

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991554 (13) А1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.14

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.12.22

(54) ЭЛИТНЫЙ ТРАНСГЕННЫЙ ОБЪЕКТ ЕЕ-GM5 И СПОСОБЫ И НАБОРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТАКОГО ТРАНСГЕННОГО ОБЪЕКТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

(31) 62/437,874; 62/481,292

(72) Изобретатель:

(32) 2016.12.22; 2017.04.04

Мозер Хэл (US), Буйзе Максим,

(33) US

Слаббинк Филип (BE), Байлинсон

(86) PCT/US2017/068121

Вадим, Клевен Том, Даум Юлия (US),

(87) WO 2018/119364 2018.06.28

Аартсен Венди, Хабекс Феерле (BE),

(71) Заявитель:

Мэккарвил Майкл (US)

БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШИНС СИД УС ЛЛСИ (US)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к специфическим трансгенным растениям сои, растительному материалу и семенам, характеризующимся тем, что эти продукты несут полученный в результате трансформации трансгенный объект, обеспечивающий специфическую устойчивость к нематодам и выносливость к гербицидам, в специфическом местоположении в геноме сои. Также представлены средства, которые обеспечивают быструю и точную идентификацию трансгенного объекта в биологических образцах.

201991554

А1

А1

201991554

ЭЛИТНЫЙ ТРАНСГЕННЫЙ ОБЪЕКТ ЕЕ-GM5 И СПОСОБЫ И НАБОРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТАКОГО ТРАНСГЕННОГО ОБЪЕКТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

5

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно находящейся на предварительном рассмотрении заявке на выдачу патента США с порядковым № 62/437874, поданной 22 декабря 2016 года, и находящейся на предварительном рассмотрении заявке на выдачу патента США с порядковым № 62/481292, поданной 4 апреля 2017 года, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к новым нуклеиновым кислотам и трансгенным растениям сои, растительному материалу и семенам, характеризующимся наличием специфического трансгенного объекта, являющегося результатом трансформации, в частности присутствием генов, обеспечивающих устойчивость к нематоде и выносливость к гербицидам, в специфическом местоположении в геноме сои. Растения сои по настоящему изобретению объединяют в себе фенотип устойчивости к нематоде и выносливости к гербицидам с агрономической продуктивностью, генетической стабильностью и функциональностью в различных генетических фонах, эквивалентных соответствующему генетическому фону нетрансформированной сои в отсутствии гербицида-ингибитора (гербицидов-ингибиторов) НРРД или заражения нематодой. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам и наборам для идентификации присутствия растительного материала, содержащего специфический трансгенный объект ЕЕ-GM5, являющийся результатом трансформации, в биологических образцах.

15

20

25

Уровень техники изобретения

Фенотипическая экспрессия трансгена в растении определяется как структурой гена или собственно генов, так и его или их местоположением в геноме растения. В то же время присутствие трансгенов или "вставленной Т-ДНК" в различных местоположениях в геноме различными путями влияет на общий фенотип растения. Агрономически или промышленно успешное внедрение путем генетической манипуляции в организм растения признака, представляющего интерес с коммерческой точки зрения, в зависимости от различных факторов, может представлять собой продолжительную процедуру. Фактическая трансформация и регенерация генетически

30

35

трансформированных растений являются лишь первыми в ряде стадий отбора, которые включают подробную генетическую характеристику, интрогрессию и оценку в полевых испытаниях, что в конечном итоге приводит к отбору элитного трансгенного объекта.

Важность окончательной идентификации элитного трансгенного объекта 5 возрастает в свете обсуждения новых пищевых продуктов/кормов, разделения продуктов на продукты на основе генетически модифицированных и немодифицированных организмов и идентификации патентованных материалов. В идеале такой способ идентификации является как быстрым, так и простым, не требующим масштабного лабораторного оборудования. Кроме того, этот способ должен обеспечивать результаты, 10 позволяющие однозначно определить элитный трансгенный объект без экспертной интерпретации, однако при необходимости выдерживать экспертную оценку.

Выращивание устойчивых к нематоде и выносливых к гербицидам сортов ЕЕ-GM5 сои обеспечивает растениеводов новыми вариантами для контроля нематод и сорняков с использованием гербицидов-ингибиторов HPPD, таких как гербициды изоксафлутол (IFT), топрамезон или мезотрион (MST). Гербициды-ингибиторы HPPD обеспечивают альтернативный вариант контроля сорняков для растениевода сои, который помогает бороться с проблемными видами сорняков, и в качестве альтернативного средства действия, способствующего замедлению распространения устойчивых к гербицидам сорняков.

Соевая цистообразующая нематода (SCN) *Heterodera glycines* (Ichinohe), всемирная проблема для производства сои, представляет постоянную угрозу для производителей. Со времен ее первого выявления в США в 1954 году в одном районе Северной Каролины SCN распространилась почти во всех штатах, производящих сою в Соединенных Штатах Америки, и по оценкам приводит к ежегодным потерям урожая в США более чем на 1,2 миллиарда долларов, что делает ее самым вредоносным соевым патогеном. SCN была впервые обнаружена в Бразилии в начале 1990-х годов и с тех пор распространилась по всей Южной Америке, являясь одним из наиболее важных патогенов в Бразилии, вызывающих потери практически во всех регионах культивирования в Бразилии. Аналогичным образом, SCN продолжает распространяться в регионах Китая, выращивающих сою, при этом обнаруживается в 15 провинциях с оценкой потерь урожая более 120 миллионов долларов. Многолетнее исследование в штате Айова, США (2001–2015 гг.), где почти все устойчивые к SCN сорта содержат

устойчивость к SCN из PI88788, показало, что вирулентность популяций SCN с годами увеличивалась, что привело к увеличению показателя сезонной плотности популяций SCN и снижению урожайности устойчивых к SCN сортов сои с источником устойчивости PI88788 (Mitchum (2016), *Phytopathology* 106 (12): 1444-1450, Allen et al.

5 (2017) *Plant Health Progr.* 18:19-27, Arias et al. (2017) www.researchgate.net/publication/266907703_RESISTANCE_TO_SOYBEAN_CYST_NEMATODE_GENETICS_AND_BREEDING_IN_BRAZIL; McCarville et al. (2017) *Plant Health Progress* 18 :146-155).

Корневая ранящая нематода *Pratylenchus brachyurus* становится все более важным патогеном сои. Она имеет широкий спектр хозяев и широко распространена в тропических и субтропических регионах, особенно в Бразилии, Африке и на юге Соединенных Штатов Америки. *Pratylenchus brachyurus* стала проблемой среди производителей хлопка и сои в регионе Серрадо в Бразилии и считается основным нематодным патогеном сои в данном регионе. Эта нематода может снижать урожайность сои на 30-50%, причем на песчаных почвах наблюдается более значительный ущерб. Использование устойчивых сортов сои было бы лучшим способом контроля этой нематоды, однако устойчивые к *P. brachyurus* сорта не были выявлены до настоящего времени. Хотя несколько генотипов сои были изучены на предмет устойчивости к *Pratylenchus brachyurus*, и у некоторых культиваров идентифицирована повышенная выносливость, культивары, селекционно устойчивые к *P. brachyurus*, имеют трудности, возникающие из-за того, что эта нематода является полифагом и не имеет тесного взаимодействия со своими хозяевами (Machado (2014) *Current Agricultural Science and Technology* 20:26-35; Antonio et al. (2012) *Soil productivity losses in area infested by the nematoid of the root lesions in Vera, MT. In: Brazilian Congress of Soy, 6, 2012, Cuiabá. Abstracts. Londrina: Embrapa Soja, 4pp*; Rios et al. (2016) *Ciência Rural* 46:580–584; Lima et al., 2017, Chapter 6 in the book: *Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity*; Edited by Minobu Kasai, ISBN 978-953-51-3118-2, Print ISBN 978-953-51-3117-5, InTech; Inomoto et al. (2011) *Sucessão de culturas sob pivô central para controle de fitonematoídes: variação populacional, patogenicidade e estimativa de perdas*. *Tropical Plant Pathology* 36:178-30 185).

Известно, что защита растений от нематод, таких как SCN, может помочь растениям лучше преодолевать другие стрессы, такие как состав/содержание почвы,

погодные условия, вызываемый патогенами стресс, применения гербицидов и т. д. В частности, когда такие другие стрессы дают фенотип, который легко визуально различим, как например, хлороз/пожелтение листьев, эффект контроля SCN легче заметить, в то время как в ином случае зачастую является не заметным. Например, когда у растений сои имеется синдром внезапной смерти (SDS) или железодефицитный хлороз (IDC), защита от SCN приведет к тому, что растения станут более зелеными или будут иметь менее выраженные симптомы SDS/IDC. Несмотря на обширные исследования и усилия по скринингу сортов, дефицит железа остается проблемой в крупных районах выращивания сои на севере центральной части США. Важность этой проблемы возросла в связи с расширением выращивания сои на почвах, чувствительных к дефициту железа, и с возможным воздействием изменений системы культивирования. Дефицит железа возникает в почвах с высоким pH и карбонатами, но выраженность дефицита железа на участке сильно варьирует из-за взаимодействия с пространственно изменяющимися свойствами почвы, такими как содержание влаги, засоленность, наличие железа и концентрации других микроэлементов и металлов. Кроме того, выраженность дефицита железа взаимодействует с биотическими факторами, такими как фиксация азота, вредители, болезни, и со стрессами, вызванными агротехническими средствами, такими как внесение гербицидов. Отбор сортов является наиболее важным средством борьбы с дефицитом железа, но при этом отбор сортов осложняется большим генотипом из-за взаимодействия с окружающей средой, связанного с выносливостью к хлорозу (Hansen et al. (2004) *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(7):983-987).

Синдром внезапной смерти (SDS) сои был впервые обнаружен в 1971 году в Арканзасе и с тех пор был подтвержден в большинстве районов выращивания сои в США. SDS является микозом, который также встречается в комплексе болезней с соевой цистообразующей нематодой (SCN). SDS является одной из наиболее вредоносных передающихся через почву болезней сои в США. Когда эта болезнь возникает в присутствии SCN, симптомы появляются раньше и являются более тяжелыми. SDS вызывается почвенными грибами группы видового комплекса *Fusarium solani*. В Северной Америке возбудителем является *Fusarium virguliforme*, ранее *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. В Южной Америке *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* и *F. virguliforme* вызывают симптомы SDS. Несмотря на то, что были разработаны сорта сои, которые менее восприимчивы к SDS, высокоустойчивые сорта отсутствуют. Гриб

может заражать корни проростков сои вскоре после высаживания, но симптомы SDS на надземной части проявляются редко, пока растения сои не достигает репродуктивной стадии. Гриб продуцирует токсины в корнях, которые перемещаются в листья. Первыми заметными симптомами SDS являются пожелтение и дефолиация верхних листьев. Если 5 болезнь развивается в начале сезона, цветки и молодые бобы останутся недоразвитыми. Когда болезнь развивается позже, растение будет производить меньше семян на боб или более мелкие семена. Чем раньше развивается тяжелая болезнь, тем больше снижается урожайность. Поскольку вызывающий SDS гриб может сохраняться в почве в течение длительных периодов, на более крупных участках поля симптомы заболевания будут 10 проявляться каждый вегетационный период, пока не будет поражена большая часть поля. (Westphal et al. (2008). Sudden Death Syndrome of Soybean. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2008-0102-01,
www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/SuddenDeath.aspx).

В настоящее время в продаже отсутствуют растения сои, генетически сконструированные для устойчивости к нематоде. В уровне техники были описаны 15 растения сои, содержащие один или несколько генов выносливости к гербицидам. В WO2006/130436 описывается выносливый к глифосату трансгенный объект сои, содержащий ген *epsps*, а в WO2011/034704 описывается выносливый к дикамбе трансгенный объект сои. В WO2012/082548 описываются растения сои, содержащие и 20 ген *hppd*, и ген *pat*. В WO2011/063411 описывается трансгенный объект сои с выносливостью к ингибиторам HPPD и глифосату, тогда как в WO2011/063413 описываются растения сои с выносливостью к ингибиторам HPPD, глюфосинату и глифосату. В WO2011/066384 описывается трансгенный объект сои с выносливостью к 2,4-D и глюфосинату, тогда как в WO2012/075426 описывается трансгенный объект сои 25 с выносливостью к 2,4-D, глюфосинату и глифосату, а в WO2017/059795 описывается трансгенный объект сои с выносливостью к глифосату. В WO2009/064652 описывается трансгенный объект сои с устойчивостью к насекомым, относящимся к чешуекрылым, а в WO2013/016527 описывается трансгенный объект сои с устойчивостью к насекомым, 30 относящимся к чешуекрылым, и выносливостью к глюфосинату.

Гены и белки HPPD, которые придают улучшенную выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD, были раскрыты, например, в WO2015138394, WO2015135881, WO2014043435, а нематоцидная активность белков Сгу была описана, например, в

WO2010027805, WO2010027809, WO2010027804, WO2010027799, WO2010027808, а также в WO2007147029.

Ни одно из раскрытий предшествующего уровня техники не описывает или не предусматривает элитный трансгенный объект в сое, содержащей активный в отношении нематод ген Сгу, и, конечно же, элитный трансгенный объект в сое, содержащее активный в отношении нематод ген Сгу в сочетании с геном, обеспечивающим выносливость к ингибиторам HPPD.

Из уровня техники известно, что получение коммерческого элитного трансгенного объекта, являющегося результатом трансформации, в растениях сои с приемлемой агрономической характеристикой ни в коей мере не является простым.

Краткое описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок Сгу14Ab-1, такой как кодирующая *cry14Ab-1.b* последовательность под SEQ ID No. 7, или последовательность, кодирующая нематоцидный белок Сгу14Ab, характеризующаяся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID No.7. Также в настоящем документе представлена нуклеиновая кислота, кодирующая белок HPPD-4, такая как кодирующая *hppdPf-4R* последовательность под SEQ ID No. 9, или последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID No. 9, где указанная последовательность кодирует белок HPPD, обеспечивающий выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD при экспрессии в растении. Также в настоящем документе представлены химерный ген *cry14Ab-1.b*, содержащий последовательность от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 5276 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или химерный ген *cry14Ab-1.b*, содержащий последовательность от положения нуклеотида 412 до положения нуклеотида 3969 из SEQ ID No. 11, функционально связанную с промотором, обеспечивающим экспрессию в растении, или последовательность, кодирующую нематоцидный белок Сгу14Ab, характеризующуюся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с последовательностью от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 5276 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательностью, или с

последовательностью от положения нуклеотида 412 до положения нуклеотида 3969 из SEQ ID No. 11 (при функциональной связи с экспрессируемым в растении промотором). Кроме того, в настоящем документе представлен химерный ген *hppdPf-4Pa*, содержащий последовательность от положения нуклеотида 5382 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или содержащий последовательность от положения нуклеотида 5589 до положения нуклеотида 6665 из SEQ ID No. 11, функционально связанную с промотором, обеспечивающим экспрессию в растении, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с последовательностью от положения нуклеотида 5382 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей последовательностью, или с последовательностью от положения нуклеотида 5589 до положения нуклеотида 6665 из SEQ ID No. 11 (при функциональной связи с экспрессируемым в растении промотором); где указанная последовательность кодирует белок HPPD, обеспечивающий выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD при экспрессии в растении, а также нуклеиновая кислота, содержащая указанный химерный ген *cry14Ab-1.b* и указанный химерный ген *hppdPf-4Pa*. Эти нуклеиновые кислоты или гены применимы для трансформации растений, таких как соя, хлопчатник, кукуруза, рис, рапс и пшеница, таким образом, что они контролируют нематоды и/или обладают выносливостью к гербициду-ингибитору HPPD.

Также в настоящем документе представлена химерная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 7941 из SEQ ID No. 11 или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В одном варианте осуществления данная молекула ДНК кодирует белок, выносливый к ингибитору HPPD, и белок, отрицательно воздействующий на нематод-вредителей растений, таких как нематоды SCN, RKN или *Pratylenchus* spp. В одном варианте осуществления данной химерной молекула ДНК кодирует белок под SEQ ID No. 8 или контролирующий нематод белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему, и белок под SEQ ID No. 10 или белок, придающий выносливость к ингибитору HPPD, который на по меньшей мере 99% идентичен ему. Также представлены растения, семена или клетки, такие как растения сои, семена или

клетки, трансформированные так, что они содержат такую молекулу ДНК, и применение такой молекулы ДНК для придания растениям или семенам, таким как растения сои или семена, устойчивости к нематодам и выносливости к гербицидам-ингибиторам HPPD.

На 5 настоящем изобретение относится к трансгенному растению сои, части растения, его семени, клетки или ткани, содержащим стабильно интегрированную в его геном кассету экспрессии, которая содержит ген устойчивости к нематоде, содержащий кодирующую последовательность гена *cry14Ab-1.b*, и ген выносливости к гербицидам, содержащий кодирующую последовательность гена *hppdPf-4Pa* (оба описаны в примере 1.1 в настоящем документе и представлены под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно), которые обес печивают устойчивость к паразитирующим на растении нематодам, таким как соевая цистообразующая нематода, и выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. При отсутствии давления гербицида-ингибитора HPPD и нематоды такое растение сои обладает агрономической характеристикой, которая по сути эквивалентна такой же характеристике у нетрансгенной изогенной линии. В условиях давления соевой цистообразующей нематоды (SCN), влияющего на продуктивность растения в поле, растения по настоящему изобретению будут иметь превосходящий агрономический фенотип по сравнению с нетрансгенным растением. Также в присутствии сорняков после внесения гербицида-ингибитора HPPD, к которому обеспечена выносливость, растения по настоящему изобретению будут иметь превосходящий агрономический фенотип по сравнению с растениями, которые не были обработаны гербицидами.

20

В соответствии с настоящим изобретением растение сои или его семя, клетки или ткани содержат элитный трансгенный объект EE-GM5. В одном варианте осуществления элитный трансгенный объект EE-GM5 содержит последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24, или последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25, или любые последовательности, которые по сути сходны с ними. В одном варианте осуществления EE-GM5 содержит последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 и последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или любые последовательности, которые по сути сходны с ними, а также кодирующую *cry14Ab-1.b* последовательность под SEQ ID No. 7 и кодирующую *hppdPf-4Pa* последовательность под SEQ ID No. 9 или последовательности, которые по сути сходны с ними. В одном варианте осуществления элитный трансгенный объект EE-GM5 представляет собой Т-

30

ДНК, вставленную в определенное местоположение в геноме сои, в котором она расположена в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером депонирования РТА-123625. В одном варианте осуществления такая Т-ДНК в EE-GM5 содержит химерный ген, кодирующий Cgy14Ab-1, и ген, кодирующий HPPD-4. В другом варианте осуществления указанный объект характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3, или 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4; или 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4. В одном варианте осуществления геномная ДНК, содержащая EE-GM5, при анализе с использованием полимеразной цепной реакции ("ПЦР" в настоящем документе) с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 85 п.о. В одном варианте осуществления геномная ДНК, содержащая EE-GM5, при анализе с использованием ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 84 п.о.

В одном варианте осуществления настоящего документа представлены растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, каждое из которых содержит элитный трансгенный объект EE-GM5 в своем геноме, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект было депонировано в ATCC под номером депонирования РТА-123625. В одном варианте осуществления растение или семя, содержащие EE-GM5, получают путем размножения и/или селекции растения сои, выращенного из семени, депонированного в ATCC под номером депонирования РТА-123625.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к трансгенному растению сои, его части растения, пыльце, семени, клетке или ткани, геномная ДНК которых характеризуется тем, что при анализе с помощью ПЦР, как описывается в настоящем документе, с использованием по меньшей мере двух праймеров, направленных на участок, образованный частью 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM5 и частью вставленной Т-ДНК, амплифицируется фрагмент, который является специфическим для трансгенного объекта EE-GM5. Праймеры могут быть направлены на 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в пределах SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO. 25 или геномной ДНК растения сои, расположенной в 3'-направлении от него и являющейся смежной с ним, и вставленную Т-ДНК, расположенную в 5'-направлении от него и

являющейся смежной с ним. Праймеры могут также быть направлены на 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в пределах SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO. 24 или геномной ДНК растения сои, расположенной в 3'-направлении от него и являющейся смежной с ним, и вставленной Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении и являющейся смежной с ним. В 5 одном варианте осуществления такие праймеры содержат или состоят (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, или под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19, или под SEQ ID NO. 26 и SEQ ID NO. 28, или под SEQ ID NO. 27 и SEQ ID NO. 29 соответственно (например, пара праймеров, содержащая праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID 10 NO: 12, и праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 13, или пара праймеров, содержащая праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18, и праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19, или пара праймеров, содержащая праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID 15 NO: 26, и праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 28, или пара праймеров, содержащая праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 27, и праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 29), и дают фрагмент ДНК размером от 50 до 1000 20 п.о., как например, фрагмент длиной 85 п.о. или 84 п.о.

