
4	Меченный 6FAM™ зонд PB50340 Сгу1В.868	100	0,005	0,1	Зонд светочувствителен
5	Праймер внутреннего контроля SQ20222	100	0,0225	0,45	
6	Праймер внутреннего контроля SQ20221	100	0,0225	0,45	
7	Меченный VIC® зонд PB50237 внутреннего контроля	100	0,005	0,1	Зонд светочувствителен
8	Извлеченная ДНК (матричная): • Образцы листьев для анализа • Отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК) • Отрицательный водный контроль (без матричного контроля) • Положительный контроль(и) числа копий Сгу1В.868		2,5		Для каждой матрицы проводятся отдельные реакции.

Таблица 31

ПЦР зиготности объекта кукурузы MON 95379 TAQMAN® для обнаружения Сгу1Da_7

Шаг	Реагент	Исходная концентрация (л л)	Объем (л л)	Конечная концентрация (л м)	Комментарии
	Объем реакционной смеси		5		
1	2X Мастер-микс		2,4		1X конечная концентрация
2	Сгу1Da_7-специфичный праймер SQ50485	100	0,0225	0,45	
3	Сгу1Da_7-специфичный праймер SQ50484	100	0,0225	0,45	

4	Сгу1Da_7-специфичный меченный 6FAM™ зонд PB50138	100	0,005	0,1	Зонд свсточувствителен
5	Праймер внутреннего контроля SQ20222	100	0,0225	0,45	
6	Праймер внутреннего контроля SQ20221	100	0,0225	0,45	
7	Меченный VIC® зонд PB50138 внутреннего контроля	100	0,005	0,1	Зонд свсточувствителен
8	Извлеченная ДНК (матричная): • Образцы листьев для анализа • Отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК) • Отрицательный водный контроль (без матричного контроля) • Положительный контроль(и) числа копий Сгу1Da_7		2,5		Для каждой матрицы проводятся отдельные реакции.

Смешивают отдельные реакционные смеси с применением ДНК, полученной из образца листа, зиготность которого неизвестна, отрицательного контроля ДНК, полученного из нетрансформированного растения кукурузы, отрицательного контроля без ДНК и положительного контроля с применением ДНК, полученной из трансгенного растения, гомозиготного по Сгу1В.868 или Сгу1Da_7, в зависимости от того, какая кодирующая последовательность токсина применяется для обнаружения. Затем реакционные смеси подвергаются термическим циклам, представленным в табл. 32.

Таблица 32
Условия термоциклера зиготности TAQMAN®

Шаг №	Количество циклов	Настройки
1	1	95°C 20 секунд
2	40	95°C 3 секунды
		60°C 20 секунд
3	1	10°C

После амплификации значения пороговых циклов (значения Ct) определяли для ампликона, соответствующего последовательности, кодирующей токсин, и гомозиготному однокопийному внутреннему стандарту. Определяли разницу (ΔCt) между значением Ct для однокопийного гомозиготного ампликона внутреннего стандарта и значением Ct ампликона последовательности, кодирующей токсин. Что касается зиготности, ΔCt около нуля (0) указывает на гомозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379, и ΔCt около одного (1) указывает на гетерозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379. Отсутствие ампликона, соответствующего кодирующей последовательности токсина насекомых, указывало на то, что образец является нулевым для вставленной Т-ДНК объекта MON 95379. Значения Ct в способе термической амплификации TAQMAN® будут иметь некоторую изменчивость из-за множества факторов, таких как эффективность амплификации и идеальные температуры отжига. Следовательно, диапазон "около одного (1)" определяется как ΔCt от 0,75 до 1,25.

Для каждого потомства, полученного от скрещивания с объектом MON 95379, были проведены анализы на обе последовательности, кодирующие токсин, чтобы гарантировать точность определения зиготности потомства.

Пример 9. Анализы для определения зиготности для объекта кукурузы MON 95379 с применением TAQMAN®.

В следующем примере описаны способы, пригодные для идентификации зиготности объекта MON 95379 в образце кукурузы.