Эталонное семя, содержащее элитный трансгенный объект по настоящему изобретению, было депонировано в ATCC под номером доступа PTA-123625. Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой элитный трансгенный объект EE-GM5, содержащийся в семени, депонированном под номером доступа PTA-123625, который при введении в растение сои будет обеспечивать устойчивость к нематодам и выносливость к гербицидам, в частности, устойчивость к соевой цистообразующей нематоде (*Heterodera glycines*, в настоящем документе "SCN") 25 и/или ранящей нематоде («ранящая нематода», используемая в настоящем документе, относится к нематодам-вредителям сои *Pratylenchus* spp., в том числе без ограничения 30 *Pratylenchus brachyurus*), и выносливость к ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. Растения с EE-GM5 по настоящему изобретению также

контролируют галловую нематоду («галловая нематода», используемая в настоящем документе, относится к нематодам-вредителям сои *Meloidogyne* spp., в том числе без ограничения к *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla* или *Meloidogyne javanica*, или любой их комбинации), почковидную нематоду (*Rotylenchulus reniformis*) и ланцетную нематоду (*Hoplolaimus* spp. таких как *H. columbus*, *H. galeatus* и *H. magnistylus*). Настоящее изобретение относится к минорным вариантам этого трансгенного объекта, таким как трансгенный объект сои с выносливостью к ингибитору HPPD и устойчивостью к нематоде SCN, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью EE-GM5, содержащегося в семени, депонированном в ATCC под номером депонирования РТА-123625, или трансгенный объект сои с выносливостью к ингибитору HPPD и устойчивостью к нематоде SCN, который содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся по 1-200, 1-150, 1-100, 1-75, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5 нуклеотидам от нуклеотидной последовательности EE-GM5, содержащегося в семени, депонированном в ATCC под номером депонирования РТА-123625, или которое содержит нуклеотидную последовательность, отличающуюся по 1-200, 1-150, 1-100, 1-75, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5 нуклеотидам от нуклеотидной последовательности, образованной следующими последовательными нуклеотидными последовательностями (5'-3'): SEQ ID No. 5 или SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 11 от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7101 и SEQ ID No. 6 или SEQ ID No. 25. В одном варианте осуществления EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность с по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с последовательностью, образованной следующими последовательными нуклеотидными последовательностями (5'-3'): SEQ ID No. 5 или 24, SEQ ID No. 11 от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7101 и SEQ ID No. 6 или 25. Из-за естественной генетической изменчивости у растений одного и того же вида обычно встречаются различия в отдельных основаниях ДНК и небольшие вставки и делеции в гомологичных последовательностях ДНК (например, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP)) (Zhu et al. (2003) Genetics 163: 1123-1134).

Семя с номером депонирования РТА-123625 в АТСС представляет собой чистую партию трансгенных семян, гомозиготных по элитному трансгенному объекту ЕЕ-GM5 по настоящему изобретению, которые вырастут в растения, устойчивые к нематодам, благодаря чему растения также выносливы к ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. Семя или семя-потомок, получаемое из депонированного семени (например, после скрещивания с другими растениями сои с другим генетическим фоном), может быть высажено, и растущие растения могут быть обработаны ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, как описывается в настоящем документе, или могут быть протестированы на присутствие ЕЕ-GM5, как описывается в настоящем документе, для получения растений, содержащих элитный трансгенный объект по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам, семенам, тканям, потомству и потомкам растения, содержащего элитный трансгенный объект по настоящему изобретению, выращенного из семени, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-123625.

Кроме того, настоящее изобретение относится к растениям, получаемым из (например, путем размножения и/или селекции) растения сои, содержащего элитный трансгенный объект по настоящему изобретению (например, из растения, выращенного из семени, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-123625, или растения, содержащего кодирующую HPPD-4 последовательность под SEQ ID No. 9 и кодирующую *cry14Ab-1.b* последовательность, под SEQ ID No. 7, расположенные между последовательностью под SEQ ID No. 1, 3 или 5 и последовательностью под SEQ ID No. 2, 4 или 6, или растения, содержащего кодирующую *hppdPf-4Pa* последовательность под SEQ ID No. 9 и кодирующую *cry14Ab-1.b* последовательность под SEQ ID No. 7, расположенные между любой из последовательности под SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 и последовательности под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25). Настоящее изобретение также относится к потомкам растений и семенам, полученным из упомянутых выше растений или семени и содержащим последовательность под SEQ ID No. 1 и последовательность под SEQ ID No. 2, или последовательность под SEQ ID No. 3 и последовательность под SEQ ID No. 4, или последовательность под SEQ ID No. 5 и последовательность под SEQ ID No. 6, или последовательность под SEQ ID No. 24 и последовательность под SEQ ID No. 25.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу идентификации трансгенного растения или его клеток или тканей, содержащих элитный трансгенный

объект EE-GM5, при этом способ основан на идентификации присутствия характеризующих последовательностей ДНК или аминокислот, кодируемых такими последовательностями ДНК в трансгенных растениях, клетках или тканях. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения такими 5 характеризующими последовательностями ДНК являются последовательности размером 15 п.о. или по меньшей мере 15 п.о., предпочтительно 20 п.о. или по меньшей мере 20 п.о., наиболее предпочтительно 30 п.о. или больше, которые содержат сайт вставки трансгенного объекта, т. е. последовательность, содержащую и часть вставленной Т-ДНК, содержащей трансген устойчивости к ингибитору НРРД и к нематоде, и часть 5'-или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, смежного с ней, которая простирается в геном растения сои, что обеспечивает специфическую идентификацию элитного трансгенного объекта. Настоящее изобретение также относится к растениям, семенам и клеткам, содержащим трансгенный объект EE-GM5, идентифицированный в настоящем документе.

15 Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом способы основаны на парах праймеров или зондах, которые специфически распознают 5'- и/или 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, и смежную с ними вставленную последовательность Т-ДНК в EE-GM5. Любые другие способы идентификации EE-GM5, 20 например, идентификации его специфических характеризующих последовательностей, также предусмотрены в настоящем документе, такие как секвенирование полного генома или части генома (направленное).

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу идентификации 25 элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, предусматривающему амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с использованием полимеразной цепной реакции с по меньшей мере двумя праймерами, или полимеразной цепной реакции с по меньшей мере двумя праймерами и зондом, где один из этих праймеров 30 распознает 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК в EE-GM5, другой праймер распознает последовательность в Т-ДНК, содержащую гены выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, которая является смежной с указанным 5'- или 3'-участком, фланкирующим Т-ДНК, предпочтительно с получением фрагмента ДНК размером 50-

1000 п.о. В одном варианте осуществления первый праймер распознает 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в ЕЕ-GM5, а второй праймер распознает последовательность в Т-ДНК, содержащую гены выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, которая расположена в 3'-5' направлении указанного 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и является смежной с ним, или первый праймер распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в ЕЕ-GM5, а второй праймер распознает последовательность в Т-ДНК, содержащую гены выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, которая расположена в 5'-3' направлении указанного 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и является смежной с ним, с получением фрагмента ДНК, характерного для элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM5. В одном варианте осуществления способ указанной полимеразной цепной реакции дополнительно предусматривает использование зонда, который распознает ДНК, амплифицированную с помощью указанных праймеров, например, пограничную ДНК, содержащую часть вставленной Т-ДНК и часть ДНК, фланкирующую указанную Т-ДНК в ЕЕ-GM5 (либо на 5'-, либо на 3'-стороне трансгенного объекта, в зависимости от конкретного случая, такого как зонд, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 14 или 20 в настоящем документе, или комплементарную ей последовательность), чтобы выявлять продукт амплификации, полученный с помощью указанных праймеров. Праймеры могут распознавать последовательность в пределах 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из ЕЕ-GM5 (SEQ ID No. 5, от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 166, или SEQ ID No. 24, от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 1113), или в пределах 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из ЕЕ-GM5 (последовательности, комплементарной последовательности от положения нуклеотида 359 до положения нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или от положения нуклеотида 359 до положения нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25), и последовательность в пределах вставленной Т-ДНК (SEQ ID No. 5, от положения нуклеотида 167 до 353, или SEQ ID No. 6, от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 358, или SEQ ID No. 23, от положения нуклеотида 1114 до 8572, или комплементарную ей последовательность) соответственно. Праймер, распознающий 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 26 или SEQ ID No. 27, а праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей гены устойчивости к нематоде и выносливости к гербицидам, может

содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 28 или SEQ ID No. 29, описанную в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к любой специфической в отношении трансгенного объекта паре праймеров и специфической ДНК, амплифицированной с использованием такой пары праймеров, которые могут быть получены обычным специалистом в данной области техники или могут быть получены из коммерческих источников из последовательностей трансгенного объекта EE-GM5, представленных в настоящем документе, или содержащихся в семени, депонированном в АТСС под номером доступа РТА-123625.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом способ предусматривает амплификацию последовательности нукleinовой кислоты, присутствующей в биологическом образце, с использованием полимеразной цепной реакции с помощью двух праймеров, содержащих или состоящих (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, для получения фрагмента ДНК размером 85 п.о., или с помощью двух праймеров, содержащих или состоящих (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, для получения фрагмента ДНК размером 84 п.о. Также настоящее изобретение предусматривает растения, содержащие идентифицированный таким способом элитный трансгенный объект EE-GM5.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к специфическим последовательностям, фланкирующим Т-ДНК, из EE-GM5, описанным в настоящем документе, которые могут быть использованы для разработки специфических способов идентификации EE-GM5 в биологических образцах. Такие специфические последовательности, фланкирующие Т-ДНК, также могут быть использованы в качестве эталонного контрольного материала в анализах идентификации. Более конкретно, настоящее изобретение относится к 5'- и/или 3'-участкам, фланкирующим Т-ДНК, из EE-GM5, которые могут быть использованы для разработки специфических праймеров и зондов, что далее описывается в настоящем документе. Также подходящими в качестве эталонного материала являются молекулы нукleinовой кислоты, предпочтительно размером приблизительно 150-850 п.о., содержащие последовательность, которая может быть амплифицирована праймерами, содержащими или состоящими (по сути) из

нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 или под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам идентификации присутствия EE-GM5 в биологических образцах на основе применения таких специфических праймеров или зондов. Праймеры могут содержать, состоять из или состоять по сути из нуклеотидной последовательности размером от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранной из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID 6, или последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, в сочетании с праймерами, содержащими, состоящими из или состоящими по сути из нуклеотидной последовательности из от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранной из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1114 до положения нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23, такой как нуклеотидная последовательность из от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранная из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарной им последовательности. Праймеры также могут содержать такие нуклеотидные последовательности, которые расположены на их дальнем 3'-конце, и дополнительно содержат неродственные последовательности или последовательности, полученные из упомянутых нуклеотидных последовательностей, но содержащие ошибки спаривания. В одном варианте осуществления праймеры, используемые в настоящем документе, также могут быть идентичными целевой ДНК или комплементарной ей последовательности, где указанная целевая ДНК является гибридом, содержащим нуклеотидные последовательности различного происхождения, которые не существуют в природе в такой комбинации.

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом указанные наборы содержат по меньшей мере одну пару праймеров или зонд, которые

специфически распознают 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, содержащую смежный с ним ген выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, в EE-GM5.

Набор по настоящему изобретению может содержать в дополнение к праймеру, 5 который специфически распознает 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE- GM5, второй праймер, который специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей ген выносливости к гербициду-ингибитору HPPD и устойчивости к нематоде, из EE-GM5, для применения в протоколе ПЦР- идентификации. Наборы по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере 10 два специфических праймера, один из которых распознает последовательность в 5'- участке, фланкирующем Т-ДНК, из EE-GM5, или последовательность в 3'-участке, фланкирующем Т-ДНК, из EE-GM5, а другой распознает последовательность во вставленной Т-ДНК, содержащей ген выносливости к гербициду-ингибитору HPPD и устойчивости к нематоде. Праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, 15 может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19, а праймер, распознающий вставленную Т-ДНК, смежную с указанным 5'-участком, фланкирующим Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18, или праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, и праймер, распознающий 20 вставленную Т-ДНК, смежную с указанным 3'-участком, фланкирующим Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12, или любой другой праймер или комбинацию праймеров, описанных в настоящем документе или получаемых согласно настоящему описанию или из депонированного семени. Набор, кроме того, может содержать зонд, распознающий последовательность, расположенную 25 между праймером, распознающим 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и праймером, распознающим последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, или распознающий последовательность между праймером, распознающим 3'-участок, фланкирующим Т-ДНК, и праймером, распознающим последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, такой как зонд, содержащий последовательность под SEQ ID No. 14, или зонд, 30 содержащий последовательность под SEQ ID No. 20.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом указанный

набор содержит праймеры для ПЦР, содержащие или состоящие (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 или из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19, для применения в протоколе для проведения ПЦР для EE-GM5, описанном в настоящем документе.

5 Указанный набор, содержащий праймеры, содержащие или состоящие (по сути) из нуклеотидной последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13, может дополнительно содержать зонд, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 14, и при этом указанный набор, содержащий праймеры, содержащие или состоящие (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19, может дополнительно содержать зонд, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 20. Указанный набор может дополнительно содержать буфер и реагенты, такие как любое или каждое из следующих соединений: dNTP, (Taq) ДНК-полимераза, MgCl₂, стабилизаторы и необязательно краситель.

15 Настоящее изобретение также относится к набору для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом набор содержит специфический зонд, содержащий или состоящий (по сути) из последовательности, которая соответствует (или является комплементарной) последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности со специфическим участком из EE-GM5, где такой специфический участок содержит часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM5 и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним. В одном варианте осуществления последовательность зонда соответствует специальному участку, содержащему часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM5 и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним. 20 Наиболее предпочтительно специфический зонд содержит или состоит (по сути) из (или является комплементарным) последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5, или последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или 25 специфический зонд содержит или состоит (по сути) из (или является комплементарным) последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности с частью из по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов

последовательности под SEQ ID No. 5, или последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности с частью из по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов последовательности под SEQ ID No. 6, где каждая указанная часть под SEQ ID No. 5 или 6 содержит последовательности вставленной Т-ДНК и последовательности, фланкирующие Т-ДНК, приблизительно равной длины.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения раскрываются молекулы ДНК, имеющие достаточную длину полинуклеотидов как последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, так и вставленной Т-ДНК из EE-GM5, чтобы таким образом быть применимыми в качестве праймера или зонда для выявления EE-GM5 или для характеристики растений, содержащих трансгенный объект EE-GM5. Такие последовательности могут содержать любой из по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 нуклеотидов или может содержать любой из 9, 10, 15, 20 или 30 нуклеотидов последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и аналогичное количество нуклеотидов вставленной Т-ДНК из EE-GM5 на каждой стороне пограничного сайта соответственно, и при этом на одном или обоих 5'- и 3'-пограничных сайтах трансгенного объекта EE-GM5. Наиболее предпочтительно, такие молекулы ДНК содержат последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6. В одном варианте осуществления такие молекулы ДНК содержат последовательность под SEQ ID No. 23, 24 или 25. В одном аспекте настоящего изобретения представлены растения сои и семена, содержащие такие специфические молекулы ДНК.

Способы и наборы, охватываемые настоящим изобретением, могут быть использованы для различных целей, таких как без ограничения следующие: идентификация присутствия или определение (нижнего) порогового количества EE-GM5 в растении, растительном материале или в продуктах, таких как без ограничения пищевые или кормовые продукты (свежие или обработанные), содержащие растительный материал или полученные из него; в качестве дополнения или альтернативы способы и наборы по настоящему изобретению могут быть использованы для идентификации трансгенного растительного материала с целью сегрегации между трансгенным и нетрансгенным материалом; в качестве дополнения или альтернативы способы и наборы по настоящему изобретению могут быть использованы для

определения качества (т. е. процентного содержания чистого материала) растительного материала, содержащего ЕЕ-GM5.

Кроме того, настоящее изобретение относится к 5'- и/или 3'-участкам, фланкирующим Т-ДНК, из ЕЕ-GM5, а также к специфическим праймерам и зондам на основе 5'- и/или 3'-последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, из ЕЕ-GM5.

Настоящее изобретение также относится к геномной ДНК, полученной из растений, содержащих элитный трансгенный объект ЕЕ-GM5, в частности, к геномной ДНК содержащей специфические в отношении трансгенного объекта ЕЕ-GM5 последовательности, такие как одна или обе из граничных последовательностей ЕЕ-GM5 (содержащих часть ДНК, фланкирующую Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ней, характерную для ЕЕ-GM5), например, любую из последовательностей под SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 и/или любую из последовательностей под SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25. Такая геномная ДНК может быть использована в качестве эталонного контрольного материала в анализах идентификации, описываемых в настоящем документе.

Также в настоящем документе представлено трансгенное устойчивое к нематоде и выносливое к гербицидам растение сои или его клетки, части, семена или потомки, каждое из которых содержит по меньшей мере один элитный трансгенный объект, при этом указанный элитный трансгенный объект содержит вставленную Т-ДНК, содержащую:

i) первый химерный ген, который предусматривает ген *cry14Ab-1.b*, полученный из *Bacillus thuringiensis*, кодирующий белок Cry14Ab-1 под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, такой как химерный ген, содержащий экспрессируемый в растении промотор и кодирующую последовательность под SEQ ID No. 7, и

ii) второй химерный ген, который содержит модифицированный ген *hppdPf-4Pa* из *Pseudomonas*, кодирующей фермент HPPD с большей выносливостью под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, такой как химерный ген, содержащий экспрессируемый в растении промотор и кодирующую последовательность под SEQ ID No 9.

В одном варианте осуществления указанный элитный трансгенный объект содержит нуклеотиды 1-166 из SEQ ID No. 5 или 1-1113 из SEQ ID No. 24, расположенные непосредственно в 5'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и

являющиеся смежными с ней, и нуклеотиды 359-691 из SEQ ID No. 6 или нуклеотиды 359-1449 из SEQ ID No. 25, расположенные непосредственно в 3'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и являющиеся смежными с ней.

В дополнительном варианте осуществления указанный элитный трансгенный объект можно получить путем скрещивания с растением сои, выращенным из эталонного семени, содержащего указанный трансгенный объект и депонированного в ATCC под номером депонирования РТА-123625.

В другом варианте осуществления геномная ДНК указанного растения сои или его клеток, частей, семян или потомка при анализе с использованием ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 85 п.о., или при анализе с использованием ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 84 п.о.

Также в настоящем документе представлен способ идентификации трансгенного растения сои или его клеток, частей, семени или потомка с устойчивостью к нематоде, такой как устойчивость к нематоде SCN, и/или к *Pratylenchus*, и/или к галловой, и/или к почковидной, и с выносливостью к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, в биологических образцах, при этом указанный способ предусматривает амплификацию фрагмента ДНК размером от 50 до 150 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в биологических образцах, с использованием полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров, при этом один из указанных праймеров распознает 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из элитного трансгенного объекта EE-GM5, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, указанного элитного трансгенного объекта, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, другой праймер из указанных праймеров распознает

последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или где указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность.

Также в настоящем документе представлен набор для идентификации трансгенного растения сои или его клеток, частей, семени или потомка с устойчивостью к нематоде и выносливостью к гербициду-ингибитору HPPD в биологических образцах, при этом указанный набор содержит один праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из элитного трансгенного объекта EE-GM5, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или один праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из указанного элитного трансгенного объекта, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, и один праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вставленная Т-ДНК из элитного трансгенного объекта EE-GM5, используемого в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность и нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, или содержит последовательность, которая

характеризуется по меньшей мере 95, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью от положения нуклеотида 7 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11, или комплементарную ей последовательность.

5 Также в настоящем документе представлены растение сои, клетка растений, ткань или семя, содержащие в своем геноме молекулу нукleinовой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 80-100% идентичностью последовательности с ней, и/или SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 80-100% идентичностью последовательности с ней, и нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей последовательностью.

10

15

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к растению сои, клетке растения, ткани или семени, содержащим в своем геноме молекулу нукleinовой кислоты, гибридизирующуюся в условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или комплементарной ей последовательностью, или гибридизирующуюся с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6 или комплементарной ей последовательностью.

20

Также в настоящем документе представлена выделенная молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 или комплементарной ей последовательностью, или по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательности под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или комплементарной ей последовательностью, или выделенная молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся в условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 или

25

30

комплémentарной ей последовательностью, или с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или комплементарной ей последовательностью.

Также в настоящем документе представлена выделенная молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по 5 меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 7 или комплементарной ей последовательностью, или выделенная молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся 10 в условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 7 или комплементарной ей последовательностью, где такая молекула нукleinовой кислоты кодирует нематоцидный токсин, активный в отношении цистообразующих нематод, и/или ранящих нематод, и/или галловых нематод, и/или почковидной нематоды, таких как *Heterodera glycines*, и/или *Pratylenchus brachyurus*, и/или *Meloidogyne incognita*, и/или *Rotylenchulus reniformis*. В одном варианте 15 осуществления такая молекула нукleinовой кислоты функционально связана с молекулой нукleinовой кислоты, содержащей (гетерологичный) промотор, обеспечивающий экспрессию в растении, с тем, чтобы образовать химерный ген. Также в настоящем документе представлено применение указанной молекулы нукleinовой кислоты в трансформированных растениях или семенах для контроля патогенных для 20 растений нематод. Кроме того, в настоящем документе представлен способ контроля галловых нематод, таких как *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla* или *Meloidogyne javanica*, в частности *Meloidogyne incognita*, предусматривающий применение белка Cgu14Ab или ДНК, кодирующей белок Cgu14Ab, или растения, или семени, содержащего указанную ДНК под контролем промотора, обеспечивающего 25 экспрессию в растении, где указанный белок Cgu14Ab представляет собой белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8, или белок, характеризующийся по меньшей мере 96% или по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с такой последовательностью, или белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8 от аминокислотного 30 положения 1 до аминокислотного положения 706, или белок, характеризующийся по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 98, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с такой последовательностью. Кроме того, в настоящем документе

представлен способ контроля почковидных нематод (*Rotylenchulus reniformis*), предусматривающий применение белка Сгу14Ab или ДНК, кодирующей белок Сгу14Ab, или растения, или семени, содержащего указанную ДНК под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, где указанный белок Сгу14Ab представляет собой белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8, или белок, характеризующийся по меньшей мере 96% или по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с такой последовательностью, или белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8 от аминокислотного положения 1 до аминокислотного положения 706, или белок, характеризующийся по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 98, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с такой последовательностью.

Также в настоящем документе представлена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 7941 из SEQ ID No. 11, или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с такой последовательностью, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует нематоцидный белок Сгу14Ab и белок HPPD, выносливый к ингибиторам HPPD. В одном варианте осуществления такая молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок под SEQ ID No. 8 или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему, и белок под SEQ ID No. 10 или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему.

Также в настоящем документе представлена клетка растения сои, содержащая в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM5, которое представляет собой чужеродную ДНК или вставленную Т-ДНК в определенном локусе, где элитный трансгенный объект EE-GM5 содержится в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером депонирования PTA-123625, где указанная вставленная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Сгу14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и где указанный элитный трансгенный объект характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4; или такая клетка, которая представляет собой клетку семени, или такая клетка, где геномная ДНК указанной клетки при анализе с использованием

ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID 12 и SEQ ID 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 85 п.о.

В настоящем изобретении представлена молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM5, содержащегося в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером 5 депонирования РТА-123625, где указанной элитный трансгенный объект содержит химерный ген, кодирующий Сту14Ab-1, и ген, кодирующий HPPD-4, а также содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 и последовательность под SEQ ID No. 2 или 4.

10 В настоящем изобретении также представлена молекула нукleinовой кислоты, содержащая в следующем порядке следующие нуклеотидные последовательности: а) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до 166 из SEQ ID NO. 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, б) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 188 до нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11 или 15 последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, и с) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID NO. 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, как например, такая молекула нукleinовой кислоты, которая содержит последовательность б), которая на по 20 меньшей мере 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична нуклеотидной последовательности от нуклеотида 188 до нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11.

В настоящем изобретении также представлена молекула нукleinовой кислоты, содержащая в следующем порядке следующие нуклеотидные последовательности: а) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до 1113 из SEQ ID NO. 24 или последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, б) нуклеотидную 25 последовательность от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, и с) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID NO. 25 или последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична ей, как например, такая молекула нукleinовой кислоты, которая содержит последовательность б), которая на по 30 меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,9% идентична нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 23. В соответствии с настоящим изобретением также представлен способ получения соевого продукта, предусматривающий получение

семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, и получение из него соевого продукта. В одном варианте осуществления соевый продукт в таком способе представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, муку, или хлопья, или соевое масло, соевый белок, лецитин, соевое молоко, тофу, маргарин, 5 биодизельное топливо, биокомпозит, клей, растворитель, смазку, очиститель, пену, краску, чернила, свечу или пищевые или кормовые продукты, содержащие соевое масло или соевый белок. В другом варианте осуществления такой соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, специфическую для элитного трансгенного объекта EE-GM5. В 10 одном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного трансгенного объекта EE-GM5, содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4.

Также в настоящем документе представлен соевый продукт, полученный из семени, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, где указанный соевый продукт представляет собой или содержит соевый шрот, молотые 15 семена, муку или хлопья, и содержит нуклеиновые кислоты, специфические для элитного трансгенного объекта EE-GM5, где указанная нуклеиновая кислота поддается выявлению с использованием способов, описываемых в настоящем документе. В одном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного 20 трансгенного объекта EE-GM5, содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4. В другом варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного трансгенного объекта EE-GM5, содержит последовательность под SEQ ID No. 5 или 24 или последовательность под SEQ ID No. 6 или 25. В одном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного трансгенного объекта EE-GM5, содержит последовательность под SEQ ID No. 5 или 24 и последовательность под SEQ ID No. 6 или 25.

Также в настоящем документе представлено применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, для получения соевого продукта, где указанной элитный трансгенный объект содержит последовательность под любым из 30 SEQ ID NO. 1, 3, 5 или 24 и/или последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25. В одном варианте осуществления в таком применении соевый продукт представляет собой любое из соевого шрота, молотых семян сои, соевой муки или соевых хлопьев.

Кроме того, в настоящем документе представлен способ получения растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5 в комбинации с другим локусом/геном устойчивости к SCN, например, путем объединения элитного трансгенного объекта EE-GM5 с другим локусом/геном устойчивости к SCN, встречающимся в том же растении/семени сои, и выращивания семени, содержащего EE-GM5 и указанный другой локус/ген устойчивости к SCN. В одном варианте осуществления растения, клетки или семена по настоящему изобретению содержат один или несколько других локусов/генов устойчивости к SCN, которые встречаются в сое, с получением комбинации различных источников устойчивости к SCN в растениях сои, 5 клетках или семенах по настоящему изобретению. Известны некоторые соевые локусы или гены устойчивости к SCN, и один или несколько из них могут быть объединены с EE-GM5 в одних и тех же растении, клетке или семени, такие как любой из генов/локусов устойчивости к SCN из источников устойчивости PI 88788, PI 548402 (Peking), PI 437654 (Hartwig или CystX®) или любой их комбинации, или один или несколько из нативных 10 локусов/генов устойчивости к SCN *rhg1*, *rhg1-b*, *rhg2*, *rhg3*, *Rhg4*, *Rhg5*, cqSCN11, cqSCN-003, cqSCN-005, cqSCN-006, cqSCN-007, или любой из локусов устойчивости к SCN, 15 идентифицированных на любой из хромосом сои 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или любой их комбинации (Kim et al. 2016, Theor. Appl. Genet. 129(12):2295-2311; Kim and Diers 2013, Crop Science 53:775-785; Kazi et al. 2010, Theor. 20 Appl. Gen. 120(3):633-644; Glover et al. 2004, Crop Science 44(3):936-941; www.soybase.org; Concibido et al. 2004, Crop Science 44:1121-1131; Webb et al. 1995, Theor. Appl. Genet. 91:574-581). Также в одном варианте осуществления растения или семена по 25 настоящему изобретению содержат EE-GM5 в сочетании с одним или несколькими локусами устойчивости к SCN в сое, полученными из любого из источников устойчивости к SCN PI 548316, PI 567305, PI 437654, PI 90763, PI 404198B, PI 88788, PI 468916 , PI 567516C, PI 209332, PI 438489B, PI 89772, Peking, PI 548402, PI 404198A, PI 561389B, PI 629013, PI 507471, PI 633736, PI 507354, PI 404166, PI 437655, PI 467312, PI 567328, PI 22897 или PI 494182. В таблице 3, включенной в настоящий документ, 30 представлен обширный перечень образцов сои, зарегистрированных как устойчивые к SCN, из которых гены/локусы устойчивости к SCN (один или несколько) могут быть объединены с EE-GM5 по настоящему изобретению в одних и тех же растениях сои, клетке или семени.

Таблица 3

FC 21340	PI 404192C	PI 438498	PI 507451	PI 548974	PI 567771C	PI 68465
FC 31685	PI 404198A	PI 438503A	PI 507470	PI 548975	PI 567773	PI 68622
PI 101404A	PI 404198B	PI 458506	PI 507471	PI 548981	PI 603587A	PI 70027
PI 153229	PI 407022	PI 458510	PI 507475	PI 548982	PI 605743B	PI 70213
PI 153297	PI 407221	PI 458519A	PI 507476	PI 548988	PI 606416A	PI 70229
PI 153303	PI 407729	PI 458520	PI 507686C	PI 549031	PI 606420	PI 70251
PI 157430	PI 416762	PI 461509	PI 509095	PI 553040	PI 606424	PI 70519
PI 157444	PI 417091	PI 464888A	PI 509100	PI 553047	PI 606430	PI 71161
PI 16790	PI 423927	PI 464910	PI 511813	PI 559370	PI 606435	PI 79620
PI 17852-B	PI 424387	PI 464912	PI 518772	PI 561389B	PI 606436	PI 79712
PI 181558	PI 424595	PI 464925B	PI 522186	PI 56563	PI 606437	PI 80834-2
PI 200495	PI 437654	PI 467312	PI 522236	PI 567305	PI 606439	PI 82308
PI 209332	PI 437655	PI 467327	PI 533605	PI 567325B	PI 606441	PI 84664
PI 22897	PI 437679	PI 467332	PI 540556	PI 567328	PI 606443	PI 84751
PI 232993	PI 437690	PI 468903	PI 543855	PI 567333A	PI 612610	PI 84807
PI 303652	PI 437725	PI 468915	PI 54620-2	PI 567354	PI 612611	PI 84896
PI 339868B	PI 437770	PI 468916	PI 548316	PI 567360	PI 612612A	PI 87631-1
PI 339871A	PI 437793	PI 468916	PI 548349	PI 567387	PI 612614	PI 88788

PI 346298	PI 437844A	PI 494182	PI 548376	PI 567488B	PI 612615	PI 89008
PI 347544A	PI 437904	PI 495017C	PI 548402	PI 567491A	PI 612616	PI 89772
PI 371610	PI 438342	PI 506862	PI 548402S	PI 567516C	PI 612617A	PI 89783
PI 378690	PI 438489B	PI 507354	PI 548456	PI 567676A	PI 62202	PI 90763
PI 398682	PI 438491	PI 507422	PI 548655	PI 567726	PI 629013	PI 91102
PI 399061	PI 438496B	PI 507423	PI 548665	PI 567737	PI 633736	PI 92576
PI 404166	PI 438497	PI 507443	PI 548970	PI 567741	PI 63468	PI 92595
						PI 96549

Также в настоящем документе представлен способ защиты всходов растений сои от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, которое засеяли семенами, содержащими элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, гербицидом-ингибитором HPPD, где растения являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD. В одном варианте осуществления в таком способе гербицид-ингибитор HPPD представляет собой изоксафлутол, топрамезон или мезотрион.

Также в настоящем документе представлен способ защиты всходов растений сои от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, предназначенного для посадки растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, гербицидом-ингибитором HPPD до посадки растений сои или посева семян с последующими посадкой или посевом указанных растений сои или семян на указанном предварительно обработанном поле, где растения являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD.

Также в настоящем документе представлен способ контроля сорняков в поле растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, предусматривающий обработку указанного поля эффективным количеством гербицида-ингибитора HPPD, где растения являются выносливыми к такому гербициду.

Далее в настоящем документе представлено применение трансгенного растения сои, его семени или потомка для контроля сорняков на соевом поле, где каждое из указанных растения, семени или потомка содержит элитный трансгенный объект EE-GM5 в своем геноме, где EE-GM5, который представляет собой Т-ДНК в определенном локусе, содержится в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером 5 депонирования РТА-123625, где указанная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Сгу14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и где указанный элитный трансгенный объект характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4. В одном 10 варианте осуществления в таком применении трансгенное растение сои, его семя или потомок является устойчивым к нематодам и/или выносливым к гербициду-ингибитору HPPD. В одном варианте осуществления указанная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Сгу14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и указанный элитный 15 трансгенный объект характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 6 или 25.

Также в настоящем документе представлено применение растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5 в своем геноме, для выращивания устойчивого к нематоде и/или выносливого к гербицидам растения, где указанный элитный трансгенный объект EE-GM5 представляет собой вставленную Т-ДНК в определенном локусе, содержащуюся в эталонном семени, депонированном в 20 ATCC под номером депонирования РТА-123625, где указанная вставленная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Сгу14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и где указанный элитный трансгенный объект характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4. В одном варианте осуществления в таком применении растение 25 или семя сои является устойчивым к нематодам SCN и/или выносливым к гербициду-ингибитору HPPD. В одном варианте осуществления указанная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Сгу14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и указанный элитный трансгенный объект характеризуется 5'-пограничной 30 последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 6 или 25.

Также в настоящем документе представлено применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, для получения соевого продукта, где EE-GM5 представляет собой объект, который описан выше.

Также в настоящем документе представлен способ получения растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, предусматривающий скрещивание растения, содержащего EE-GM5, с другим растением сои и высаживание семени, содержащего EE-GM5, полученного в результате указанного скрещивания. В одном варианте осуществления такой способ предусматривает стадию нанесения гербицида-ингибитора HPPD на указанное семя или растение.

В соответствии с настоящим изобретением также представлено применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, и гербицида-ингибитора HPPD для контроля сорняков на соевом поле, и применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, в способе выращивания сои, выносливой к гербицидам-ингибиторам HPPD, где указанное семя представляет собой семя, которое описано выше.

Кроме того, в настоящем документе представлено применение элитного трансгенного объекта EE-GM5, описываемого выше, для придания устойчивости к нематодам и/или выносливости к гербициду-ингибитору HPPD растению или семени сои, или применение растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, в комбинации с гербицидом-ингибитором HPPD для выращивания сои.

Также в настоящем документе представлена пара праймеров, специфическая для EE-GM5, а также наборы или способы применения такой пары праймеров, где по меньшей мере один праймер из указанной пары является меченым (например, фрагментом, поддающимся выявлению или скринингу), или где 5'-конец по меньшей мере одного из указанных праймеров содержит одну или несколько ошибок спаривания или нуклеотидную последовательность, являющуюся неродственной фланкирующим 5'- или 3'-последовательностям из EE-GM5, или неродственной последовательности Т-ДНК из EE-GM5; или где по меньшей мере один из указанных праймеров содержит нуклеотидную последовательность на своем 3' конце, охватывающем соединяющий участок между последовательностями, фланкирующими Т-ДНК, и последовательностями Т-ДНК, при этом указанный соединяющий участок представляет собой нуклеотиды 166-167 из SEQ ID No. 5, нуклеотиды 1113-1114 из SEQ ID No. 24 или

нуклеотиды 358-359 из SEQ ID No. 6 или 25 при условии, что 17 последовательных нуклеотидов на 3'-конце не происходят исключительно из последовательностей или Т-ДНК, или последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, из SEQ ID No. 5, или 24, или 6, или 25; или где по меньшей мере один из указанных праймеров содержит 5 последовательность, которая на 80-100% идентична последовательности в фланкирующем 5'- или 3'-участке из EE-GM5 или во вставленной Т-ДНК из EE-GM5 соответственно, и при этом указанная последовательность праймера содержит по меньшей мере одну ошибку спаривания с указанным фланкирующим 5'- или 3'-участком или указанной Т-ДНК при условии, что по меньшей мере одна ошибка спаривания все же позволяет специфическую идентификацию элитного трансгенного объекта EE-GM5 с помощью этих праймеров при оптимизированных условиях выявления (например, оптимизированных условиях ПЦР); или где нуклеотидная последовательность по меньшей мере одного из указанных праймеров содержит нуклеотидную последовательность нукleinовой кислоты, слитую с нукleinовой кислотой из другого источника или комплементарной ей последовательностью.

Другие варианты осуществления согласно настоящему изобретению кратко описываются в следующих пунктах.

1. Способ идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM5 участка с помощью специфической пары праймеров или зонда, которые специфически распознают в EE-GM5 (по меньшей мере часть) 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и (по меньшей мере часть) вставленной Т-ДНК, смежной с ним.

2. Способ по пункту 1, при этом указанный способ предусматривает амплификацию фрагмента ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нукleinовой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с применением полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров, при этом один из указанных праймеров распознает 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в EE-GM5, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в EE-GM5, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна

последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, а другой праймер из указанных праймеров распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность под от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность под от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.

10

3. Способ по пункту 2, где указанный праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, и при этом указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

30 4. Способ по пункту 2, где указанный праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную

из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5 содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 5 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, и при этом указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, 10 содержит на своем дальнем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательности, которая комплементарна нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID 15 No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

5. Способ по пункту 4, где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно или 20 последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно.

6. Способ по пункту 5, при этом способ предусматривает амплификацию фрагмента, специфического для EE-GM5, размером 85 или 84 п.о. с помощью ПЦР.

7. Способ по любому из пунктов 2-6, дополнительно предусматривающий стадию гибридизации зонда, специфического в отношении фрагмента ДНК, 25 амплифицированного с помощью указанных по меньшей мере двух праймеров.

8. Способ по пункту 7, где указанный зонд распознает часть указанного 5'- участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, или где указанный зонд распознает часть указанного 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, или распознает часть указанного 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, например, где указанный зонд содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или SEQ ID No 2 или 4.

9. Способ по пункту 8, где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, и где

5 указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

10. Набор, содержащий один праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность под от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или один

10 праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности под SEQ ID No. 25 от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449, и один праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

11. Набор по пункту 10, где указанный праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна

последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, и при этом указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

12. Набор по пункту 10, где указанный праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5 содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, и при этом указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит на своем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательности, которая комплементарна нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

13. Набор по пункту 10, содержащий праймер, содержащий последовательность под SEQ ID No. 12, и праймер, содержащий последовательность под

SEQ ID No. 13, или содержащий праймер, содержащий последовательность под SEQ ID No. 18, и праймер, содержащий последовательность под SEQ ID No. 19.

14. Набор по пункту 10, дополнительно содержащий зонд, распознающий последовательность между праймером, распознающим 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и праймером, распознающим последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, или распознающий последовательность между праймером, распознающим 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и праймером, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК.

15. Набор по пункту 14, где указанный зонд распознает часть указанного 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, или где указанный зонд распознает часть указанного 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним.

16. Набор по пункту 15, где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

17. Пара праймеров, подходящих для применения в специфическом выявлении EE-GM5, содержащая первый праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает последовательность в пределах 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM5, и второй праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК в EE-GM5, смежной с указанным фланкирующим 5'- или 3'-участком, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную

последовательность от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную 5 последовательность от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.

18. Праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 12, или последовательность под SEQ ID No. 13, или последовательность под SEQ ID No. 18, или последовательность под SEQ ID No. 19.

19. Пара праймеров, содержащая первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 12, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 13, или содержащая первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 18, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 19. 15

20. Способ по пункту 1, при этом способ предусматривает гибридизацию нуклеиновой кислоты из биологических образцов со специфическим для EE-GM5 зондом.

21. Способ по пункту 20, где последовательность указанного специфического зонда характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью, содержащей часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, или 20 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM5 и с последовательностью вставленной Т-ДНК, смежной с ней.

22. Способ по пункту 21, где последовательность указанного специфического зонда содержит последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 25 3 или 5, или последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

23. Способ по пункту 22, где указанный зонд содержит последовательность под любым из SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под любым из SEQ ID No. 2 30 или 4.

24. Набор для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом указанный набор содержит специфический зонд, способный специфически гибридизироваться со специфическим участком из EE-GM5.

25. Набор по пункту 24, где последовательность указанного специфического зонда характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью, содержащей часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, или часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM5 и часть последовательности вставленной Т-ДНК, смежной с ней.

26. Набор по пункту 25, где последовательность указанного специфического зонда содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID No. 1, 3 или 5, или любой из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

27. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах.

28. Зонд по пункту 27, который содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью, содержащей часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, или часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM5 и часть последовательности вставленной Т-ДНК, смежной с ней, или комплементарную ей последовательность.

29. Зонд по пункту 28, который характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6 или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

30. Специфический зонд, содержащий нуклеотидную последовательность, которая по сути сходна с любой из SEQ ID No. 1, 3 или 5, или любой из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

31. Специфический зонд, содержащий последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4.

32. Способ подтверждения чистоты семени, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM5 участка с помощью специфической пары

праймеров или зонда, которые специфически распознают в EE-GM5 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ним в образцах семян.

33. Способ по пункту 32, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с применением полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров, при этом один из указанных праймеров распознает 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 10 24, или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, а другой 15 праймер из указанных праймеров распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или в пределах нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 20 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или в пределах нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности, и гибридизацию зонда, специфического в отношении фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью 25 указанных двух праймеров.

34. Способ по пункту 33, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером 85 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или амплификацию фрагмента ДНК размером 84 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID 30 No. 19 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

35. Способ скрининга семян на присутствие ЕЕ-GM5, при этом способ предусматривает выявление специфического для ЕЕ-GM5 участка с помощью специфической пары праймеров или зонда, которые специфически распознают в ЕЕ-GM5 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ним, 5 в образцах партий семян.

36. Способ по пункту 35, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с использованием полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров, при этом один из указанных праймеров распознает 5'- участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM5, при этом указанный 5'-фланкирующий участок Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM5, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, а другой праймер из указанных праймеров распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей 15 последовательность, которая комплементарна нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или содержащей нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 20 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность, и гибридизацию зонда, специфического в 25 отношении фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью указанных по меньшей мере двух праймеров, например, зонда, содержащего последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или SEQ ID No. 2 или 4 или комплементарную ей последовательность.

37. Способ по пункту 36, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером 85 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No.

12 и SEQ ID No. 13 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14.

38. Способ определения статуса зиготности растения, растительного материала или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, при этом
5 указанный способ предусматривает амплификацию фрагментов ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с использованием полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере трех праймеров, при этом два из указанных праймеров специфически распознают прединсерционную растительную ДНК, такие как праймер, содержащий нуклеотидную
10 последовательность под SEQ ID No. 21, и праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19, а третий из указанных праймеров распознает последовательность во вставленной Т-ДНК, такую как нуклеотидная последовательность под SEQ ID No. 18, при этом в указанном способе применяют
15 указанные праймеры, где фрагменты ДНК размером 84 и 72 п.о. являются амплифицированными.

39. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах путем гибридизации с по сути комплементарным меченым зондом на основе нуклеиновой кислоты, при котором соотношение зонд:целевая нуклеиновая кислота увеличивается за счет повторного использования
20 последовательности целевой нуклеиновой кислоты, при этом указанный способ предусматривает:

а) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты с первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 167 до положения нуклеотида 184 из SEQ
25 ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 341 до положения нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;

30 б) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 149 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным олигонуклеотидом

нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 376 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, где указанные первый и второй олигонуклеотиды перекрываются по меньшей мере по одному нуклеотиду, и где любой из указанного первого или указанного второго олигонуклеотида является меченый с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;

5 c) расщепление только меченого зонда в пределах дуплекса зонд:последовательность целевой нуклеиновой кислоты с помощью фермента, вызывающего селективное расщепление зонда, что приводит к диссоциации дуплекса и оставляет целевую последовательность интактной;

10 d) повторное использование последовательности целевой нуклеиновой кислоты путем повторения стадий (a) – (c); и

15 e) выявление расщепленного меченого зонда, за счет чего осуществляют определение присутствия указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и определение присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в указанном биологическом образце.

20 40. Трансгенное растение сои или его клетки, части, семя или потомок, каждое из которых содержит элитный трансгенный объект EE-GM5 в своем геноме, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект, было депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123625.

25 41. Трансгенное растение сои, семя, клетки, части или потомок по пункту 40, геномная ДНК которых при анализе с применением ПЦР для EE-GM5 с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID 12 и SEQ ID 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 85 п.о.

42. Семя, содержащее элитный трансгенный объект EE-GM5, который представляет собой вставленную Т-ДНК в определенном положении в геноме сои, в котором он находится в семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123625, или в его производных.

30 43. Растение сои, часть растения, клетка или ткань, или семя, содержащие элитный трансгенный объект EE-GM5, получаемый из семени по пункту 42.

44. Растение сои или его семя, клетки или ткани, каждое из которых содержит элитный трансгенный объект EE-GM5 в своем геноме, получаемые путем

размножения и/или селекции растения сои, выращенного из семени, депонированного в АТСС под номером депонирования РТА-123625.