Пары праймеров для ПЦР и зонда созданы с целью идентификации конкретных свойств аллелей, положительных и отрицательных в отношении вставки Т-ДНК, которая привела к объекту MON 95379. Примеры условий, которые можно применять в объект-специфичной ПЦР зиготности TAQMAN® представлены в табл. 33 и 34. Для этого анализа три праймера и два зонда были смешаны вместе с образцом.

Праймерами ДНК, использованными в анализе зиготности, были праймеры SQ50219 (SEQ ID NO: 15), SQ21524 (SEQ ID NO: 16) и PWTDNA (SEQ ID NO: 27). Зонды, применяемый в анализе зиготности, представляли собой 6FAM™-меченный зонд PB10269 (SEQ ID NO: 17) и VIC®-меченный зонд PRWTDNA (SEQ ID NO: 28). Праймеры SQ50219 (SEQ ID NO: 15) и SQ21524 (SEQ ID NO: 16) и 6FAM™-меченный зонд PB10269 (SEQ ID NO: 17) являются диагностическими для ДНК объекта MON 95379. SQ50219 (SEQ ID NO: 15) и PWTDNA (SEQ ID NO: 27) и VIC®-меченный зонд PRWTDNA (SEQ ID NO: 28) являются диагностическими, когда нет копии объекта MON 95379; то есть, они являются диагностическими в отношении аллеля дикого типа.

Когда три праймера и два зонда смешивают вместе в реакционной смеси для ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, гетерозиготного по объекту MON 95379, появляется флуоресцентный сигнал как от 6FAM™-меченного зонда PB10269 (SEQ ID NO: 17), так и VIC®-меченного зонда PRWTDNA (SEQ ID NO: 28), который является показателем и диагностическим признаком в отношении растения, гетерозиготного по объекту MON 95379. Когда три праймера и два зонда смешивают вместе в реакционной смеси для ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, гомозиготного по объекту MON 95379, появляется флуоресцентный сигнал только от 6FAM™-меченного зонда PB10269 (SEQ ID NO: 17) и не от VIC®-меченного зонда PRWTDNA (SEQ ID NO: 28). Когда три праймера и два зонда смешивают вместе в реакционной смеси для ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, которое является нулевым для объекта MON 95379 (то есть, дикого типа), появляется флуоресцентный сигнал только от VIC®-меченного зонда PRWTDNA (SEQ ID NO: 28). Образцы матричной ДНК и контроля для этого анализа представляли собой положительный контроль от кукурузы, содержащей ДНК объекта MON 95379 (как из известного гомозиготного, так и из известного гетерозиготного образца), отрицательный контроль из нетрансгенной кукурузы и отрицательный контроль, который не содержит матричную ДНК.

Таблица 33

ПЦР зиготности объекта MON 95379 TAQMAN®

Шаг	Реагент	Исходная концентрация (л Л)	Объем (л Л)	Конечная концентрация (л М)	Комментарии
	Объем реакционной смеси		5		
1	18 МОм воды		0,33		Поправка финального объема

2	2X Мастер-микс		2,5		1X конечная концентрация
3	Объект-специфичный праймер SQ51219	100	0,05	0,9	
4	Объект-специфичный праймер SQ21524	100	0,05	0,9	
5	Объект-специфичный 6FAM™ зонд PB10269	100	0,01	0,2	Зонд свечтчувствителен
6	Праймер аллеля ДТ PNEG DNA	100	0,05	0,9	
7	Меченный VIC® зонд PRBNEG DNA аллеля ДТ	100	0,01	0,2	Зонд свечтчувствителен
8	Извлеченная ДНК (матричная): • Образцы листьев для анализа • Отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК) • Отрицательный водный контроль (без матричного контроля) • Положительный качественный контроль(-и) ДНК MON 95379		2,5		Для каждой матрицы проводятся отдельные реакции.

Таблица 34

Условия термоциклера TAQMAN® для = зиготности

Шаг №	Количество циклов	Настройки
1	1	95°C 20 секунд
2	40	95°C 3 секунды
		60°C 20 секунд
3	1	10°C

Пример 10. Идентификация объекта кукурузы MON 95379 в любом селекционном посадочном материале, содержащем объект MON 95379.

В следующем примере описывается, как можно идентифицировать объект MON 95379 в потомстве любой селекционной активности с применением объекта кукурузы MON 95379.