45. Семя сои, содержащее элитный трансгенный объект EE-GM5, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект, было депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123625.

46. Трансгенные растение, клетка или ткань сои, содержащие элитный трансгенный объект EE-GM5, получаемый из семени по пункту 45.

47. Клетка растения сои по любому из пунктов 40, 41, 43, 44 и 46, которая является непропагативной клеткой растения.

48. Способ получения растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, предусматривающий скрещивание растения по любому из пунктов 40, 41, 43, 44 и 46 с другим растением сои и высаживание семени, полученного в результате указанного скрещивания.

49. Геномная ДНК сои, содержащая элитный трансгенный объект EE-GM5.

50. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по сути сходна с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5, или с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям, как например, молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5, или 24, или 6, или 25, или с комплементарной ей последовательностью, как например, указанная нуклеиновая кислота, которая придает сое выносливость к гербициду-ингибитору HPPD и/или устойчивость к SCN.

51. Молекула нуклеиновой кислоты по пункту 50, содержащая нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1 или 3 или SEQ ID No. 2 или 4 или последовательность, комплементарную указанным последовательностям, как например, такая молекула нуклеиновой кислоты, которая дополнительно содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 или нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с ней, или комплементарную ей последовательность, или такая молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида

188 до положения нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ней.

52. Растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие молекулу нукleinовой кислоты по любому из данных пунктов, как например, растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие молекулу нукleinовой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 1, 3 или 5 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 2, 4 или 6, или растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие в своем геноме нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 3 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 4, или растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие в своем геноме нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 6, или растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие в своем геноме нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 24 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 25, как например, такое растение сои, которое также содержит химерный ген, кодирующий Cguy14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, в частности, такие химерные гены, которые содержат нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно.

53. Молекула нукleinовой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или SEQ ID No. 2, 4 или 6, как например, молекула нукleinовой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 и SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, или, например, молекула нукleinовой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 24 и SEQ ID No. 25 или комплементарную ей последовательность.

54. Трансгенное растение сои, растительная клетка, ткань или семя, содержащие в своем геноме трансгенный объект EE-GM5, характеризующийся молекулой нукleinовой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по сути сходна с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24, или с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25, или с последовательностью, которая комплементарна указанным последовательностям, где

указанное растение сои также содержит химерный ген, кодирующий Cgt14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4.

55. Растение сои, клетка, ткань или семя, содержащие EE-GM5 и содержащие в геноме своих клеток последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5, или с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям, как например, растение сои, которое также содержит химерный ген, кодирующий Cgt14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, или такие растение сои, клетка, ткань или семя, которые содержат в геноме своих клеток последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 100% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID No. 24 или SEQ ID No. 25.

56. Растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 или SEQ ID No. 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью, или такие растение сои, клетка растения, ткань или семя, которые содержат в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 и SEQ ID No. 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью.

57. Растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, гибридизирующуюся при условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 6 или с комплементарной ей последовательностью.

58. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 или SEQ ID No. 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью, как например, молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность,

которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 и SEQ ID No. 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью.

5. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся при условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 5 или 6 или с комплементарной ей последовательностью.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 50, 51, 58 и 59, которая дополнительно содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9.

7. Химерная ДНК, содержащая 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, вставленную Т-ДНК и 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, где последовательность указанной вставленной Т-ДНК содержит последовательность от нуклеотида 188 до нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,5% идентична ей, или где последовательность указанной вставленной Т-ДНК содержит последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 и где указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположен непосредственно в 5'-направлении от нее и является смежным с указанной вставленной Т-ДНК, и содержит последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,5% идентична ей, или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,5% идентична ей, и где указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположен непосредственно в 3'-направлении от нее и является смежным с указанной вставленной Т-ДНК и содержит последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,5% идентична ей, или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,5% идентична ей.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью

последовательности с нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 7 или комплементарной ей последовательностью, как например, нуклеотидная последовательность под SEQ ID No. 7, как например, молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность от нуклеотида 131 до 5276 из SEQ ID No. 11 или 5 комплементарную ей последовательность, или последовательность, кодирующую нематоцидный белок Cgt14Ab, характеризующуюся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности под SEQ ID No. 7 или с последовательностью от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 5276 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательностью.

10 63. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 9 или комплементарной ей последовательностью, как например, нуклеотидная последовательность под SEQ ID No. 9, как например, молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность от нуклеотида 5382 до 7459 из SEQ ID No. 11 или 15 комплементарную ей последовательность, или последовательность, характеризующаяся по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID No. 9, или последовательностью от положения нуклеотида 5382 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей 20 последовательностью, где указанная последовательность кодирует белок HPPD, обеспечивающий выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD при экспрессии в растении.

25 64. Способ получения соевого продукта, предусматривающий получение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, и получение из него соевого продукта.

65. Способ по пункту 64, где соевый продукт представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, муку или хлопья.

30 66. Способ по пункту 4 или 65, где такой соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, специфическую для элитного трансгенного объекта EE-GM5, как например, такой продукт, который содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного

объекта EE-GM5, как например, последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4.

67. Соевый продукт, содержащий элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, как например, соевый продукт, полученный из растения сои, клетки, части, семени или потомка по любому из данных пунктов.

68. Соевый продукт по пункту 67, где соевый продукт представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, муку или хлопья.

69. Соевый продукт по пункту 67 или 68, где указанный соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, специфическую для элитного трансгенного объекта EE-GM5, как например, такой продукт, который содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта EE-GM5, как например, последовательность под SEQ ID No. 1 или 3, или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4, или комплементарную ей последовательность.

70. Способ защиты всходов растений сои от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, которое засеяли семенами, содержащими элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый в любом из данных пунктов, гербицидом-ингибитором HPPD, где растения являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD.

71. Способ защиты всходов растений сои от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, предназначенного для посадки растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, гербицидом-ингибитором HPPD до посадки растений сои или посева семян с последующими посадкой или посевом указанных растений сои или семян на указанном предварительно обработанном поле, где растения являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD.

72. Способ контроля сорняков в поле растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, предусматривающий обработку указанного поля эффективным количеством гербицида-ингибитора HPPD, где растения являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD.

73. Способ по любому из пунктов 70-72, где гербицид-ингибитор HPPD представляет собой изоксафлутол, топрамезон или мезотрион.

74. Применение трансгенного растения сои, его семени или потомка, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, для получение соевого зерна или семени.

5 75. Применение растения или семени сои, содержащего в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, для выращивания растения, устойчивого к нематоде и/или выносливого к гербициду-ингибитору HPPD.

10 76. Применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM5, для получения соевого продукта, где EE-GM5 является таким, как описывается выше, где такой соевый продукт представляет собой или содержит молотое соевое зерно, соевую муку, соевый шрот или соевые хлопья.

77. Применение растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, определяемый выше, в комбинации с гербицидом-ингибитором HPPD для выращивания сои в поле или для выращивания соевой культуры.

15 78. Молекула нуклеиновой кислоты, получаемая из семени, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-123625, где указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 и нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6.

20 79. Растение сои, клетка, часть или семя, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM5, где указанный элитный трансгенный объект представляет собой генетический локус, содержащий вставленную Т-ДНК, содержащую химерный ген, кодирующий белок HPPD-4, и химерный ген, кодирующий белок Cgy14Ab-1, и фланкирующие 5'- и 3'-последовательности, непосредственно окружающие указанную вставленную Т-ДНК, содержащуюся в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123625.

25 80. Растение-потомок, клетка, часть растения или семя из растения, клетки, части растения или семени по пункту 79, где указанные растение-потомок, клетка, часть растения или семя содержат нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 3 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 4.

30 81. Растение сои, клетка, часть, семя или потомок по пункту 79, геномная ДНК которых при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 84 п.о.

82. Растение по любому из предыдущих пунктов, которое является выносливым к изоксафлутолу, и/или топрамезону, и/или мезотриону, как например, растение, выносливое к изоксафлутолу, топрамезону и мезотриону.

83. Способ получения растения сои, устойчивого к SCN и выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD, предусматривающий введение признака устойчивости к SCN и выносливости к гербицидам-ингибиторам HPPD в геном растения сои путем скрещивания первого растения сои, у которого отсутствует ген, кодирующий Cgt14Ab-1, и у которого отсутствует ген, кодирующий HPPD-4, с растением сои по любому из предыдущих пунктов и отбор растения-потомка, устойчивого к SCN и выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD.

84. Применение растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, определяемый выше, для получения соевой культуры, такой как соевая культура, дающая более высокий урожай при заражении нематодами или с синдромом внезапной смерти.

85. Способ получения соевой культуры с улучшенной устойчивостью к нематодам или синдрому внезапной смерти, предусматривающий стадии (a) засевание поля с применением семени, описываемого в любом из предыдущих пунктов; и (b) сбор семени сои, произведенного растениями, выросшими из указанного семени, и необязательно (c) применение по отношению к полю, засеянному указанными семенами до или после прорастания семени или по отношению к указанному растению сои одной или нескольких доз гербицида-ингибитора HPPD, достаточных для уничтожения сорняков, но которые переносятся указанными семенами сои или растениями, где указанные нематоды представляют собой нематод SCN или видов *Pratylenchus*, или видо галловой нематоды или почковидной нематоды.

86. Применение семени сои, описываемого в любом из предыдущих пунктов, для получения переработанного пищевого или кормового продукта, где указанный переработанный пищевой или кормовой продукт содержит поддающееся выявлению количество нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 1 и/или SEQ ID NO: 2 или комплементарную ей последовательность.

87. Применение по пункту 86, где (i) указанный пищевой или указанный кормовой продукт содержит соевый шрот, соевую муку, соевые хлопья или соевое масло; (ii) указанная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID

NO: 3 и/или SEQ ID NO: 4 или комплементарную ей последовательность; или (iii) указанная нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO:7 и SEQ ID No. 9.

88. Растение сои, семя или клетка, содержащие в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM5, где элитный трансгенный объект EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности, приведенной под SEQ ID NO. 23, где указанный элитный трансгенный объект содержит химерный ген, кодирующий HPPD-4, и химерный ген, кодирующий Cry14Ab-1, где указанные растение, семя или клетка являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD и обладают устойчивостью к SCN.

89. Растение по пункту 88, где элитный трансгенный объект EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 95 % идентична последовательности, приведенной под SEQ ID NO. 23.

90. Растение по пункту 88, где элитный трансгенный объект EE-GM5 содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,9% идентична последовательности, приведенной под SEQ ID NO. 23.

91. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO. 23 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO. 23, которая придает выносливость к гербициду-ингибитору HPPD и/или устойчивость к нематоде, где указанная нематода представляет собой нематоду SCN, или видов *Pratylenchus*, или видов галловой нематоды или почковидной нематоды.

92. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 7941 под SEQ ID No. 11 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

93. Молекула нуклеиновой кислоты по пункту 92, которая кодирует белок HPPD, выносливый к ингибитору HPPD, и белок, отрицательно воздействующий на нематод-вредителей растений, таких как нематоды SCN, RKN или *Pratylenchus* spp.

94. Молекула нуклеиновой кислоты по пункту 93, которая кодирует белок под SEQ ID No. 8 или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему, и белок под SEQ ID No. 10, или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему.

95. Способ контроля сорняков и/или нематод в поле, предназначенном для посадки растений сои, предусматривающий стадии: 1) обработки указанного поля гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и 2) посадку или посев растений сои или семян, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, полученный в результате трансформации, описываемый выше, в указанном обработанном поле, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

96. Способ контроль сорняков, характеризующийся тем, что предусматривает стадии: 1) посадки растений или семян сои, выносливых к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, в поле и 2) применения гербицида-ингибитора HPPD, такого как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, по отношению к указанному полю до посадки указанных растений или семян или по отношению к указанным растениям сои или семян после посадки (можно осуществлять до или после прорастания семян), где указанные растения или семена содержат элитный трансгенный объект EE-GM5, полученный в результате трансформации, сои в своем геноме, при этом эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

97. Способ контроля сорняков, характеризующийся тем, что предусматривает стадии: 1) обработки поля, предназначенного для посадки растений сои, или поля, предназначенного для посева семян сои, гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, до посадки растений сои или посева семян и 2) посадку растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5 сои, полученный в результате трансформации, или посев семян сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5 сои, полученный в результате трансформации, в указанном предварительно обработанном поле, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

98. Способ снижения потери урожая в поле, предназначенном для посадки растений сои, в частности, в поле, которое содержит или, как предполагается, содержит

нematоды, такие как SCN, RKN или Pratylenchus, или почковидные нематоды, или их комбинацию, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих описываемый выше элитный трансгенный объект EE-GM5, полученный в результате трансформации, и 2) посадку или посев растений сои или семян, где 5 эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

99. Способ повышения урожая растений сои при посадке в поле, содержащем нематоды, такие как SCN, RKN или Pratylenchus, или почковидные нематоды, или их комбинацию, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, 10 содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, описываемый выше, и 2) посадки или посева растений сои или семян, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

100. Способ получения растения или семени сои, выносливого к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, или получения 15 растения или семени сои, выносливого к нематодам, таким как SCN, RKN или Pratylenchus, или к почковидным нематодам, или получения растения или семени сои, выносливого к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и выносливого к нематодам, таким как SCN, RKN или Pratylenchus, или к почковидным нематодам, характеризующийся стадией введения в геном растения или 20 семени сои описываемого выше элитного трансгенного объекта EE-GM5 сои, полученного в результате трансформации, и необязательно обработки указанного растения или семени гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, или необязательно обработки поля, в котором указанное 25 растение или семя будут высаживать, гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и посадки указанного растения или семени в указанном предварительно обработанном поле.

101. Молекула нуклеиновой кислоты, которая специфически характеризует элитный трансгенный объект EE-GM5 сои, полученный в результате трансформации, характеризующаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность под 30 любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5, которая содержит часть геномной ДНК растения сои и часть вставленной чужеродной ДНК из EE-GM5, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, и/или характеризующаяся тем, что она содержит

нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 2, 4 или 6, которая содержит часть вставленной чужеродной ДНК EE-GM5 и часть геномной ДНК растения сои, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней.

102. Растение или семя, содержащее EE-GM5, описываемый выше, а также 5 характеризующееся выносливостью или устойчивостью к SCN, RKN или *Pratylenchus*, или почковидным нематодам, или их комбинации, что обеспечивается локусами/генами устойчивости сои.

103. Растение или семя по пункту 102, где указанное растение или семя содержит EE-GM5 и любой или комбинацию из аллелей/локусов устойчивости к SCN из PI 548316, 10 PI 567305, PI 437654, PI 90763, PI 404198B, PI 88788, PI 468916, PI 567516C, PI 209332, PI 438489B, PI 89772, Peking, PI 548402, PI 404198A, PI 561389B, PI 629013, PI 507471, PI 633736, PI 507354, PI 404166, PI 437655, PI 467312, PI 567328, PI 22897 или PI 494182.

104. Растение или семя, содержащее EE-GM5, описываемый выше, также 15 характеризующееся выносливостью к другим гербицидам, обеспечивающей генами выносливости к гербицидам (или нативными или мутантными генами сои или трансгенами), например, выносливостью к гербицидам на основе глифосата, глюфосината, сульфонилмочевины, имидазолиона, ингибитора HPPD, дикамбы, 2,4-D или ингибитора PPO или любой их комбинации.

105. Растение или семя по пункту 103, где указанное растение или семя содержит 20 EE-GM5, описываемый выше, и одно или несколько из следующих трансгенных объектов сои, полученных в результате трансформации, придающих выносливость к гербицидам: MST-FG072-3, SYN-000H2-5, DAS-68416-4, DAS-44406-6, MON-87708-9, MON89788, MON-04032-6, ACS-GM005-3, п.о.S-CV127-9, ACS-GM006-4, MON-87705-6 или трансгенный объект DP-305423-1.

106. Способ снижения тяжести эффектов синдрома внезапной смерти или 30 железодефицитного хлороза у растений сои в присутствии заражения SCN или повышения урожая растений сои на содержащих SCN полях, пораженных синдромом внезапной смерти, или на содержащих SCN полях, вызывающих железодефицитный хлороз у сои, при этом способ предусматривает посадку растений сои или посев семян сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования РТА-123625.

Краткое описание графических материалов

Следующие примеры, не предназначенные для ограничения настоящего изобретения конкретными описанными вариантами осуществления, могут быть рассмотрены вместе с прилагаемыми графическими материалами, включенными в 5 настоящий документ посредством ссылки, где:

Фигура 1. Схематическое изображение взаимосвязи между приводимыми нуклеотидными последовательностями и праймерами. Черный прямоугольник: вставленная Т-ДНК; заштрихованный прямоугольник: окрашенная в клетку стрелка (а): химерный ген *cry14Ab-1.b* (состав химерного гена см. в таблице 1); заштрихованная 10 стрелка (б): химерный ген *hppdPf-4Pa* (состав химерного гена см. в таблице 1); черные стрелки: олигонуклеотидные праймеры; (с) относится к последовательности, комплементарной указанной нуклеотидной последовательности; черная линия: олигонуклеотидный зонд (число внизу представляет типичный SEQ ID No.). Числа под 15 прямоугольниками, представляющими SEQ ID No. 5 и 6, представляют собой положения нуклеотидов различных элементов в указанных последовательностях. Примечание: схема приведена без учета масштаба.

Фигура 2. Способ граничных точек для анализа идентичности ЕЕ-GM5.

На фигуре 2 показан пример результата способа, описанного в примере 2.1, для ряда образцов сои, содержащих ЕЕ-GM5, и обычных образцов сои. Для каждого образца 20 показаны соотношения S/B как для специфической для ЕЕ-GM5 реакции, так и для эндогенной реакции. На данной фигуре образцы в линиях, помеченных буквой «а», представляют собой образцы сои, не содержащие ЕЕ-GM5, образцы в линиях, помеченные буквой «б», представляют собой образцы сои, содержащие ЕЕ-GM5, и образцы в рамке, образованной линиями, отмеченными буквой «с», являются 25 неинформативными образцами.

Фигура 3. Способ граничных точек для анализа идентичности и зиготности ЕЕ-GM5.

На фигуре 3 показан пример результата способа, описанного в примере 2.2, для ряда образцов сои, содержащих ЕЕ-GM5, в гомозиготном состоянии, образцов сои, 30 содержащих ЕЕ-GM5, в гемизиготном состоянии, и обычных образцов сои. На данной фигуре образцы в линиях, помеченных буквой «а», представляют собой образцы сои, содержащие ЕЕ-GM5 в гомозиготном состоянии, образцы в пределах линий, помеченные

буквой «b», представляют собой образцы сои, содержащие EE-GM5 в гомозиготном состоянии, образцы в линиях, помеченных буквой «с», являются образцами сои, не содержащими EE-GM5, а образцы в рамке, образованной линиями, обозначенными буквой «d», являются неинформативными образцами.

Фигура 4. Способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия низкого уровня EE-GM5

На фигуре 4 показан пример результатов способа RT-PCR, описанного в примере 2.4, для анализа присутствия низкого уровня, выполненного с калибровочными образцами. Буквы «а», «б», «с», «д», «е» указывают значения Ct для калибровочных образцов «A», «B», «C», «D», «E» соответственно. Калибровочные образцы «A», «B», «C», «D», «E» имеют уменьшающиеся количества ДНК EE-GM5.

Фигура 5. Результаты среднего значения данных о максимальной фитотоксичности для обработок гербицидом

На фигуре 5 показано среднее значение данных о максимальной фитотоксичности для растений, зарегистрированных для обработки гербицидами в нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет, для растений сои, содержащих трансгенный объект EE-GM5, по сравнению с нетрансформированными/традиционными растениями сои (Thorne). Числа в () под обработкой показывают количество испытаний, включенных в столбик, число в верхней части каждого столбика дает среднее максимальное значение фитотоксичности для этой обработки. Применяемые обработки представляли собой: IFT = изоксафлутол, MST = мезотрион, PE = до появления всходов, PO = после появления всходов (на стадии V2 - V3 с добавлением вспомогательных средств, маслянистого концентрата и сульфата аммония для повышения активности гербицидов). Показанные нормы приведены в граммах активного ингредиента/га (4-кратная доза до появления всходов, 2-кратная доза после появления всходов).

Фигура 6. Урожай зерна EE-GM5 в Thorne на полях, зараженных SCN

EE-GM5 с исходным фоном трансформанта (Thorne) тестировали в 9 различных местах в штате Айова, Иллинойс, Индиана, Миссури и Теннесси в 2015 и 2016 годах на полях, зараженных SCN (от низкого до высокого заражения SCN). Точка представляет оцениваемый результат гомозиготного трансгенного объекта для каждого испытания (как процентная разница от нуля), горизонтальные линии представляют 95% доверительные пределы различия между гомозиготным трансгенным объектом и ноль-

сегрегантом (если линия не перекрывает вертикальную линию со 100-процентным выходом ноль-сегреганта, то трансгенный объект значительно отличался от ноль-сегреганта). «В разных местах» представляет оцененный результат комбинированного анализа по всем 9 местам.

Фигура 7. Урожай зерна с EE-GM5 на восприимчивом к SCN элитном фоне на полях, зараженных SCN

EE-GM5 интродуцировали (BC2F3) в элитную линию MG I (группа созревания I), которая восприимчива к SCN, и тестировали в одном участке в Миннесоте и одном участке в Северной Дакоте в 2016 году (каждый с высокими уровнями заражения SCN).

Точка представляет оцененный выход гомозиготного трансгенного объекта для каждого испытания (как процентная разница от нуля), горизонтальная линия представляют 95% доверительные пределы различия между гомозиготным трансгенным объектом и ноль-сегрегантом (если линия не перекрывает вертикальную линию со 100-процентным выходом ноль-сегреганта, то трансгенный объект значимо отличался от ноль-сегреганта). «В разных участках» представляет оцененный результат комбинированного анализа по обоим участкам.

Фигура 8. Урожай зерна с EE-GM5 на устойчивом к SCN элитном фоне на полях, зараженных SCN

EE-GM5 скрещивали с элитной линией MG III (группа созревания III), которая является устойчивой к SCN (за счет локуса *rhg1* из PI88788) и тестировали в 3-х местах в 2016 году (испытания, начинающиеся с «16», такие как 16-IN1) и в 7 местах в 2017 году (испытания, начинающиеся с «17», например, 17-IN1) с варьирующими от низких до высоких уровнями заражения SCN (см. стрелку, участки с низким давлением SCN расположены внизу фигуры (например, 17-IL2), а участки с высоким давлением SCN расположены вверху (например, 17-IN1)). Давление SCN определяли с учетом нескольких факторов, в том числе известная история поля, популяции SCN в почве, относительные урожаи устойчивых и восприимчивых контрольных сортов, характеристики почвы (рН и % песка) и визуальная оценка заражения корней у восприимчивых объектов. Точка представляет собой среднюю разницу урожая (в тоннах на гектар) гомозиготного трансгенного объекта в каждом испытании по сравнению с ноль-сегрегантом, горизонтальная линия вокруг точки представляет 95% доверительные пределы различия между гомозиготным трансгенным объектом и ноль-сегрегантом (если

линия не перекрывает вертикальную линию с 0 разницей с ноль-сегрегантом, то урожай трансгенного объекта существенно отличался от ноль-сегреганта). «Средн.» представляет собой средний урожай по всем участкам за каждый год.

Фигура 9. Анализ устойчивости к *Pratylenchus* в теплице на территории США

Элитные растения сои с EE-GM5 контролируют *Pratylenchus brachyurus* в анализах в теплице на территории США. Растения с EE-GM5 («EE-GM5») сравнивали с другими элитными линиями сои: одна линия, восприимчивая к SCN группы зрелости (MG)3 ("THORNE"), одна линия, восприимчивая к SCN MG3, одна линия, восприимчивая к SCN MG 6.2, и одна линия, восприимчивая к SCN MG9 («Воспр. дикий тип» показывает среднее значение для этих 3 линий), одна линия, устойчивая к SCN MG3 (с аллелем устойчивости *rhg1* из PI88788, «SCN Res (PI88788)»), и одна линия, устойчивая к SCN MG 6.2 с *rhg1* и *Rhg4* устойчивостью к SCN из Пекина ("SCN Res (Peking)"). На графике приведены средние количества *Pratylenchus* в корнях через 30 дней после заражения (5 растений на один вариант), также показывающие изменения, наблюдаемые у разных сортов (как это обычно наблюдается в анализах в теплице). Результаты показывают ~90% контроль *Pratylenchus* у линий EE-GM5. Линии сои с нативной устойчивостью к SCN (из Peking или PI88788) не контролируют *Pratylenchus brachyurus*.

Фигура 10. Анализ устойчивости к *Pratylenchus* в теплице на территории

Бразилии

Растения сои, гомозиготные по EE-GM5 («EE-GM5 НН»), значительно уменьшают количество *Pratylenchus brachyurus* в корнях сои. *Pratylenchus brachyurus* выделяли из местных полей в Бразилии. Растения EE-GM5 (в двух разных элитных линиях США (обе группы созревания 6.2, одну восприимчивую к SCN и одну с устойчивостью к SCN Peking («EE-GM5»)) и пять бразильских линий сои с ограниченным контролем *Pratylenchus* («бразильские линии»), одну бразильскую линию, обозначенную как низкий Rf (репродуктивный фактор) в отношении *Pratylenchus* ("BRS 7380 (низкая Rf)", одну элитную линию США (группа созревания 6.2), которая восприимчива к SCN ("SCN Susc"), и одну элитную линию США (MG 6.2) с устойчивостью к SCN Peking ("SCN Res (Peking)") оценивали по контролю *Pratylenchus* в анализе в теплице на территории Бразилии. На графике приведены средние значения этих записей, также показывающие изменения, наблюдаемые у разных сортов (как это

обычно наблюдается в анализах в теплице). Одна бразильская линия сои (BRS 7380) показала снижение *Pratylenchus* на ~89%. Линии EE-GM5 давали ~99% контроль над *Pratylenchus*. Линии сои, которые несут нативную устойчивость к SCN Peking, не контролируют *Pratylenchus brachyurus*.

Фигура 11. Оценки железодефицитного хлороза (IDC) у растений EE-GM5 по сравнению с ноль-сегрегантами

На фигуре 11 показаны оценки IDC у растений сои с EE-GM5 в одном участке (с высоким уровнем заражения SCN). Испытание представляло собой схему дробных делянок (4 графика на вариант), в котором изучали влияние трансгенного объекта на 3 различных фонах (2 чувствительные линии сои и 1 с устойчивостью к SCN из PI88788). Показаны средние значения оценок IDC для растений с трансгенным EE-GM5 («EE-GM5») и соответствующим ноль-сегрегантом («ноль», без EE-GM5) по трем генетическим фонам (1 устойчивый к SCN, 1 восприимчивый к SCN и восприимчивый к SCN фон Thorne). Один столбик представляет 12 суммарных делянок. Вертикальные линии указывают стандартную погрешность («SEM» – стандартная погрешность среднего).

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

В настоящем изобретении EE-GM5 идентифицировали как элитный трансгенный объект из популяции трансгенных растений сои при разработке устойчивой к нематодам сои культурной (*Glycine max*), содержащей ген, кодирующий выносливость к ингибиторам 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD), в сочетании с геном, придающим устойчивость к нематодам, каждый из которых находится под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении. Специализированные средства для применения в идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах описаны в настоящем документе.

Встраивание молекулы рекомбинантной ДНК в геном растения обычно является результатом трансформации клетки или ткани. Конкретный сайт встраивания обычно обусловлен случайным встраиванием.

ДНК, введенную в геном растения в результате трансформации растительной клетки или ткани рекомбинантной ДНК, или "трансформирующей ДНК" и происходящую из такой трансформирующей ДНК, далее называют "вставленной Т-

ДНК", содержащей один или несколько "трансгенов". Трансгены EE-GM5 представляют собой гены устойчивости к нематоде и выносливости к гербициду-ингибитору HPPD. "Растительная ДНК" в контексте настоящего изобретения относится к ДНК, происходящей из трансформированного растения. Растительная ДНК обычно расположена в том же генетическом локусе соответствующего растения дикого типа.

Вставленную Т-ДНК можно характеризовать по местоположению и конфигурации в сайте встраивания молекулы рекомбинантной ДНК в геном растения. Сайт генома растения, куда встраивают рекомбинантную ДНК, также называют "сайтом вставки" или "сайтом-мишенью". Вставка рекомбинантной ДНК в участок генома растения под названием "прединсерционная растительная ДНК" (или "прединсерционный локус") может быть ассоциирована с делецией растительной ДНК, называемой "делецией сайтомишени". "Фланкирующий участок" или "фланкирующая последовательность", как используется в настоящем документе, относится к последовательности из по меньшей мере 10 п.о., по меньшей мере 20 п.о., по меньшей мере 50 п.о. и до 5000 п.о. ДНК, отличающейся от введенной ДНК, предпочтительно ДНК из генома растения, которая расположена либо непосредственно в 5'-направлении и является смежной с ней, либо непосредственно в 3'-направлении и является смежной со вставленной Т-ДНК. Результатом процедур трансформации, приводящих к случайной интеграции вставленной Т-ДНК, является получение трансформантов с различными фланкирующими участками, характерными и уникальными для каждого трансформанта.

Если рекомбинантную ДНК вводят в геном растения путем традиционного скрещивания, сайт ее вставки в геноме растения или ее фланкирующие участки, как правило, не изменяются.

"Выделенная нуклеиновая кислота (последовательность/молекула)" или "выделенная ДНК (последовательность/молекула)", как используют в настоящем документе, относится к нуклеиновой кислоте или ДНК (последовательности/молекуле), которая уже не находится в своем природном окружении, из которого ее выделили, например, последовательность нуклеиновой кислоты в другом (бактериальном) хозяине или в геноме растения, или нуклеиновая кислота, или ДНК (последовательность/молекула) из другого источника, например, в составе химерного гена под контролем (гетерологичного) промотора, экспрессируемого в растении. Любая нуклеиновая кислота или ДНК в соответствии с настоящим изобретением, включая

любой праймер, может являться не существующей в природе, как например, нуклеиновой кислотой или ДНК с последовательностью, идентичной последовательности, которая существует в природе, но имеющая метку (отсутствующую у существующего в природе аналога), или с последовательностью, имеющей по меньшей мере добавление или замену одного нуклеотида или делецию по меньшей мере одного внутреннего нуклеотида по сравнению с существующим в природе нуклеотидом, или с последовательностью, характеризующейся идентичностью последовательности ниже 100% (не идентичной) с существующей в природе нуклеиновой кислотой или ДНК или их фрагментом, или нуклеиновая кислота или ДНК с последовательностью, состоящей из нуклеотидных последовательностей различного происхождения, которые не встречаются вместе в природе (химерная или гибридная ДНК), или искусственная синтетическая нуклеиновая кислота или ДНК с последовательностью, отличной от природной нуклеиновой кислоты, или ДНК или ее фрагмента.

Трансгенным объектом называют (искусственный) генетический локус, который в результате генно-инженерных манипуляций несет вставленную Т-ДНК или трансген, содержащий по меньшей мере одну копию представляющего интерес гена или представляющих интерес генов. Типичные аллельные состояния трансгенного объекта представляют собой наличие или отсутствие вставленной Т-ДНК. Трансгенный объект описывают фенотипически по экспрессии трансгена или трансгенов. На генетическом уровне трансгенный объект является частью генетической композиции растения. На молекулярном уровне трансгенный объект можно описывать по рестриктазной карте (например, в соответствии с определением с помощью Саузерн-блоттинга), по фланкирующим в 5'-направлении и/или в 3'-направлении последовательностям трансгена, положению молекулярных маркеров и/или молекулярной конфигурации трансгена. Обычно трансформация растения с использованием трансформирующей ДНК, содержащей по меньшей мере один представляющий интерес ген, дает популяцию трансформантов, содержащую совокупность отдельных трансгенных объектов, каждый из которых является уникальным. Трансгенный объект характеризуют по вставленной Т-ДНК и по меньшей мере одной из фланкирующих последовательностей.

Элитный трансгенный объект, как используют в настоящем документе, представляет собой трансгенный объект, выбираемый из группы трансгенных объектов, полученных путем трансформации с использованием одной и той же

трансформирующей ДНК, на основании оптимальной эффективности признака и превосходящей экспрессии, стабильности трансгена(ов) и его совместимости с оптимальными агрономическими характеристиками растения, содержащего этот трансгенный объект. Таким образом, критерии селекции элитного трансгенного объекта

5 представляют собой один или несколько, предпочтительно два или более, наиболее предпочтительно все критерии из следующих:

a) эффективность признака;

b) присутствие вставленной ДНК не ставит под угрозу другие благоприятные характеристики растения, такие как характеристики, относящиеся к агрономической характеристике или коммерческой ценности;

c) трансгенный объект характеризуется четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно наследуется и для которой можно разработать подходящее средство контроля идентичности;

d) представляющий(ие) интерес ген(ы) демонстрирует(ют) корректную, надлежащую и стабильную пространственную и временную фенотипическую экспрессию на коммерчески приемлемом уровне в диапазоне условий окружающей среды, при которых возможно нормальное сельскохозяйственное использование растений, несущих данный трансгенный объект.

В предпочтительном случае вставленная Т-ДНК ассоциирована с местоположением в геноме растения, позволяющим легкую интродукцию в коммерчески требуемые генетические фоны.

Элитный статус трансгенного объекта подтверждают интродукцией элитного трансгенного объекта в различных релевантных генетических фонах и наблюдением соответствия одному, двум, трем или всем вышеприведенным критериям, например, a), b), c) и d).

Таким образом, "элитный трансгенный объект" относится к генетическому локусу, содержащему вставленную Т-ДНК и соответствующему вышеописанным критериям. Растение, растительный материал или потомок, например, семена, могут содержать один или несколько элитных трансгенных объектов в своем геноме.

Разработанные средства для идентификации элитного трансгенного объекта или растения, или растительного материала, содержащего элитный трансгенный объект, или продуктов, предусматривающих растительный материал, содержащий элитный

трансгенный объект, основаны на специфических геномных характеристиках элитного трансгенного объекта, например, специфической рестриктазной карте участка генома, содержащей вставленную Т-ДНК, молекулярных маркерах или последовательности фланкирующего(их) участка(ов) вставленной Т-ДНК.

5 После секвенирования одного или обоих фланкирующих участков вставленной Т-ДНК можно разработать праймеры и/или зонды, специфически распознающие эту (эти) последовательность(и) в нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК) образца с помощью молекулярно-биологической методики. Например, можно разработать способ ПЦР для идентификации элитного трансгенного объекта в биологических образцах (например, 10 образцах растений, растительного материала или продуктов, содержащих растительный материал). Такая ПЦР основана на по меньшей мере двух специфических "праймерах", один из которых распознает последовательность в пределах 5'- или 3'-фланкирующего участка Т-ДНК элитного трансгенного объекта, а второй распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК. В предпочтительном случае праймеры имеют 15 последовательность из от 15 до 35 нуклеотидов, которая при оптимизированных для ПЦР условиях "специфически распознает" последовательность в пределах 5'- или 3'-фланкирующего участка Т-ДНК элитного трансгенного объекта и вставленной Т-ДНК элитного трансгенного объекта соответственно, что тем самым приводит к 20 амплификации специфического фрагмента ("интегрированного фрагмента" или отличительного ампликона) в образце нуклеиновой кислоты, содержащем элитный трансгенный объект. Это означает, что при оптимизированных для ПЦР условиях происходит амплификация только целевого интегрированного фрагмента и никакой другой последовательности в геноме растения или вставленной Т-ДНК.

25 Праймеры для ПЦР, подходящие для настоящего изобретения, могут представлять собой:

- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранную из 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК (от нуклеотида 1 до 30 нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24 или растительные геномные последовательности, расположенные в 5'-направлении от

нее и являющиеся смежными с ней), на своем 3'-конце (праймеры, распознающие 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК); или

- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранную из 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК (последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, или растительные геномные последовательности, расположенные в 5'-направлении от нее и являющиеся смежными с ней), на своем 3'-конце (праймеры, распознающие 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК); или

- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранную из вставленных последовательностей Т-ДНК (последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11, или последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности) на своем 3'-конце (праймеры, распознающие вставленную Т-ДНК).

Следует учитывать, что праймеры, распознающие 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК, могут быть использованы в реакции ПЦР вместе с праймерами, распознающими вставленную Т-ДНК, которая выбрана из последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или последовательностей Т-ДНК, расположенных в 3'-направлении от нее и являющихся смежной с ней, тогда как праймеры, распознающие 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК, могут быть использованы в реакции ПЦР вместе с праймерами, распознающими вставленную Т-ДНК, которая выбрана из последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении и являющейся смежной с ней. Праймеры, распознающие вставленную Т-

ДНК, также могут быть выбраны из последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

Разумеется, длина праймеров может быть больше упомянутых 17 последовательных нуклеотидов, и может, например, составлять 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 нуклеотидов и даже больше. Праймеры могут полностью состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из упомянутых нуклеотидных последовательностей фланкирующих последовательностей и вставленных последовательностей Т-ДНК. Однако нуклеотидная последовательность праймеров на их 5'-конце (т. е. за пределами 17 последовательных нуклеотидов, расположенных на 3'-конце) является менее важной. Таким образом, 5'-последовательность праймеров может содержать или состоять из нуклеотидной последовательности, выбранной из фланкирующих последовательностей или вставленной Т-ДНК, если это необходимо, но может содержать несколько (например, 1, 2, 5 или 10) ошибок спаривания по сравнению с Т-ДНК или ДНК, фланкирующей Т-ДНК. 5'-последовательность праймеров может даже полностью являться нуклеотидной последовательностью, не имеющей отношения к фланкирующим последовательностям или вставленной Т-ДНК, например, нуклеотидной последовательностью, представляющей собой один или несколько сайтов для распознавания рестриктазами, или такой, как нуклеотидные последовательности, способные связывать другие олигонуклеотиды, такие как меченные олигонуклеотиды, например, кассеты FRET (LGC genomics; см. Semagn et al., 2014, Mol Breeding 33:1-14, и US 7615620). Длина таких неродственных последовательностей или последовательностей, фланкирующих ДНК, с ошибками спаривания предпочтительно не должна превышать 100, а более предпочтительно 50 или даже 25 нуклеотидов. Праймеры также могут быть модифицированы меткой, такой как флуоресцентная метка.

Кроме того, подходящие праймеры могут содержать, состоять (по сути) из нуклеотидной последовательности на их 3'-конце, перекрывающей соединяющий участок между полученными из 5'- или 3'-последовательностями, фланкирующими участок Т-ДНК, и вставленными последовательностями Т-ДНК (расположенными в нуклеотидах 166 и 167 из SEQ ID No. 5 и нуклеотидах 358 и 359 из SEQ ID No. 6 или нуклеотидах 1113 и 1114 из SEQ ID No. 24 и нуклеотидах 358 и 359 из SEQ ID No. 25), при условии, что упомянутые расположенные на 3'-конце 17 последовательных

нуклеотидов не происходят исключительно из либо вставленной Т-ДНК, либо последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, из SEQ ID No. 5 или 6 или SEQ ID No. 24 или 25.

Для специалиста будет очевидно, что правильно выбранная пара праймеров для ПЦР, кроме того, не должна содержать последовательностей, комплементарных друг другу.

Для целей настоящего изобретения "последовательность, комплементарная нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID No: X" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может быть получена из представленной нуклеотидной последовательности путем замещения нуклеотидов комплементарными им нуклеотидами согласно правилам Чаргаффа ($A \Leftrightarrow T$; $G \Leftrightarrow C$) и чтения последовательности в 5'-3' направлении, т. е. противоположно представленной нуклеотидной последовательности.

Примерами подходящих праймеров являются олигонуклеотидные последовательности под SEQ ID No. 13, или SEQ ID No. 19, или SEQ ID No. 26 или 27 (праймер, распознающий 3'- или 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК), или SEQ ID No. 12, или SEQ ID No. 18, или SEQ ID No. 28 или 29 (праймер, распознающий вставленную Т-ДНК, для применения с праймерами, распознающими 3'- или 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК).

Предпочтительно длина амплифицированного фрагмента составляет от 50 до 500 нуклеотидов, например, от 50 до 150 нуклеотидов. Специфические праймеры могут обладать последовательностью, которая характеризуется 80-100% идентичностью последовательности в пределах 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, элитного трансгенного объекта или вставленной Т-ДНК элитного трансгенного объекта соответственно, при условии, что ошибки спаривания позволяют осуществлять специфическую идентификацию элитного трансгенного объекта с этими праймерами в оптимизированных условиях ПЦР. В то же время диапазон допустимых ошибок спаривания легко определить экспериментально, и эти диапазоны известны специалистам в данной области техники.

Выявление интегрированных фрагментов можно осуществлять разными способами, например, за счет оценки размера после анализа в геле. Интегрированные

фрагменты также можно непосредственно секвенировать. Кроме того, из уровня техники известны другие специфические способы выявления амплифицированных фрагментов ДНК. Амплифицированные фрагменты ДНК также могут быть выявлены с использованием меченых последовательностей и выявления метки. Например, в 5 реакционную смесь может быть включен меченный зонд, который специфически связывается с амплифицированным фрагментом. В одном варианте осуществления меченный зонд (гибридизационный зонд FRET) может содержать флуоресцентную метку и гаситель, в результате чего кассета FRET больше не гасится и не испускает флуоресценцию при связывании с продуктом ПЦР. В качестве альтернативы меченая 10 кассета FRET, т. е. олигонуклеотид, меченный флуоресцентной меткой, и гаситель, может быть введена в реакционную смесь, которая специфически связывается с одним из праймеров в реакционной смеси, как например, кассета FRET, направленная на 15 удлинение праймера в направлении 5', используемого в реакционной смеси (см., например, Semagn et al., 2014, Mol Breeding 33:1-14, и US 7615620). Флуоресценция 20 может быть измерена с использованием известных в уровне техники способов. Флуоресценцию можно измерять в режиме реального времени, т. е. во время каждого цикла реакции ПЦР. Флуоресценция также может быть измерена в конце реакции ПЦР.

Поскольку последовательность праймеров и их относительное местоположение в 25 геноме уникальны для элитного трансгенного объекта, амплификация интегрированного фрагмента будет происходить только в биологических образцах, содержащих элитный трансгенный объект (нуклеиновую кислоту элитного трансгенного объекта). Предпочтительно при проведении ПЦР для идентификации присутствия EE-GM5 в 30 неизвестных образцах включают контроль с набором праймеров, при использовании которых можно амплифицировать фрагмент в пределах "гена домашнего хозяйства" вида растения, содержащего трансгенный объект. Гены домашнего хозяйства представляют собой гены, экспрессирующиеся в большинстве типов клеток и связанные с метаболическими активностями, общими для всех клеток. Размер фрагмента, амплифицированного из гена домашнего хозяйства, превышает размер амплифицированного интегрированного фрагмента. В зависимости от анализируемых образцов можно включать другие контроли.

Стандартные протоколы ПЦР описаны в уровне техники, например, в "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999, or 3rd Edition, 2006)

и других источниках. Оптимальные условия для ПЦР, включая последовательность специфических праймеров, указаны в "Протоколе ПЦР-идентификации (или с помощью полимеразной цепной реакции)" для каждого элитного трансгенного объекта. Вместе с тем, следует понимать, что может возникнуть необходимость в адаптации ряда параметров протокола ПЦР-идентификации к условиям, специфическим для лаборатории, и их незначительной модификации для получения аналогичных результатов. Например, при использовании различных способов получения ДНК может потребоваться изменение, например, используемого количества праймеров, полимеразы и условий отжига. Аналогично выбор других праймеров может диктовать другие оптимальные условия протокола ПЦР-идентификации. Однако эти варианты адаптации очевидны для специалиста в данной области техники и, более того, подробно описаны в современных руководствах по применению ПЦР, например, в указанном выше руководстве.