Пары праймеров ДНК применяются для создания ампликона, диагностического в отношении объекта кукурузы MON 95379. Ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379, содержит по меньшей мере одну последовательность соединения. Последовательности соединения для объекта MON 95379 представляют собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, и SEQ ID NO: 8 ([1], [2], [3], [4], [5], [6], и [8], соответственно, на фиг. 1). SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность из пятидесяти (50) нуклеотидов, представляющую 5-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 1 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 838-887. SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность из пятидесяти (50) нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 2 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14156-14205. SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность из ста (100) нуклеотидов, представляющую 5-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 3 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 813-912. SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность из ста (100) нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 4 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14131-14230. SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность из двухсот (200) нуклеотидов, представляющую 5'-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 5 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 763-962. SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность из двухсот (200) нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения геномной ДНК

кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 6 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14081-14280. SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность из одной тысячи ста шестидесяти (1160) нуклеотидов, представляющую 5'-участок соединения геномной ДНК кукурузы и интегрированной кассеты экспрессии трансгена. SEQ ID NO: 7 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 1-1160. SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность из одной тысячи сто семьдесят восемь (1178) нуклеотидов, представляющую 3'-участок соединения интегрированной кассеты экспрессии трансгена и геномной ДНК кукурузы. SEQ ID NO: 8 находится в SEQ ID NO: 10 в положениях нуклеотидов 14039-15216.

Пары праймеров, которые будут давать ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379, включают пары праймеров, основанные на фланкирующих последовательностях (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12) и вставленной Т-ДНК (SEQ ID NO: 9). Чтобы получить диагностический ампликон, в котором обнаружены SEQ ID NO: 1, или SEQ ID NO: 3, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 7, можно создать молекулу прямого праймера на основе 5'-фланкирующей последовательности геномной ДНК кукурузы (SEQ ID NO: 11; от оснований 1 до 862 SEQ ID NO: 10) и молекулу обратного праймера, основанную на вставленной Т-ДНК (SEQ ID NO: 9; от положений 863 до 14180 SEQ ID NO: 10), в которых молекулы праймеров имеют достаточную длину смежных нуклеотидов для специфической гибридизации с SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 9. Чтобы получить диагностический ампликон, в котором обнаружены SEQ ID NO: 2, или SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, или SEQ ID NO: 8, можно создать молекулу прямого праймера на основе вставленной Т-ДНК (SEQ ID NO: 9; из положений 863 до 14180 SEQ ID NO: 10) и молекулу обратного праймера на основе 3'-фланкирующей последовательности геномной ДНК кукурузы (SEQ ID NO: 12; из положений 14181 по 15216 SEQ ID NO: 10), в которых молекулы праймеров имеют достаточную длину смежных нуклеотидов для специфической гибридизации с SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 12.

Для практических целей следует создать праймеры, которые производят ампликоны ограниченного диапазона размеров, предпочтительно от 200 до 1000 оснований. Ампликоны меньшего размера в целом более надежно продуцируются в реакциях ПЦР, позволяют сократить время цикла и могут быть легко разделены и визуализированы на агарозных гелях или адаптированы для применения в TAQMAN®-подобных анализах. Кроме того, ампликоны, полученные с применением пар праймеров, могут быть клонированы в векторы, размножены, выделены и секвенированы или могут быть секвенированы непосредственно способами, хорошо известными в данной области техники. Любая пара праймеров, полученная из комбинации SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 9, которые применимы в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379 или его потомства, является аспектом данного изобретения. Любая отдельная выделенная молекула полинуклеотидного праймера ДНК, содержащая по меньшей мере одиннадцать (11) смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 12 или их комплементы, которая может быть применена в способе амплификации ДНК для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379 или его потомства, является аспектом данного изобретения.

Пример условий амплификации для этого анализа проиллюстрирован в табл. 28 и 29. Любая модификация этих способов или применение праймеров ДНК, гомологичных или комплементарных SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, или последовательностей ДНК генетических элементов, содержащихся во вставке трансгена (SEQ ID NO: 9) объекта MON 95379, которые производят ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379, находится в рамках данной области техники. Диагностический ампликон содержит молекулу ДНК, гомологичную или комплементарную по меньшей мере одной ДНК трансгена/геномного соединения или ее значительной части.

Анализ для объекта MON 95379, содержащего образец ткани растения, должен включать положительный контроль ткани из растения, содержащего объект MON 95379, отрицательный контроль из растения кукурузы, который не содержит объект MON 95379 (например, LH244), и отрицательный контроль, который не содержит геномной ДНК кукурузы. Пара праймеров будет амплифицировать молекулу эндогенной ДНК кукурузы и будет служить в качестве внутреннего контроля для условий амплификации ДНК. Дополнительные последовательности праймеров могут быть выбраны из способов амплификации ДНК SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 9 специалистами в данной области техники. Условия, выбранные для получения ампликона способами, показанными в табл. 28 и табл. 29, могут отличаться, но приводят к ампликону, диагностическому в отношении ДНК объекта MON 95379. Применение последовательностей праймеров ДНК в способах табл. 28 и табл. 29 или с их модификациями находится в пределах объема изобретения. Ампликон, продуцируемый по меньшей мере одной последовательностью праймера ДНК, полученной из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 9, который является диагностическим признаком в отношении объекта MON 95379, представляет собой аспект изобретения.

Наборы для обнаружения ДНК, которые содержат по меньшей мере один праймер ДНК достаточной длины из смежных нуклеотидов, полученных из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 9, которые при применении в способе амплификации ДНК производят диагностический ампликон в отношении объекта MON 95379 или его потомства, представляют собой аспект изобретения. Растение или семя кукурузы, отличающиеся тем, что их геном будет продуцировать ампликон, диагностический в от-

ношении объекта MON 95379, при тестировании способом амплификации ДНК, представляют собой аспект изобретения. Анализ для ампликона объекта MON 95379 может быть выполнен с применением прикладных биосистем GeneAmp™ ПНР системы 9700, Stratagene Robocycler®, термоциклера Eppendorf® Mastercycler® Gradient или любой другой системы амплификации, которая может применяться для получения ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379, как показано в табл. 29.

Все публикации и опубликованные патентные документы, процитированные в данном описании и которые являются существенными для изобретения, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Проиллюстрировав и описав принципы данного изобретения, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что изобретение может быть модифицировано по компоновке и деталям без отступления от таких принципов. Мы претендуем на все модификации, которые находятся в рамках прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10 и полностью комплементарную ей.

2. Молекула рекомбинантной ДНК по п.1, отличающаяся тем, что молекула рекомбинантной ДНК получена из объекта кукурузы MON 95379, репрезентативный образец семени, содержащий указанный объект, депонирован под номером доступа в ATCC PTA-125027, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

3. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотидный сегмент достаточной длины для функционирования в качестве ДНК-зонда, который специфически гибридизуется в строгих условиях гибридизации с объектом кукурузы MON 95379 в образце, при этом обнаружение гибридизации указанной молекулы ДНК при указанных строгих условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении присутствия объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

4. Молекула ДНК по п.3, отличающаяся тем, что указанный образец включает растение кукурузы, клетку растения кукурузы, семя кукурузы, часть растения кукурузы, растение-потомок кукурузы, обработанное семя кукурузы, корм для животных, содержащий кукурузу, кукурузное масло, кукурузную муку крупного помола, кукурузную муку, кукурузные хлопья, кукурузные отруби, макаронные изделия из кукурузы, кукурузную биомассу и топливные продукты, произведенные с применением кукурузы и частей кукурузы.