В качестве альтернативы для амплификации интегрированного фрагмента, который можно использовать в качестве "специфического зонда" для идентификации EE-GM5 в биологических образцах, можно использовать специфические праймеры. Введение в контакт нуклеиновой кислоты из биологического образца с зондом в условиях, при которых возможна гибридизация зонда с соответствующим фрагментом нуклеиновой кислоты, приводит к образованию гибрида нуклеиновая кислота/зонд. Образование этого гибрида можно выявить (например, путем мечения нуклеиновой кислоты или зонда), в соответствии с чем образование этого гибрида указывает на присутствие EE-GM5. Такие способы идентификации, которые основаны на гибридизации со специфическим зондом (на твердофазном носителе или в растворе), описаны в уровне техники. Специфический зонд предпочтительно представляет собой последовательность, которая при оптимизированных условиях специфически гибридизируется с участком, содержащим часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из элитного трансгенного объекта и часть вставленной Т-ДНК, смежную с ним (далее называемый "специфическим участком"). Предпочтительно специфический зонд представляет собой последовательность размером от 50 до 500 п.о. или от 100 до 350 п.о., которая характеризуется на по меньшей мере 80%, или 80-85%, или 85-90%, или 90-95%, или 95%-100% идентичностью (или комплементарна) нуклеотидной последовательности специфического участка EE-GM5. Предпочтительно специфический зонд будет

содержать последовательность из от приблизительно 15 до приблизительно 100 смежных нуклеотидов, идентичную (или комплементарную) специальному участку элитного трансгенного объекта.

Олигонуклеотиды, подходящие для использования в качестве праймеров для ПЦР 5 для выявления элитного трансгенного объекта EE-GM5, также можно использовать для разработки протокола определения статуса зиготности растения, содержащего элитный трансгенный объект, на основе ПЦР. Для этой цели два праймера, распознающие локус дикого типа до интеграции сконструированы так, что они направлены друг на друга и имеют сайт вставки, расположенный между праймерами. Эти праймеры могут 10 предусматривать праймеры, специфически распознающие 5'- и/или 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК из EE-GM5. Этот набор праймеров, распознающий локус дикого типа перед интеграцией, совместно с третьим праймером, комплементарным последовательностям трансформирующей ДНК (вставленной Т-ДНК), позволяет выполнять одновременную диагностическую ПЦР-амплификацию 15 специфического локуса EE-GM5, а также локуса дикого типа. Если растение является гомозиготным по трансгенному локусу или соответствующему локусу дикого типа, то диагностическая ПЦР приведет к образованию одиночного типичного продукта ПЦР, предпочтительно имеющего типичную длину, для трансгенного локуса или локуса дикого типа. Если растение является гемизиготным по трансгенному локусу, то появятся 20 два локус-специфических продукта ПЦР, что отражает амплификацию трансгенного локуса и локуса дикого типа.

В качестве альтернативы для определения статуса зиготности растения, содержащего элитный трансгенный объект, разработали два праймера, распознающих локус дикого типа, перед интеграцией, таким образом, что они направлены друг на друга, 25 и что один праймер специфически распознает 5'- или 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК, содержащиеся в SEQ ID No. 5 или 6 или в SEQ ID No. 24 или 25, и что один праймер специфически распознает 3'- или 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК, содержащиеся в SEQ ID No. 6 или 5 или SEQ ID No. 24 или 25, или специфически распознает прединсерционный локус. В соответствии с настоящим 30 изобретением подходящая пара праймеров, распознающих локус дикого типа перед интеграцией, представляет собой пару праймеров, содержащую один праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID

No. 21, и один праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 19. Этот набор праймеров вместе с третьим праймером, комплементарным трансформирующем последовательностям ДНК (вставленной Т-ДНК) или комплементарным трансформирующим последовательностям ДНК и 5'- или 3'-последовательностям, фланкирующим Т-ДНК, смежным с ними, и в направлении к праймеру, который специфически распознает 5'- или 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК (например, праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 18, который прямо направлен на праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 19), обеспечивает одновременную диагностическую ПЦР-амплификацию специфического для EE-GM5 локуса, а также локуса дикого типа. Если растение является гомозиготным по трансгенному локусу или соответствующему локусу дикого типа, то диагностическая ПЦР приведет к образованию одиночного типичного продукта ПЦР для трансгенного локуса или локуса дикого типа. Если растение является гемизиготным по трансгенному локусу, то появятся два локус-специфических продукта ПЦР, что отражает амплификацию трансгенного локуса и локуса дикого типа.

Выявление продуктов ПЦР, типичных для дикого типа и трансгенного локуса, может быть основано на определении длины продуктов ПЦР, которая может быть типичной для дикого типа и трансгенного локуса. В качестве альтернативы выявление продуктов ПЦР, типичных для дикого типа и трансгенного локуса, может быть выполнено путем модификации праймера, специфического для прединсерционного локуса, и путем модификации праймера, специфического для вставленной Т-ДНК, и выявления встраивания в продукт ПЦР модифицированных праймеров. Например, праймер, специфический для прединсерционного локуса, и праймер, специфический для вставленной Т-ДНК, могут быть мечены с использованием флуоресцентной метки, где метки являются разными для двух праймеров. Флуоресценция может быть выявлена при включении праймера в продукт ПЦР. Если растение является гомозиготным по трансгенному локусу или соответствующему локусу дикого типа, то может быть выявлена флуоресценция метки только праймера, специфического для вставленной Т-ДНК, или только праймера, специфического для прединсерционного локуса. Если растение является гемизиготным по трансгенному локусу, то может быть выявлена

флуоресценция и метки праймера, специфического для вставленной Т-ДНК, и праймера, специфического для прединсерционного локуса, что отражает амплификацию и трансгенного локуса, и локуса дикого типа.

В качестве альтернативы праймер, специфический для прединсерционного локуса, и праймер, специфический для вставленной Т-ДНК, могут иметь 5'-удлинение, которое специфически связывает меченую кассету FRET, т. е. олигонуклеотид, меченный флуоресцентной меткой, и гаситель, где 5'-удлинение и соответствующие кассеты FRET являются разными для двух праймеров (см., например, Semagn et al., 2014, Mol Breeding 33:1-14, и US 7615620). Флуоресценция может быть выявлена при включении праймера в продукт ПЦР, и, следовательно, кассета FRET встраивается в продукт ПЦР. Если растение является гомозиготным по трансгенному локусу или соответствующему локусу дикого типа, то может быть выявлена флуоресценция кассеты FRET, специфически связывающейся только с праймером, специфическим для вставленной Т-ДНК, или кассеты FRET, специфически связывающейся только с праймером, специфическим для прединсерционного локуса. Если растение является гемизиготным по трансгенному локусу, то может быть выявлена флуоресценция кассеты FRET, специфически связывающейся и с праймером, специфическим для вставленной Т-ДНК, и кассеты FRET, специфически связывающейся с праймером, специфическим для прединсерционного локуса, что отражает амплификацию и трансгенного локуса, и локуса дикого типа.

Если растение является гомозиготным по трансгенному локусу или соответствующему локусу дикого типа, то диагностическая ПЦР приведет к образованию одиночного типичного продукта ПЦР, предпочтительно имеющего типичную длину, для трансгенного локуса или локуса дикого типа. Если растение является гемизиготным по трансгенному локусу, то появятся два локус-специфических продукта ПЦР, что отражает амплификацию трансгенного локуса и локуса дикого типа.

В качестве альтернативы для определения статуса зиготности растения, содержащего элитный трансгенный объект, присутствие трансгенного объекта может быть определено в реакции ПЦР количественным способом, как описано в примерах. С этой целью два праймера, распознающие трансгенный объект EE-GM5, сконструировали таким образом, что они направлены друг на друга, при этом один праймер специфически распознает 5'- или 3'-последовательность, flankирующую Т-ДНК, содержащуюся в SEQ

ID No. 5 или 6 или в SEQ ID No. 24 или 25, и при этом один праймер специфически распознает вставленную Т-ДНК в пределах SEQ ID No. 5 или 6, или в пределах SEQ ID No. 24 или 25, или в пределах SEQ ID No. 11 или 23. Этот набор праймеров позволяет ПЦР-амплификацию специфического для EE-GM5 локуса. Амплифицированный фрагмент ДНК может быть количественно выявлен с использованием меченого зонда, который включен в реакционную смесь, которая специфически связывается с амплифицированным фрагментом. Меченный зонд может содержать флуоресцентную метку и гаситель, в результате чего метка больше не гасится и не испускает флуоресценцию при связывании с продуктом ПЦР. Флуоресценцию можно измерять в режиме реального времени, т. е. во время каждого цикла реакции ПЦР с использованием известных из уровня техники способов. Цикл ПЦР, при котором флуоресценция превышает определенный пороговый уровень, является показателем количества специфического для EE-GM5 локуса в анализируемом биологическом образце, и статус зиготности может быть рассчитан на основе эталонных гомозиготных и гетерозиготных образцов.

В качестве альтернативы статус зиготности растений, содержащих EE-GM5, также может быть определен на основе анализа количества копий с использованием химии Taqman и принципов ПЦР в режиме реального времени. Альтернативный способ обычно предусматривает специфическую для EE-GM5 реакцию для количественного определения количества копий EE-GM5 и специфическую для эндогенного гена реакцию для нормализации количества копий EE-GM5. Образцы, содержащие трансгенный объект EE-GM5 в гомозиготном состоянии, будут иметь относительное количество копий, которое в два раза выше, чем у гемизиготных образцов. В азиготных образцах не будет амплифицироваться последовательность EE-GM5 в таком способе.

Кроме того, используя представленную в настоящем документе специфическую информацию о последовательности элитного трансгенного объекта, можно разработать специфические способы выявления элитного трансгенного объекта EE-GM5, отличающиеся от способов амплификации на основе ПЦР. Такие альтернативные способы выявления включают способы выявления усиления линейного сигнала на основе инвазивного расщепления конкретных структур нукleinовой кислоты, также известные как технология InvaderTM (согласно описанию, например, в патентах США № 5985557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", № 6001567 "Detection of Nucleic Acid

sequences by Invader Directed Cleavage", включенные в настоящий документ посредством ссылки). С этой целью последовательность-мишень гибридизируют с меченым первым олигонуклеотидом нукleinовой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 167 до положения нуклеотида 184 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 341 до положения нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, а затем гибридизируют со вторым олигонуклеотидом нукleinовой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 149 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным олигонуклеотидом нукleinовой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 376 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, где указанные первый и второй олигонуклеотиды перекрываются по меньшей мере по одному нуклеотиду.

Двойная или тройная структура, образующаяся при этой гибридизации, дает возможность селективного расщепления зонда ферментом (Cleavase®) при сохранении целевой последовательности интактной. После этого выполняют выявление расщепленного меченого зонда, предположительно через промежуточную стадию, приводящую к дальнейшему усилению сигнала.

В одном варианте осуществления представлен способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах путем гибридизации с по сути комплементарным меченым зондом на основе нукleinовой кислоты, при котором соотношение зонд:целевая нукleinовая кислота увеличивается за счет повторного использования последовательности целевой нукleinовой кислоты, при этом указанный способ предусматривает:

а) гибридизацию указанной последовательности целевой нукleinовой кислоты с первым олигонуклеотидом нукleinовой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 167 до положения нуклеотида 184 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нукleinовой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 341 до положения нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;

5 б) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 149 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 376 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, где указанные первый и второй олигонуклеотиды перекрываются по меньшей мере по одному нуклеотиду, и где любой из указанного первого или указанного второго олигонуклеотида является меченый с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;

10 15 20 25
c) расщепление только меченого зонда в пределах дуплекса зонд:последовательность целевой нуклеиновой кислоты с помощью фермента, вызывающего селективное расщепление зонда, что приводит к диссоциации дуплекса и оставляет целевую последовательность интактной;

d) повторное использование последовательности целевой нуклеиновой кислоты путем повторения стадий (a) – (c); и

e) выявление расщепленного меченого зонда, за счет чего осуществляют определение присутствия указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и определение присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в указанных биологических образцах.

Две нуклеиновые кислоты являются "по сути комплементарными", как используют в настоящем документе, когда они не полностью комплементарны друг другу (как определено в настоящем документе), например, когда их последовательности на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% комплементарны друг другу.

"Набор", как используют в настоящем документе, относится к набору реагентов для осуществления способа по настоящему изобретению, в частности, идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах или определения статуса зиготности растительного материала, содержащего EE-GM5. Более конкретно, 30 предпочтительный вариант осуществления набора по настоящему изобретению предусматривает по меньшей мере один или два специфических праймера, описываемых выше, для идентификации элитного трансгенного объекта, или три специфических

праймера, или два специфических праймера и один специфический зонд, описываемый выше, для определения статуса зиготности. Необязательно набор может дополнительно содержать любой другой реагент, описываемый в настоящем документе в протоколе для ПЦР-идентификации или в любом из других протоколов, описываемых в настоящем документе, для выявления EE-GM5. В качестве альтернативы согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения набор может содержать специфический зонд, описываемый выше, специфически гибридизирующийся с нуклеиновой кислотой в биологических образцах, для идентификации присутствия EE-GM5 в них. Необязательно набор может дополнительно содержать любой другой реагент (такой как без ограничения гибридизирующий буфер, метка) для идентификации EE-GM5 в биологических образцах с использованием специфического зонда.

Набор по настоящему изобретению может быть использован, а его компоненты могут быть специфически адаптированы для целей контроля качества (например, чистоты партий семян), выявления присутствия или отсутствия элитного трансгенного объекта в растительном материале или в материале, содержащем растительный материал или полученном из него, таком как без ограничения пищевые, или кормовые, или промышленные продукты.

Как используют в настоящем документе, "идентичность последовательностей" по отношению к нуклеотидным последовательностям (ДНК или РНК) относится к количеству положений с идентичными нуклеотидами, разделенному на количество нуклеотидов в более короткой из двух последовательностей. Выравнивание двух нуклеотидных последовательностей осуществляют согласно алгоритму Уилбера и Липманна (Wilbur and Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726), используя размер окна, равный 20 нуклеотидам, длину слова, равную 4 нуклеотидам, и штраф за введение гэпа, равный 4. Компьютерный анализ и интерпретацию данных о последовательности, включая выравнивание последовательностей, описанное выше, можно выполнить, например, с помощью программного пакета анализа последовательностей Genetics Computer Group (GCG, Биотехнологический центр Висконсинского университета). Последовательности называют "по сути сходными", если такие последовательности характеризуются идентичностью последовательностей, составляющей по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере

приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99%, или по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,9%. Очевидно, что если о последовательностях РНК говорят как о по 5 сути сходных или характеризующихся некоторой степенью идентичности с последовательностями ДНК, то тимидин (Т) в последовательности ДНК приравнивают к урацилу (У) в последовательности РНК. Кроме того, очевидно, что со временем в последовательностях ДНК могут возникать небольшие различия или мутации, и что некоторые ошибки спаривания могут быть допустимы для специфических для 10 трансгенного объекта праймеров или зондов в соответствии с настоящим изобретением, поэтому любая последовательность ДНК, указанная в настоящем документе в любом варианте осуществления настоящего изобретения для любой 3'- или 5'-фланкирующей ДНК Т-ДНК, или для любой вставки или вставленной Т-ДНК, или любого праймера или зонда по настоящему изобретению, также включает последовательности, которые по 15 сути сходны с последовательностями, представленными в настоящем документе, такими как последовательности, гибридизирующиеся с по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с последовательностью, приведенной для любой 3'- или 5'-фланкирующей ДНК Т-ДНК, для любого праймера или зонда или для любой вставки или вставленной Т-ДНК по 20 настоящему изобретению, такие как нуклеотидная последовательность, отличающаяся 1-200, 1-150, 1-100, 1-75, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10, 1-5 или 1-3 нуклеотидами от любой данной последовательности.

Термин "праймер", используемый в настоящем документе, охватывает любую 25 нукleinовую кислоту, способную являться затравкой синтеза образующейся нукleinовой кислоты в процессе матричного синтеза, например, ПЦР. Обычно праймеры представляют собой олигонуклеотиды от 10 до 30 нуклеотидов, однако можно использовать и более длинные последовательности. Праймеры могут быть представлены в двухнитевой форме, хотя предпочтительной является однонитевая форма. Зонды можно использовать в качестве праймеров, однако они предназначены для связывания с 30 ДНК- или РНК-мишениями и не требуются в процессе амплификации.

Термин "распознавание", используемый в настоящем документе в отношении специфических праймеров или зондов, относится к тому факту, что специфические

праймеры или зонды специфически гибридизируются с последовательностью нуклеиновой кислоты элитного трансгенного объекта в условиях, приведенных согласно способу (например, в условиях согласно протоколу ПЦР-идентификации), при этом специфичность определяют по присутствию положительных и отрицательных

5 контролей.

Термин "гибридизирующийся", используемый в настоящем документе в отношении специфических зондов, относится к тому, что зонд связывается со специфическим участком в последовательности нуклеиновой кислоты элитного трансгенного объекта при условиях стандартной жесткости. Условия стандартной жесткости, как используют в настоящем документе, относятся к условиям гибридизации, описываемым в настоящем документе, или к стандартным условиям гибридизации согласно описанию в Sambrook et al., 1989 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), которая, например, может предусматривать следующие стадии: 1) иммобилизация фрагментов геномной ДНК растения на фильтре, 2) предварительная гибридизация фильтра в течение 1-2 часов при 42°C в 50% формамиде, 5 X SSPE, 2 X реагенте Денхардта и 0,1% SDS или в течение 1-2 часов при 68°C в 6 X SSC, 2 X реагенте Денхардта и 0,1% SDS, 3) добавление меченого гибридизационного зонда, 4) инкубация в течение 16-24 часов, 5) промывка фильтра в течение 20 минут при комнатной температуре в 1 X SSC, 0,1% SDS, 6) трехкратная промывка фильтра в течение 20 минут, каждый раз при 68°C в 0,2 X SSC, 0,1% SDS, и 7) экспонирование фильтра в течение 24-48 часов на рентгеновской пленке при -70°C с усиливающим экраном.

Используемый в настоящем документе биологический образец представляет собой образец растения, растительного материала или продуктов, содержащих растительный материал. Термин "растение" включает ткани растения сои (*Glycine max*) на любой стадии развития, а также любые клетки, ткани или органы, собранные или происходящие от любого такого растения, включая без ограничения любые семена, листья, стебли, цветки, корни, отдельные клетки, гаметы, культуры клеток, культуры тканей или протопласты "Растительный материал", как используют в настоящем документе, относится к материалу, полученному или происходящему от растения. Продукты, содержащие растительный материал, относятся к продуктам питания, кормам или другим продуктам, полученным с использованием растительного материала, или они

могут быть загрязнены растительным материалом. Следует учитывать, что в контексте настоящего изобретения такие биологические образцы тестируют на присутствие нуклеиновых кислот, специфических для EE-GM5, предполагая присутствие нуклеиновых кислот в этих образцах. Таким образом, способы в настоящем документе 5 для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах относятся к идентификации нуклеиновых кислот, составляющих элитный трансгенный объект, в биологических образцах.

Как используют в настоящем документе, "содержащий" следует понимать как обозначение наличия указанных свойств, целых чисел, стадий, реагентов или 10 компонентов, к которым относится термин, не исключающее наличия или добавления одного или нескольких свойств, целых чисел, стадий, компонентов или их групп. Так, например, нуклеиновая кислота или белок, содержащие последовательность нуклеотидов или аминокислот, может содержать, кроме фактически указанных, дополнительные нуклеотиды или аминокислоты, т. е. являясь частью более крупной 15 нуклеиновой кислоты или белка. Химерный ген, содержащий функционально или структурно определенную последовательность ДНК, может содержать дополнительные последовательности ДНК, например, промотор, лидерную, трейлерную 20 последовательности и/или последовательности терминации транскрипции (возможно, также включая ДНК, кодирующую нацеливающий или транзитный пептид).

Настоящее изобретение также относится к конструированию элитного трансгенного объекта EE-GM5 в растениях сои, содержащих этот трансгенный объект, к 25 растениям-потомкам и семенам, содержащим элитный трансгенный объект EE-GM5, полученным из этих растений, и к клеткам растений или растительному материалу, полученным из растений, содержащих этот трансгенный объект. Растения, содержащие элитный трансгенный объект EE-GM5, могут быть получены так, как описано в примерах. Настоящее изобретение также относится к семени, содержащему элитный 30 трансгенный объект EE-GM5, депонированному в ATCC под номером депонирования РТА-123625, или к его производным, содержащим элитный трансгенный объект EE-GM5. "Производные (семени)", как используют в настоящем документе, относятся к растениям, которые могут вырасти из такого семени, потомку, полученному в результате самоопыления, скрещивания или возвратного скрещивания, а также к растительным

клеткам, органам, частям, тканям, культурам клеток, протопластам и растительному материалу.

Растения сои или растительный материал, содержащий EE-GM5, можно идентифицировать согласно любому из протоколов идентификации для EE-GM5, как описано в примерах, включая способ конечной точки для анализа идентификации EE-GM5 в примере 2.1, способ конечной точки для анализа идентификации EE-GM5 и зиготности, как описано в примере 2.2, способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия низких уровней EE-GM5, как описано в примере 2.3, или ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия низких уровней EE-GM5, как описано в примере 2.4. Вкратце геномную ДНК сои, присутствующую в биологическом образце, амплифицируют с помощью ПЦР с использованием праймера, который специфически распознает последовательность в пределах 5'- или 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM5, такого как праймер с последовательностью под SEQ ID NO: 13 или SEQ ID No. 19, и праймера, который распознает последовательность во вставленной Т-ДНК, такого как праймер с последовательностью под SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 18, или праймера, который распознает 5'- или 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, из EE-GM5 и вставленную Т-ДНК, смежную с ней. ДНК-праймеры, амплифицирующие часть эндогенной последовательности сои, используют в качестве положительного контроля ПЦР-амплификации. Если при ПЦР-амплификации материал дает фрагмент ожидаемого размера или возбуждает флуоресценцию предполагаемой флуоресцентной метки, то этот материал содержит растительный материал из растения сои, несущего элитный трансгенный объект EE-GM5.