5. Пара молекул ДНК, содержащих первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, отличную от первой молекулы ДНК, которые функционируют как праймеры ДНК при совместном применении в реакции амплификации с образцом, содержащим объект кукурузы MON 95379, пригодны для получения ампликона, диагностического в отношении присутствия указанного объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце, при этом указанный ампликон содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

6. Способ обнаружения присутствия сегмента ДНК, диагностического в отношении объекта кукурузы MON 95379 в образце, при этом указанный способ включает:

- а) приведение в контакт указанного образца с молекулой ДНК по п.3;
- б) подвергание указанного образца и указанной молекулы ДНК строгим условиям гибридизации и
- с) обнаружение гибридизации указанной молекулы ДНК с указанной ДНК в указанном образце,

при этом указанное обнаружение является диагностическим признаком в отношении присутствия указанного объекта кукурузы MON 95379 в указанном образце, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

7. Способ обнаружения присутствия сегмента ДНК, диагностического в отношении ДНК объекта кукурузы MON 95379 в образце, при этом указанный способ включает:

- а) приведение в контакт указанного образца с парой молекул ДНК по п.5;
- б) проведение реакции амплификации, достаточной для получения ампликона ДНК; и
- с) обнаружение присутствия указанного ампликона ДНК в указанной реакционной смеси,

при этом указанный ампликон ДНК содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

8. Растение кукурузы или его часть, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

9. Растение кукурузы или его часть по п.8, отличающиеся тем, что растение кукурузы или его часть являются инсектицидными, когда они содержатся в рационе насекомых-вредителей Lepidopteran.

10. Растение кукурузы или его часть по п.9, отличающиеся тем, что насекомое-вредитель Lepidopteran выбрано из группы, состоящей из осенней совки (*Spodoptera frugiperda*), совки кукурузной (*Helicoverpa zea*), огнёвки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), огнёвки сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*) и малого кукурузного мотылька (*Elasmopalpus lignosellus*).

11. Растение кукурузы или его часть по п.8, отличающиеся тем, что растение кукурузы дополнительно определяется как потомство любого поколения растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

12. Способ защиты растения кукурузы от заражения насекомыми, причем указанный способ включает введение в рацион насекомых-вредителей *Lepidopteran* инсектицидно эффективного количества клеток или тканей растения кукурузы, содержащих объект кукурузы MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанное насекомое-вредитель *Lepidopteran* выбрано из группы, состоящей из осенней совки (*Spodoptera frugiperda*), совки кукурузной (*Helicoverpa zea*), огнёвки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*), огнёвки сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*) и малого кукурузного мотылька (*Elasmopalpus lignosellus*).

14. Способ получения устойчивого к насекомым растения кукурузы, включающий:

а) скрещивание половым путем двух разных растений кукурузы, при этом по меньшей мере одно из двух разных растений кукурузы содержит трансгенный объект кукурузы MON 95379;

б) отбор образцов семян или ткани от потомства указанного скрещивания;

с) обнаружение присутствия сегмента ДНК, диагностического в отношении объекта кукурузы MON 95379, в указанном образце из стадии б) для идентификации потомства, содержащего ДНК объекта кукурузы MON 95379; и

д) отбор указанного потомства, содержащего объект кукурузы MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

15. Семя кукурузы, содержащее обнаруживаемое количество молекулы рекомбинантной ДНК по п.1.

16. Неживой растительный материал кукурузы, содержащий обнаруживаемое количество молекулы рекомбинантной ДНК по п.1, где неживой растительный материал является частью растения кукурузы, включающего молекулу рекомбинантной ДНК.

17. Растительная клетка для регенерации трансгенного растения, где растительная клетка включает молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

18. Товарный продукт, содержащий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1, где товарный продукт выбран из группы, состоящей из кукурузной муки крупного помола или кукурузной муки.

19. Растение кукурузы, часть растения кукурузы или семя кукурузы, содержащие ДНК, функционирующую в качестве матрицы при тестировании в способе амплификации ДНК, дающем ампликон, диагностический в отношении присутствия ДНК объекта MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

20. Способ определения зиготности растения кукурузы или семени кукурузы, содержащих объект MON 95379, включающий:

а) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с парой праймеров, которая способна производить ампликон одной из кодирующих токсин последовательностей, кодирующих *Cry1B.868* или *Cry1Da_7*;

б) приведение в контакт указанного образца, содержащего ДНК кукурузы, с парой праймеров, способной производить ампликон внутреннего стандарта, который, как известно, является однокопийным и гомозиготным в растении кукурузы;

с) приведение в контакт образца ДНК с набором зондов, который содержит, по меньшей мере, первый зонд, который специфически гибридизуется с одной из кодирующих токсин последовательностей, кодирующих *Cry1B.868* или *Cry1Da_7*, и второй зонд, который специфически гибридизуется с геномной ДНК внутреннего стандарта, которая, как известно, является однокопийной и гомозиготной в растении кукурузы;

д) проведение реакции амплификации ДНК с применением ПЦР в реальном времени и определение значений пороговых циклов (значений C_t) ампликона, соответствующего последовательности, кодирующей токсин, и однокопийному гомозиготному внутреннему стандарту;

е) определение разницы (ΔC_t) между значением C_t для однокопийного гомозиготного ампликона внутреннего стандарта и значением C_t ампликона кодирующей токсин последовательности и

ф) определение зиготности, где ΔC_t около нуля (0) указывает на гомозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379, и ΔC_t около единицы (1) указывает на гетерозиготность вставленной Т-ДНК объекта MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1, которая содержит последовательности, кодирующие токсин, кодирующие *Cry1B.868* или *Cry1Da_7*.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что пары праймеров выбраны из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 и последовательности SEQ ID NO: 21 в сочетании с SEQ ID NO: 22; и при этом зонды представляют собой последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 23.

22. Способ по п.20, отличающийся тем, что пары праймеров выбраны из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 18 в сочетании с SEQ ID NO: 19 и последовательности SEQ ID NO: 24 в сочетании с SEQ ID NO: 25; и при этом зонды представляют собой последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 26.

23. Способ по п.20, отличающийся тем, что значение ΔC_t около одного (1), указывающее на гетерозиготность вставленной T-ДНК объекта MON 95379, находится в диапазоне от 0,75 до 1,25.

24. Способ определения зиготности растения кукурузы или семени кукурузы, содержащих объект MON 95379, включающий:

а) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с набором пар праймеров, содержащим по меньшей мере две разные пары праймеров, способных производить первый ампликон, диагностический в отношении объекта MON 95379, и второй ампликон, диагностический в отношении геномной ДНК нативной кукурузы, не содержащей объект MON 95379;

б) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с образцом и набором пар праймеров и

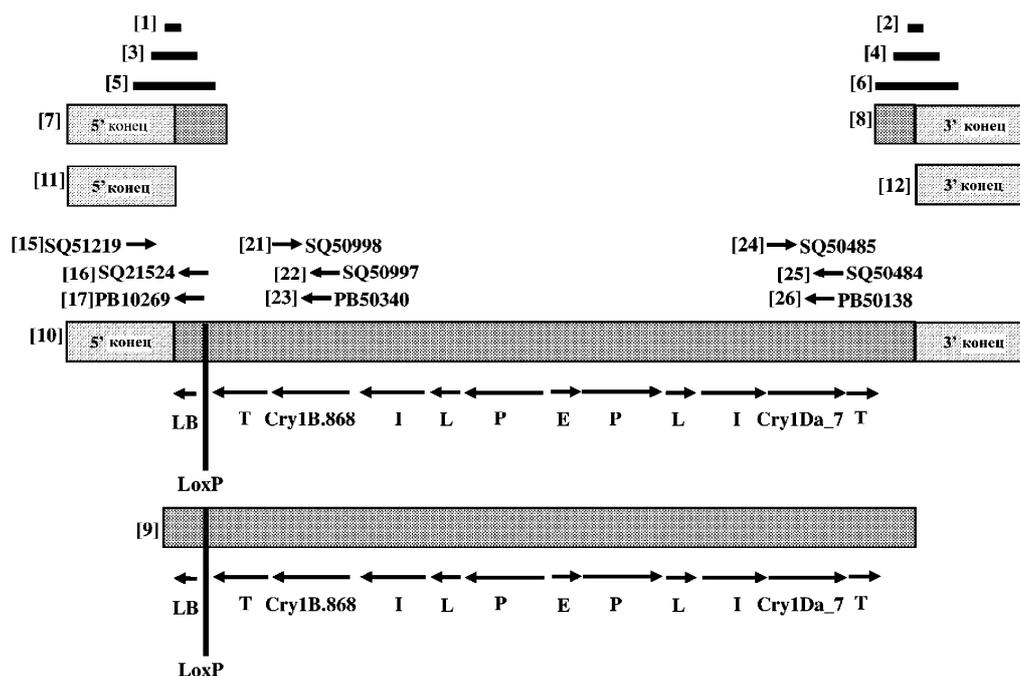
с) обнаружение в реакционной смеси для амплификации нуклеиновой кислоты первого ампликона, диагностического в отношении объекта MON 95379, или второго ампликона, диагностического в отношении геномной ДНК нативной кукурузы, не содержащей объект MON 95379, при этом присутствие только первого ампликона является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гомозиготных по объекту MON 95379, и присутствие как первого ампликона, так и второго ампликона является диагностическим признаком растения кукурузы или семени кукурузы, гетерозиготных по объекту MON 95379; или