Растения, несущие EE-GM5, характеризуются устойчивостью к нематоде, в частности, устойчивостью к SCN, ранящей нематоде, и/или галловой нематоде ("RKN"), и/или почковидной нематоде, а также своей выносливостью к ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. Растения сои различных коммерчески доступных сортов, несущих EE-GM5, также характеризуются агрономическими характеристиками, сопоставимыми с соответствующими нетрансгенными изогенными коммерчески доступными сортами, в отсутствии внесения гербицида-ингибитора HPPD и заражения SCN. Обнаружено, что присутствие вставленной Т-ДНК в участке вставки генома растения сои, описываемого в настоящем документе, придает растениям,

содержащим этот трансгенный объект, особенно интересные фенотипические и молекулярные характеристики.

Также в настоящем документе представлен способ получения растения сои, устойчивого к SCN и выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD, предусматривающий введение признака устойчивости к SCN и выносливости к гербицидам-ингибиторам HPPD в геном растения сои путем скрещивания первого растения сои, у которого отсутствует ген, кодирующий Cgy14Ab-1, и у которого отсутствует ген, кодирующий HPPD-4, с растением сои, содержащим EE-GM5, и отбор растения-потомка, устойчивого к SCN и выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD. Устойчивость к SCN может быть измерена с использованием стандартного анализа SCN в теплице, например, www.plantpath.iastate.edu/tylkalab/greenhouse-resistance-screening и www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2009/sce08/.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к элитному трансгенному объекту в растениях сои, которое можно получить путем вставки 2 трансгенов в специфическом местоположении в геноме сои, при этом элитный трансгенный объект придает таким растениям сои устойчивость к нематодам и выносливость к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и где такой элитный трансгенный объект обладает агрономической характеристикой, по сути сходной с такими характеристиками у изогенных линий (используемые в настоящем документе "изогенные линии" или "практически изогенные линии" представляют собой линии сои с тем же генетическим фоном, но без трансгенов, например, растения с тем же генетическим фоном, что и растение, используемое для трансформации, или сегрегирующиеся сестринские линии ("нули"), утратившие трансгены). В частности, в настоящем изобретении представлен элитный трансгенный объект в растениях сои, где вставка или присутствие указанного элитного трансгенного объекта в геноме таких растений сои не вызывает повышенной чувствительности к болезням, не вызывает потери урожайности или не вызывает усиления полегания по сравнению с изогенными линиями или с коммерческими культиварами сои. Следовательно, в настоящем изобретении представлен элитный трансгенный объект в растениях сои, обозначаемый как EE-GM5, приводящий к получению растений сои, которые обладают улучшенной устойчивостью к нематодам и выносливостью к вносимым гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или

мезотрион, и не оказывающий отрицательного влияния на указанные растения сои по сравнению с изогенными линиями, при этом указанные растения сои не обладают статистически значимыми различиями, касающимися восприимчивости к болезням или полегания, по сравнению с изогенными растениями сои или с коммерческими 5 культурами сои. Указанные характеристики делают данный элитный трансгенный объект ценным инструментом в программе по контролю нематод и контролю устойчивых сорняков. В одном варианте осуществления трансгенный объект EE-GM5 объединяют с одним или несколькими трансгенными объектами GM сои, обеспечивающими выносливость в какому-либо или к комбинации гербицидов на основе 10 глифосата, на основе глюфосината, на основе ингибитора HPPD, на основе сульфонилмочевины или на основе имидазолинона, AHAS- или ALS-ингибирующего и/или ауксинового типа (например, дикамба, 2,4-D), такими как трансгенный объект EE-GM3 (известный как FG-072, MST-FG072-3, описанный в WO2011063411, USDA-APHIS Petition 09-328-01p), трансгенный объект SYHT0H2 (известный как 0H2, SYN-000H2-5, 15 описанный в WO2012/082548 и 12-215-01p), трансгенный объект DAS-68416-4 (известный как Enlist Soybean, описанный в WO2011/066384 и WO2011/066360, USDA-APHIS Petition 09-349-01p), трансгенный объект DAS-44406-6 (известный как Enlist E3, DAS-44406-6, описанный в WO2012/075426 и USDA-APHIS 11-234-01p), трансгенный 20 объект MON87708 (выносливый к дикамбе трансгенный объект Roundup Ready 2 Xtend Soybeans, описанный в WO2011/034704 и USDA-APHIS Petition 10-188-01p, MON-87708-9), трансгенный объект MON89788 (известный как Genuity Roundup Ready 2 Yield, описанный в WO2006/130436 и USDA-APHIS Petition 06-178-01p), трансгенный объект 40-3-2 (известный как Roundup Ready, GTS 40-3-2, MON-04032-6, описанный в USDA-APHIS Petition 93-258-01), трансгенный объект A2704-12 (известный как LL27, 25 ACS-GM005-3, описанный в WO2006108674 и USDA-APHIS Petition 96-068-01p), трансгенный объект 127 (известный как BPS-CV127-9, описанный в WO2010/080829), трансгенный объект A5547-127 (известный как LL55, ACS-GM006-4, описанный в WO2006108675 и в USDA-APHIS Petition 96-068-01p), трансгенный объект MON87705 (MON-87705-6, Vistive Gold, опубликованная РСТ заявка на патент WO2010/037016, 30 USDA-APHIS Petition 09-201-01p) или трансгенный объект DP305423 (известный как DP-305423-1, опубликованная РСТ заявка на патент WO2008/054747, USDA-APHIS Petition 06-354-01p), или EE-GM5 объединяют с комбинацией следующих трансгенных объектов:

трансгенный объект MON98788 x MON87708 (известный как Roundup Ready 2 Xtend Soybeans, MON-87708-9 x MON-89788-1), трансгенный объект HOS x трансгенный объект 40-3-2 (известный как Plenish High Oleic Soybeans x Roundup Ready Soybeans), трансгенный объект EE-GM3 x EE-GM2 (известный как FG-072xLL55, описанный в 5 WO2011063413), трансгенный объект MON 87701 x MON 89788 известный как Intacta RR2 Pro Soybean, MON-87701-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (известный как Conkesta™ Enlist E3™ Soybean, DAS-81419-2 x DAS-44406-6), трансгенный объект DAS-68416-4 x трансгенный объект MON 89788 (известный как Enlist™ RoundUp Ready® 2 Soybean, DAS-68416-4 X MON-89788-1), трансгенный объект 10 MON-87769-7 x трансгенный объект MON-89788-1 (известный как Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans), трансгенный объект MON 87705 x трансгенный объект MON 89788 (известный как Vistive Gold, MON-87705-6 x MON-89788-1) или трансгенный объект MON87769 x трансгенный объект MON89788 (известный как Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans, MON-87769-7 x MON-89788-1).

15 В настоящем документе также представлены растение сои или его часть, содержащие трансгенный объект EE-GM5, где типичное семя сои, содержащее трансгенный объект EE-GM5, депонировано в ATCC под номером доступа PTA-123625. Кроме того, в настоящем документе представлены семена таких растений, содержащие такой трансгенный объект, а также соевый продукт, полученный из таких семян, где 20 указанный соевый продукт содержит трансгенный объект EE-GM5. Такой соевый продукт может представлять собой или предусматривать соевый шрот, молотое соевое зерно, соевые хлопья, или продукт, предусматривающий любой из этих переработанных соевых продуктов. В частности, такой соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, образующую ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта EE-GM5, при этом такой ампликон содержит 25 последовательность под любым из SEQ ID No. 1 или 3 или SEQ ID No. 2 или 4. Также в настоящем документе представлен способ получения соевого продукта, предусматривающий получение семени сои или зерна, содержащего трансгенный объект EE-GM5, и получение из него такого соевого продукта. Также в настоящем документе 30 представлен способ получения переработанных пищевых, кормовых или промышленных продуктов, полученных из соевого зерна, таких как соевое масло, соевый белок, лецитин, соевое молоко, тофу, маргарин, биодизельное топливо, биокомпозиты, клеи,

растворители, смазки, очистители, пена, краска, чернила, свечи, или содержащие соевое масло или соевый белок пищевые или кормовые (для животных) продукты, при этом указанный способ предусматривает получение зерна, содержащего EE-GM5, и получение указанного переработанного пищевого, кормового или промышленного 5 продукта из указанного зерна. В одном варианте осуществления данный способ также может включать стадию получения семени сои или растения, содержащего трансгенный объект EE-GM5, выращивания указанного семени или растения в поле и сбора зерна сои. Необязательно данный способ предусматривает внесение гербицида-ингибитора НРРД, такого как IFT, топрамезон или мезотрион, перед посадкой, перед появлением всходов, 10 после появления всходов или на надземную часть растений, содержащих EE-GM5. В одном варианте осуществления в настоящее изобретение включены вышеупомянутые полученные из сои переработанные пищевые, кормовые или промышленные продукты, такие как переработанные продукты, которые дают специфический для трансгенного объекта EE-GM5 ампликон, при использовании способов, описываемых в настоящем 15 документе, или которые содержат нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или SEQ ID No. 2, 4 или 6.

Также в настоящем документе представлено растение сои, которое является потомком любого из вышеупомянутых растений сои и которое содержит трансгенный 20 объект EE-GM5, как например, растение-потомок или семя любого из вышеупомянутых растений сои, которое содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4, или растение-потомок или семя любого из вышеупомянутых растений сои, которое содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 и последовательность под SEQ ID No. 2 или 4, или растение-потомок или семя любого из вышеупомянутых растений сои, которое содержит последовательность под SEQ ID No. 25, или последовательность под SEQ ID No. 5 или SEQ ID No. 24, или последовательность под SEQ ID No. 6 или SEQ ID No. 25, или растение-потомок или семя любого из вышеупомянутых растений сои, 25 которое содержит последовательность под SEQ ID No. 5 или SEQ ID No. 24 и последовательность под SEQ ID No. 6 или SEQ ID No. 25.

Кроме того, в настоящем документе представлен способ получения растения сои, 30 устойчивого к нематодам и выносливого к гербициду изоксафлутолу, и/или топрамезону, и/или мезотриону, предусматривающий введение в геном такого растения трансгенного объекта EE-GM5, в частности, путем скрещивания первого растения сои без

трансгенного объекта EE-GM5 с растением сои, содержащим EE-GM5, и отбор растения-потомка, устойчивого к нематодам и выносливого к гербициду изоксафлутолу, и/или топрамезону, и/или мезотриону.

Также в настоящем документе представлено растение сои, устойчивое к нематодам и выносливое к гербициду изоксафлутолу, топрамезону или мезотриону, с приемлемыми сельскохозяйственными характеристиками, содержащее ген, кодирующий Cgt14Ab-1, и ген, кодирующий HPPD-4, и способное давать ампликон, имеющий диагностическое значение для трансгенного объекта EE-GM5. Также в настоящем документе представлены собственно специфические выделенные ампликоны (фрагменты последовательности ДНК), которые можно получить с использованием специфических средств для выявления, описываемых в настоящем документе, в частности, ампликоны, последовательность которых включает фрагмент ДНК, происходящий из 5'- или 3'-фланкирующей ДНК Т-ДНК и ДНК, вставленной в геном растения путем трансформации, как определено в настоящем документе.

Кроме того, в настоящем документе представлен способ контроля сорняков в поле растений сои, содержащих трансгенный объект EE-GM5, или в поле, предназначенном для посадки таких растений сои (где посадку указанных растений сои осуществляют в указанном поле после обработки), предусматривающий обработку поля эффективным количеством гербицида-ингибитора HPPD, такого как гербицид на основе изоксафлутола, или на основе топрамезона, или на основе мезотриона, где такие растения являются выносливыми к такому гербициду.

Кроме того, в настоящем документе представлена ДНК, содержащая последовательность под SEQ ID No. 5 или 6 или последовательность, которая по сути сходная с ней, и любые растение, клетка, ткань или семя, в частности, сои, содержащие такую последовательность ДНК, такие как растение, клетка, ткань или семя, содержащие EE-GM5. Также в настоящем документе представлены любые растение, клетка, ткань или семя сои, содержащие последовательность ДНК (гетерологичную или чужеродную в отношении традиционного растения сои, семени, ткани или клетки) под SEQ ID No. 5 или 6, или содержащие последовательность ДНК, которая характеризуется по меньшей мере 99% или 99,5% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID No. 5 или 24 или SEQ ID No. 6 или 25.

Также описывается химерная ДНК, содержащая вставленную Т-ДНК, где последовательность указанной вставленной Т-ДНК содержит последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23, или последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней, фланкируемую 5'- и 3'-участком, фланкирующим Т-ДНК, где 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположенный непосредственно в 5'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и являющийся смежным с ней, характеризуется последовательностью, содержащей последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, и где 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположенный непосредственно в 3'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и являющийся смежным с ней, характеризуется последовательностью, содержащей последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6 или нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25. В одном варианте осуществления последовательность указанной вставленной Т-ДНК состоит из последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23, или последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней, фланкируемой частью 5'- и 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, где часть указанного 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, расположенная непосредственно в 5'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и являющаяся смежной с ней, характеризуется последовательностью, состоящей из последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, или последовательностью, которая характеризуется на по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней, и где часть 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, расположенная непосредственно в 3'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и являющаяся смежной с ней, характеризуется последовательностью, состоящей из последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID

No. 25, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней.

Химерная ДНК относится к последовательностям ДНК, включая регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются вместе в природе.
5 Соответственно, химерная ДНК может содержать участки ДНК, смежные друг с другом, которые получены из разных источников или расположены иначе, чем в природе. Примерами химерной ДНК являются последовательности под SEQ ID No. 5 или 6.

Также в настоящем документе представлены трансгенные растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме трансгенный объект EE-GM5, 10 характеризующиеся молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, по сути подобную SEQ ID No. 1 или 3, и молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, по сути подобную SEQ ID No. 2 или 4, или комплементарную последовательность указанных последовательностей, а также растение, клетка растения, ткань или семя сои, содержащие в своем геноме 15 трансгенный объект EE-GM5, характеризующиеся молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по сути сходна с SEQ ID No. 5 или 24 и SEQ ID No. 6 или 25, или с последовательностью, указанным последовательностям.

Более того, в настоящем документе представлены растение сои, клетка, ткань или 20 семя, содержащие EE-GM5, характеризующиеся содержанием в геноме своих клеток последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID No. 1, 3,5 или 24, и 25 последовательности, которая характеризуется по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25, или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

30 Термин "изоксафлутол", как используют в настоящем документе, относится к гербициду изоксафлутолу [т. е. (5-циклогексил-4-изоксазолил)[2-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)фенил]метанон], его активному метаболиту дикетонитрилу и любым

смесям или растворам, содержащим указанное соединение. Гербицидами, ингибирующими HPPD, применимыми для применения с трансгенным объектом по настоящему изобретению, являются дикетонитрилы, например, 2-циано-3-циклопропил-1-(2-метилсульфонил-4-трифторметилфенил)-пропан-1,3-дион и 2-циано-1-[4-(метилсульфонил)-2-трифторметилфенил]-3-(1-метилциклопропил)пропан-1,3-дион; другие изоксазолы; и пиразолинаты, например, топрамезон [т. е. [3-(4,5-дигидро-3-изоксазолил)-2-метил-4-(метилсульфонил)фенил](5-гидрокси-1-метил-1Н-пиразол-4-ил)метанон] и пирасульфотол [(5-гидрокси-1,3-диметилпиразол-4-ил(2-мезил-4-трифторметилфенил)метанон]; или мезотрион [2-[4-(метилсульфонил)-2-нитробензоил]циклогексан-1,3-дион]; или 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамид]; или 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамид; или пиразофен [2-[4-(2,4-дихлорбензоил)-1,3-диметилпиразол-5-илокси]ацетофенон].

В одном варианте осуществления настоящего изобретения поле, предназначенное для посадки растений сои, содержащих трансгенный объект EE-GM5, может быть обработано гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол ('IFT'), топрамезон или мезотрион, или и гербицидом-ингибитором HPPD, и глифосатом, перед посевом сои, что очищает поле от сорняков, уничтожаемых ингибитором HPPD и/или глифосатом, позволяя использование технологии нулевой обработки почвы, с последующими посадкой или посевом сои в то же предварительно обработанное поле позже (выжигающее применение с использованием гербицида-ингибитора HPPD). Остаточная активность IFT также защитит появляющиеся и растущие растения сои от конкуренции с сорняками на ранних стадиях роста. Как только растения сои достигают определенного размера, а сорняки начинают вновь появляться, ингибитор HPPD, или смесь ингибитора HPPD с селективным (обычным) соевым гербицидом, или смесь ингибитора HPPD с неселективным для сои гербицидом (например, глифосатом или глюфосинатом), но к которому у растения имеется ген/локус выносливости, за счет которого указанные растения являются выносливыми к указанному гербициду, могут быть внесены в качестве послевсходового гербицида со стороны надземной части растений.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения поле, на котором были посеяны семена, содержащие трансгенный объект EE-GM5, может быть обработано гербицидом-ингибитором HPPD, таким как IFT, топрамезон или мезотрион,

до всхода растений сои, но после посева семян (поле может быть освобождено от сорняков перед посевом с использованием других средств, в том числе традиционных технологий подготовки почвы, таких как вспашка, культиваторная обработка или подготовка посевных мест), при этом остаточная активность будет поддерживать поле 5 свободным от сорняков, уничтожаемых гербицидом, обеспечивая всходам и растущим растениям сои отсутствия конкуренции с сорняками (довсходовое внесение гербицида-ингибитора HPPD). Как только растения сои достигают определенного размера, а сорняки начинают вновь появляться, ингибитор HPPD, или смесь ингибитора HPPD с 10 селективным (традиционным) соевым гербицидом, или смесь ингибитора HPPD с неселективным для сои гербицидом (например, глифосатом или глюфосинатом), но к которому у растения имеется ген/локус выносливости, за счет которого указанные 15 растения являются выносливыми к указанному гербициду, могут быть внесены в качестве послевсходового гербицида со стороны надземной части растений. В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ контроля сорняков, предусматривающий посев на поле семян сои, содержащих EE-GM5, и обработку указанного поля гербицидом-ингибитором HPPD до появления всходов 20 растений из указанного семени, но после посева семян.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растения, содержащие трансгенный объект EE-GM5, могут быть обработаны гербицидом-ингибитором HPPD, таким как IFT, топрамезон или мезотрион, со стороны надземной части растений сои, взошедших из посевных семян, что очищает поле от сорняков, 25 уничтожаемых ингибитором HPPD, при этом внесение можно осуществлять совместно (например, в результате смешивания в опрыскивателе), до или после обработки селективным для сои послевсходовым гербицидом, или гербицидом, который не является селективным для сои (например, глифосатом или глюфосинатом), но к которому у растений имеется ген/локус выносливости, за счет которого указанные 30 растения являются выносливыми к указанному гербициду, со стороны надземной части растений (послевсходовое внесение гербицида-ингибитора HPPD (с указанным селективным для сои или неселективным гербицидом или без него)).

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением растения сои, несущие EE-GM5 (которые также могут содержать другой трансгенный объект/признак выносливости к гербицидам, как описывается в настоящем документе), могут быть

обработаны, или семена сои, несущие EE-GM5, могут быть покрыты любым соевым инсектицидом, гербицидом или фунгицидом.

В следующих примерах описано конструирование и идентификация элитного трансгенного объекта EE-GM5, выведение различных линий сои, содержащих данный трансгенный объект, и разработка средств для специфической идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах.

Если в примерах не указано иное, все рекомбинантные методики осуществляют в соответствии со стандартными протоколами согласно описанию в "Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York" и в "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds.) (2006) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York".

Стандартные материалы и ссылки описаны в "Croy RDD (ed.) (1993) Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford", а также в "Brown TA, (1998) Molecular Biology LabFax, 2nd Edition, Academic Press, San Diego". Стандартные материалы и методики полимеразных цепных реакций (ПЦР) можно найти в "McPherson MJ and Møller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford", и в "PCR Applications Manual, 3rd Edition (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim или www.roche-applied-science.com".

Следует понимать, что ряд параметров в любом лабораторном протоколе, таком как протоколы для ПЦР, в приведенных ниже примерах, могут потребовать корректировки в соответствии с конкретными лабораторными условиями и могут быть незначительно модифицированы для получения аналогичных результатов. Например, использование другого способа для получения ДНК или выбор других праймеров в способе ПЦР может диктовать другие оптимальные условия для протокола ПЦР. Однако эти варианты изменений очевидны для специалиста в данной области техники и, более того, подробно описаны в современных руководствах по применению ПЦР.

В настоящем описании и примерах ссылаются на следующие последовательности в прилагаемом перечне последовательностей:

SEQ ID No. 1: 5'-пограничная последовательность из EE-GM5

SEQ ID No. 2: 3'-пограничная последовательность из EE-GM5

SEQ ID No. 3: 5'-пограничная последовательность из EE-GM5

- SEQ ID No. 4: 3'-пограничная последовательность из EE-GM5
 SEQ ID No. 5: 5'-участок из EE-GM5
 SEQ ID No. 6: 3'-участок из EE-GM5
 SEQ ID No. 7: кодирующая последовательность *cry14Ab-1.b*
 5 SEQ ID No. 8: аминокислотная последовательность белка Cry14Ab-1
 SEQ ID No. 9: кодирующая последовательность *hppdPf-4Pa*
 SEQ ID No. 10: аминокислотная последовательность белка HPPD-4
 SEQ ID No. 11: плазмида для трансформации pSZ8832 – последовательность
 между границами Т-ДНК
 10 SEQ ID No. 12: праймер PRIM1038
 SEQ ID No. 13: праймер PRIM1039
 SEQ ID No. 14: зонд TM1788
 SEQ ID No. 15: праймер KVM164
 SEQ ID No. 16: праймер KVM165
 15 SEQ ID No. 17: зонд TM1242
 SEQ ID No. 18: праймер PRIM1041
 SEQ ID No. 19: праймер PRIM1040
 SEQ ID No. 20: зонд TM1789
 SEQ ID No. 21: праймер PRIM1629
 20 SEQ ID No. 22: зонд TM2083
 SEQ ID No. 23: трансгенный объект EE-GM5 сои
 SEQ ID No. 24: 5'-пограничная последовательность из EE-GM5
 SEQ ID No. 25: 3'-пограничная последовательность из EE-GM5
 SEQ ID No. 26: праймер GLPA210
 25 SEQ ID No. 27: праймер GLPA212
 SEQ ID No. 28: праймер GLPB167
 SEQ ID No. 29: праймер GLPB170
 SEQ ID No. 30: праймер PRIM2123
 SEQ ID No. 31: праймер PRIM2122
 30 SEQ ID No. 32: зонд TM2327
 SEQ ID No. 33: последовательность прединсерционного локуса

Примеры

1. Трансформация *Glycine max* геном устойчивости к нематоде и выносливости к гербицидам

1.1. Описание вставленной Т-ДНК, содержащей химерные гены *cry14Ab-1.b* и *hppdPf-4Pa*

5 Выводили сою с EE-GM5 с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с использованием вектора pSZ8832, содержащего кассеты экспрессии *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b*:

(i) мутантный ген *hppdPf-4Pa*, который кодирует белок HPPD-4 (аминокислотная последовательность которого показана под SEQ ID No. 10).
10 Конструировали кодирующую последовательность *hppdPf-4Pa* путем введения точковых мутаций в положение 335 (замена Glu на Pro), в положение 336 (замена Gly на Трп), в положение 339 (замена Lys на Ala) и в положении 340 (замена Ala на Gln) в ДНК, кодирующей белок HPPD, полученный из штамма A32 *Pseudomonas fluorescens*. Экспрессия белка HPPD-4 придает выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион.