i) приведение в контакт образца, содержащего ДНК кукурузы, с набором зондов, который содержит, по меньшей мере, первый зонд, который специфически гибридизуется с ДНК объекта MON 95379, и, по меньшей мере, второй зонд, который специфически гибридизуется с геномной ДНК кукурузы, которая была разрушена вставкой гетерологичной ДНК объекта MON 95379 и не гибридизуется с ДНК объекта MON 95379; и

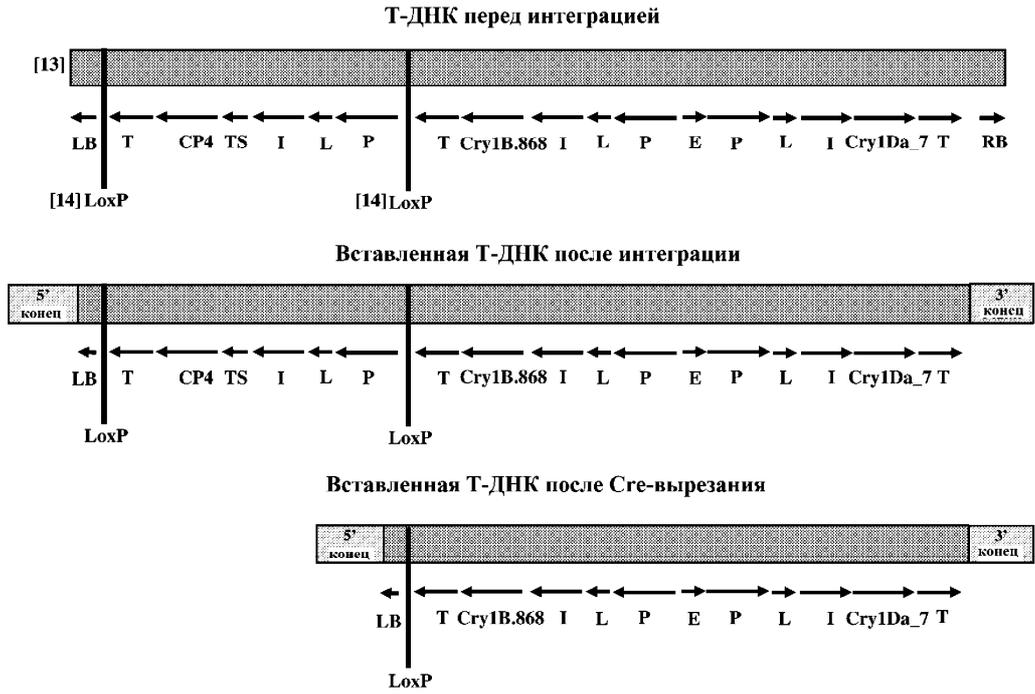
ii) гибридизация набора зондов с образцом в строгих условиях гибридизации, при этом обнаружение гибридизации только первого зонда в условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гомозиготных по объекту MON 95379, и при этом обнаружение гибридизации как первого зонда, так и второго зонда в условиях гибридизации является диагностическим признаком в отношении растения кукурузы или семени кукурузы, гетерозиготных по объекту MON 95379, где объект кукурузы MON 95379 определен как включающий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что набор пар праймеров содержит последовательности SEQ ID NO: 15 в сочетании с SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 15 в сочетании с SEQ ID NO: 27.

26. Способ по п.24, отличающийся тем, что набор зондов содержит последовательности SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 28.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