(ii) Ген *cry14Ab-1.b* кодирует белок Сгу14Ab-1 (аминокислотная последовательность которого показана под SEQ ID No. 8). Экспрессия белка Сгу14Ab-1 придает устойчивость к нематодам, таким как соевая цистообразующая нематода *Heterodera glycines*.

20 Плазмида pSZ8832 представляет собой вектор для трансформации растений, который содержит химерный ген *cry14Ab-1.b* и химерный ген *hppdPf-4Pa*, расположенные между правой границей (RB) Т-ДНК и левой границей (LB) Т-ДНК. Описание генетических элементов, содержащихся в Т-ДНК между правой и левой границами Т-ДНК, приведено в таблице 1 ниже. Подтверждающее секвенирование Т-ДНК (между границами Т-ДНК) этой плазмиды дало последовательность под SEQ ID No. 11. Нуклеотидная последовательность кодирующих последовательностей *cry14Ab-1.b* и *hppdPf-4Pa* (которая показывает кодирующую нить) представлена под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно.

30 Таблица 1. Описание генетических элементов между границами Т-ДНК в pSZ8832 и положений нуклеотидов в SEQ ID No. 11.

Положение в SEQ ID No. 11	Ориентация	Описание
1-130		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании
131-400	В направлении против часовой стрелки	Последовательность, включающая 3'-нетранслируемый участок транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты (Sanfaçon et al., 1991, Genes & development, 5(1), 141-149)
401-411		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании
412-3969	В направлении против часовой стрелки	<i>cry14Ab-1.b</i> : последовательность, кодирующая ген дельта-эндотоксина <i>Bacillus thuringiensis</i>
3970-5276	В направлении против часовой стрелки	Pub10At: последовательность, включающая промоторный участок гена убиквитина-10 <i>Arabidopsis thaliana</i> (Grefen et al., 2010, The Plant journal, 64(2), 355-365)
5277-5381		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании
5382-5576	В направлении против часовой стрелки	Последовательность, включающая 3'-нетранслируемый участок транскрипта 35S вируса мозаики цветной капусты (Sanfaçon et al., 1991, Genes & development, 5(1), 141-149)
5577-5588		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании

Положение в SEQ ID No. 11	Ориентация	Описание
5589–6665	В направлении против часовой стрелки	<i>hppdPf-4Pa</i> : последовательность, кодирующая вариант 4-гидроксифенилпиреватдиоксигеназы, полученная из <i>Pseudomonas fluorescens</i>
6666–7037	В направлении против часовой стрелки	TPotpY-1Pf: последовательность, кодирующая оптимизированное производное транзитного пептида (в положении 55 замена на Тир), содержащая последовательность генов малой субъединицы RuBisCO <i>Zea mays</i> и <i>Helianthus annuus</i> (патент США № 5510471)
7038–7058		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании
7059–7185	В направлении против часовой стрелки	Последовательность, включающая лидерную последовательность геномной РНК вируса гравировки табака (Allison et al., 1985, Virology, 147(2), 309-316)
7186–7191		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании
7192–7941	В направлении против часовой стрелки	Последовательность, включающая участок с двумя энхансерами транскрипта 35S генома вируса мозаики цветной капусты (Kay et al., 1987, Science, 236(4806), 1299-1302)
7942–8068		Полилинкерная последовательность: последовательность, используемая в клонировании

1.2. Трансгенный объект EE-GM5

Т-ДНК-вектор pSZ8832 вводили в *Agrobacterium tumefaciens* и трансформированные растения сои (сорт Thorne) отбирали с использованием выносливости к ингибитору HPPD согласно известным из уровня техники способам. Затем выжившие растения самоопыляли с получением семени Т1. Последующие поколения получали посредством самоопыления или посредством скрещивания с другой зародышевой плазмой сои.

1.2.1 Идентификация элитного трансгенного объекта EE-GM5

Элитный трансгенный объект EE-GM5 отбирали на основании процедуры обширного отбора (на основе параметров, включающих без ограничения эффективность признака в теплице и поле, молекулярные характеристики и агрономические характеристики) из широкого диапазона различных полученных в результате трансформации объектов, полученных с использованием одних и тех же химерных генов. Выяснили, что растения сои, содержащие EE-GM5, имеют вставку трансгенов в одном локусе в геноме растения сои, имеют общие агрономические признаки, сходные с родительскими растениями, используемыми для трансформации, чтобы избежать потери урожайности из-за вставки трансформирующей ДНК (по сравнению с соответствующей изогенной линией без трансгенного объекта, такой как «нулевая» линия растений, полученная из трансформированного растения, от которого трансгены сегрегируют), что приводит в результате к значительному сокращению количества взрослых женских особей, заражающих корни в стандартном анализе SCN в теплице, и имеют улучшенный урожай под давлением нематод SCN в поле по сравнению с изогенной нулевой линией, не содержащей EE-GM5. Кроме того, выносливость к применению гербицидов-ингибиторов HPPD измеряли в полевых испытаниях, но выносливость к гербицидам не являлась критерием отбора для отбора элитного трансгенного объекта.

1.2.1.1 Молекулярный анализ трансгенного объекта

Результаты Саузерн-блоттинга показали, что EE-GM5 содержит один трансгенный локус, который содержит одну копию химерного гена *cry14Ab-1.b* и одну копию химерного гена *hppdPf-4Pa*. В EE-GM5 отсутствует часть промотора 35S химерного гена *hppdPf-4Pa* (что указывает на то, что не вся Т-ДНК под SEQ ID No. 11 была вставлена в геном сои в ходе трансформации). Фрагменты ПЦР не были получены при анализе ПЦР с использованием праймеров, нацеливающихся на векторные

последовательности остова, которые фланкируют левую и правую границу Т-ДНК, а также последовательность *aadA*. Кроме того, присутствие идентичных фрагментов интеграции EE-GM5 в нескольких поколениях EE-GM5 демонстрирует структурную стабильность трансгенного объекта.

5 1.2.1.2 Наследование трансгенного объекта

Наследование вставки вставленной Т-ДНК в последующих поколениях путем тестирования генотипа с генами *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b* с помощью анализа ПЦР показывает, что гены *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b*, содержащиеся во вставке EE-GM5, наследуются предсказуемым образом и, как ожидается, для одной вставки. Эти данные согласуются с менделевскими принципами и подтверждают вывод о том, что трансгенный объект EE-GM5 состоит из одной вставки, интегрированной в один хромосомный локус в пределах ядерного генома сои.

10 Кроме того, анализ паттернов сегрегации EE-GM5 в последующих поколениях после интроверсии EE-GM5 в 5 элитных линий сои подтвердил нормальную менделевскую сегрегацию. В таблице 2 показана наблюдаемая сегрегация EE-GM5 в 15 разных сегрегирующих популяциях.

Таблица 2. Анализ сегрегации EE-GM5

Родительское растение	Поколение	Наблюдали				Статистические показатели		
		НН	Hemi	Нулевые	Всего	Хи- квадрат	P- значение	Признак
Родительское растение 1	BC2F2	481	903	497	1881	3,26	0,20	ns
Родительское растение 1	BC3F2	108	200	102	410	0,42	0,81	ns
Родительское растение 2	BC2F2	45	101	50	196	0,44	0,80	ns
Родительское растение 2	BC3F2	16	37	25	78	2,28	0,32	ns
Родительское растение 3	BC2F2	57	127	57	241	0,70	0,70	ns
Родительское растение 3	BC3F2	12	39	27	78	5,77	0,06	ns

Родительское растение 4	F2	174	397	197	768	2,26	0,32	ns
Родительское растение 5	BC2F2	72	132	89	293	4,84	0,09	ns

В таблице 2 «НН» обозначает гомозиготные растения, «Неми» - гемизиготные растения, а «нулевые» - ноль-сегреганты, утратившие ЕЕ-GM5, а «ns» - отсутствие статистической значимости (в отношении любого отклонения от нормальной/ожидаемой сегрегации). В этих испытаниях родительским растением 1 была линия MG VI с *Rhg1* и *Rhg4* нативной устойчивости к SCN, родительским растением 2 была линия MG VI, восприимчивая к SCN, родительским растением 3 была линия MG IX, восприимчивая к SCN, родительским растением 4 была линия MG III с *Rhg1* нативной устойчивости к SCN, а родительским растением 5 была линия MG I, восприимчивая к SCN.

1.2.1.3 Стабильность экспрессии белка

Уровни экспрессии белков HPPD-4 и Cgt14Ab-1 в выращиваемых в теплице растениях определяли с помощью сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) образцов листьев, корней и семян, собранных из разных поколений (например, T4, T6 и BC2F3) сои ЕЕ-GM5. HPPD-4 и Cgt14Ab-1 демонстрируют схожие средние уровни экспрессии в листке, корне и семени во всех тестируемых поколениях. Любые различия, наблюдаемые в концентрациях Cgt14Ab-1 и HPPD-4, объясняли естественной изменчивостью между растениями.

1.2.1.4 Агрономическая характеристика и выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD

В испытаниях по агрономической эквивалентности растения, содержащие ЕЕ-GM5, на исходном фоне трансформации (Thorne), сравнивали с сегрегирующими ноль-сегрегантами (без ЕЕ-GM5) и с растениями Thorne дикого типа при выращивании в отсутствие SCN. Делянки не обрабатывали гербицидами-ингибиторами HPPD, но поддерживали свободными от сорняков путем применения традиционных гербицидов и ручного пропалывания при необходимости. Каких-либо различий, влияющих на агрономическую характеристику биологически значимым образом, не наблюдали между растениями, содержащими трансгенный объект, и ноль-сегрегантами (без ЕЕ-GM5) при выращивании в сопоставимых испытаниях в разных местах при проверке качественных

характеристик растений, таких как цвет цветка, цвет боба, цвет семян и опушение, а также количественных характеристик, таких как урожайность, высота, полегание, прямостоячность и количество дней до созревания. Следовательно, растения, содержащие EE-GM5, показали нормальные агрономические характеристики, сопоставимые с соответствующими нетрансгенными растениями.

Дополнительные испытания с EE-GM5 на исходном фоне трансформации Thorne проводили в 2017 году. Предварительные испытания, в которых EE-GM5 находился в элитных генетических фонах MG1 и MG3, также проводили в ограниченном количестве участков в 2017 году. При проверке качественных характеристик растений, таких как цвет цветка, цвет боба, цвет семян и опушение, а также количественных характеристик, таких как урожайность, высота, полегание, прямостоячность, тестовый вес и количество дней до созревания, никаких существенных и значимых различий между трансгенным объектом EE-GM5 и ноль-сегрегантами (без EE-GM5) не обнаруживали в каком-либо из трех генетических фонов, что подтверждает тот факт, что растения, содержащие EE-GM5, показывали нормальные агрономические характеристики.

Выносливость растений, содержащих EE-GM5, к гербицидам-ингибиторам HPPD тестируют в разных местах в поле на протяжении 2-х лет. В этих испытаниях выяснили, что растения с EE-GM5 имели коммерчески значимую выносливость к изоксафлутолу (IFT) при внесении до появления всходов, а также при внесении после появления всходов, но повреждение культуры было несколько выше при внесении IFT до появления всходов. Эти испытания также показали, что растения, содержащие трансгенный объект EE-GM5, имели коммерчески значимую выносливость к мезотриону (MST) при внесении до появления всходов или при внесении после появления всходов. Все обработки после появления всходов проводили на стадии V2 - V3 с добавлением вспомогательных средств, масляного концентрата и сульфата аммония для повышения активности гербицидов.

На фигуре 5 показано среднее значение данных о максимальной фитотоксичности (повреждения растений), зарегистрированных в случае обработки гербицидами в нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет, для растений сои, содержащих трансгенный объект EE-GM5, по сравнению с нетрансформированными/обычными растениями сои (Thorne). Контрольные нетрансформированные растения Thorne показали средние значения максимальной фитотоксичности от приблизительно 80 до

90% в тех же испытаниях, демонстрируя, что эти гербициды-ингибиторы HPPD не переносятся соей (не GM). «Максимальная фитотоксичность», используемая в настоящем документе, представляет собой наивысшую оценку фитотоксичности, зафиксированную в любом наблюдении на протяжении испытания (с 3-4 наблюдениями на испытание). В существующих внесениях для контроля сорняков нормальная (1x) доза для изоксафлутола (IFT) при до- или послевсходовом внесении и для MST при послевсходовом внесении составляет 105 г/га, а нормальная (1x) доза для мезотриона при довсходовом внесении составляет 210 г/га. Следовательно, в этих испытаниях, представленных на фиг. 5, внесения, применяемые до появления всходов на фиг. 5 (420 г/га для IFT, 840 г/га для мезотриона), в 4 раза превышали нормальную дозу, а после появления всходов (210 г/га для каждого из IFT и мезотриона) в 2 раза превышали нормальную дозу.

На 3-й год растения с EE-GM5 (на фоне Thorne) при обработке изоксафлутолом (IFT, 410 г/га) до появления всходов в одном месте полевого испытания имели максимальную фитотоксичность 9%, а при обработке изоксафлутолом (IFT) после появления всходов (стадия V2 - V3, при 210 г/га) в 4 местах среднее значение максимальной фитотоксичности составляло 10,9%, что подтверждает выносливость, наблюдалась ранее.

Также в некоторых полевых испытаниях на протяжении 2 лет растения сои с трансгенным объектом EE-GM5 демонстрировали хорошую выносливость к экспериментальному соединению-ингибитору HPPD – 2-метил-N-(5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)-3-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)бензамиду – (патент США № 9101141) при внесении до появления всходов при 400 г а.и./га или после появления всходов при 200 г а.и./га соответственно (среднее значение максимальной фитотоксичности для каждой обработки было ниже 20%). В этих испытаниях растения сои с трансгенным объектом EE-GM5 также демонстрировали хорошую выносливость (средняя максимальная фитотоксичность 20%) к экспериментальному соединению ингибитору HPPD – 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамиду – (патент США № 8481749) при внесении после появления всходов при 100-150 г а.и./га. Все обработки после появления всходов проводили на стадии V2 - V3 с добавлением вспомогательных средств, масляного концентрата и сульфата аммония для повышения активности гербицидов. На 3-й год растения с EE-GM5

(на фоне Thorne) при обработке 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамидом при 150 г/га после появления всходов в 3-х местах полевого испытания демонстрировали среднюю максимальную фитотоксичность 13,3%.

Те же самые или очень похожие средние оценки максимальной фитотоксичности, как описанные на фиг. 5, получали для IFT при добавлении данных, полученных в 3-м сезоне полевых испытаний выносливости к гербицидам, с внесением гербицида изоксафлутола в тех же дозировках до появления или после появления всходов растений с EE-GM5, но в другом географическом местоположении.

Кроме того, растения с EE-GM5 при обработке после появления всходов (V2-V3) топрамезоном в дозе 36 г а.и./га (+ СОС и AMS) в 2 полевых испытаниях в США дали среднюю максимальную фитотоксичность 11%, демонстрируя, что EE-GM5 также обеспечивает надлежащую выносливость к этому ингибитору HPPD.

1.2.1.5 Устойчивость к нематоде

Стандартные анализы SCN с измерением показателя женских особей в теплице показали значительное снижение количества цист SCN на корнях растений, содержащих EE-GM5, по сравнению с растениями сои Thorne дикого типа. Кроме того, стандартные анализы SCN с измерением показателя женских особей в теплице также показали, что растения сои, содержащие трансгенный объект EE-GM5 и имеющие признак нативной устойчивости к SCN, демонстрировали значительное снижение количества цист SCN на корнях по сравнению с устойчивыми к SCN элитными линиями сои без EE-GM5. Когда EE-GM5 интродукционировали в элитную линию сои с устойчивостью сои PI88788 (группа созревания 3) или в элитную линию сои с устойчивостью сои Peking (группа созревания 6.2), то наблюдали последовательное уменьшение количества цист SCN на корнях по сравнению с корнями только с нативной устойчивостью.

В полевых испытаниях на протяжении 2 лет в нескольких местах растения сои, содержащие EE-GM5, давали значительное увеличение урожайности по сравнению с изогенными ноль-сегрегантами на полях, зараженных SCN. На фигуре 6 показан урожай зерна EE-GM5 с исходным фоном трансформанта (Thorne), которые тестировали в 9 различных местах в штате Айова, Иллинойс, Индиана, Миссури и Теннесси в 2015 и 2016 годах на полях, зараженных SCN (от низкого до высокого заражения SCN). Дополнительные испытания с EE-GM5 на исходном фоне трансформанта (Thorne) проводили в 2017 году в общей сложности в 12 местах с различным давлением SCN. Во

всех этих 12 испытаниях растения, содержащие EE-GM5, давали в среднем на 10% более высокие урожаи, чем ноль-сегреганты без EE-GM5 ($p = 0,003$). На фиг. 7 показан урожай зерна EE-GM5 при интрогрессии (BC2F3) в элитную линию MG I (группа созревания I), которая восприимчива к SCN, и тестировании в одном месте в Миннесоте и одном месте в Северной Дакоте в 2016 году (каждое с высокими уровнями заражения SCN). Ту же самую линию MG I тестировали в тех же двух местах (каждый раз снова с высоким уровнем заражения SCN) и на дополнительном участке в Висконсине в 2017 году (последний имеет умеренное давление SCN), и при этом урожай зерна растений, содержащих EE-GM5, был неизменно выше, чем у соответствующих ноль-сегрегантов без EE-GM5. И наконец, предварительные исследования в трех местах с умеренным или высоким давлением SCN в Бразилии в испытаниях с поздней посадкой в 2017 году показали значительное среднее увеличение на 31% ($p = 0,01$) в элитной восприимчивой линии для растений с EE-GM5 по сравнению с ноль-сегрегантами (без EE-GM5). Из-за поздней даты посадки общие урожаи в этих предварительных бразильских испытаниях имели тенденцию к снижению, а изменчивость в пределах одного испытания была довольно высокой, что, возможно, повлияло на величину увеличения урожая, но наблюдали явно значительное и визуально заметное увеличение урожая у растений с EE-GM5. Следовательно, трансгенный объект EE-GM5 обеспечивает значительное увеличение урожая растений сои на полях, зараженных SCN.

В исследовании с оценкой влияния трансгенного объекта EE-GM5 на урожайность в сочетании с нативной устойчивостью к SCN выводили ряд популяций F3 из одного скрещивания EE-GM5 с элитной обычной линией MG III, несущей ген устойчивости *rhg1* из PI88788. В популяциях F3 одну популяцию с «пакетированными» генами, которая является гомозиготной как по трансгенному объекту EE-GM5, так и по аллелю *rhg1*, сравнивали с популяцией, гомозиготной только по аллелю *rhg1* (без EE-GM5). Проводили испытания урожайности с этими популяциями в 2016 году в трех местах с заражением SCN от умеренного до высокого и в 2017 году в семи местах с давлением SCN в диапазоне от низкого до высокого. Результаты представлены на фигуре 8. Все испытания в 2017 году включали три разные обработки семян. Никаких существенных различий в урожайности или взаимодействий не наблюдали ни для одной из этих обработок семян по отдельности, поэтому данные обработок семян объединяли для обеспечения наилучших статистических оценок различия урожайности между

гомозиготным (НН) трансгенный объектом и ноль-сегрегантом. Как показано на фиг. 8, во всех трех местах в 2016 году популяция с «пакетированными» генами (растения, гомозиготные по трансгенному объекту EE-GM5 и аллелю *rhg1*) давала на 8% большую урожайность, чем популяция, несущая только аллель *rhg1* ($p = 0,08$), а в испытаниях 2017

5 года получали увеличение средней урожайности на 11% у растений, гомозиготных по трансгенному объекту EE-GM5 и аллелю *rhg1* ($p = 1,24-11$), по сравнению с популяцией, несущей только аллель *rhg1*. Для сравнения среднее увеличение урожайности для линий, содержащих EE-GM5, в испытаниях 2017 года только с базовой обработкой семян (фунгицид Evergol® Energy + Allegiance® + инсектицид Poncho®) составило 0,27 т/га

10 (увеличение урожайности на 10,2%; $p = 0,0002$). Основной обработкой семян, использованной во всех испытаниях 2016 года, был фунгицид Evergol® Energy + Allegiance®. Как показано на фигуре 8, во всех 10 испытаниях за оба года наблюдали тесную взаимосвязь между прибавкой урожая и давлением SCN, при этом на участках с высоким давлением SCN наблюдали более существенную прибавку урожая (верхняя

15 часть фиг. 8). Эти результаты показывают, что добавление трансгенного объекта EE-GM5 в сорта сои с традиционной устойчивостью к SCN может обеспечить значительное увеличение урожайности на полях, зараженных SCN.

Проведение испытаний на урожайность при умеренном или высоком заражении SCN является сложной задачей из-за многих факторов, которые влияют на результаты. Плотности популяций SCN на полях могут существенно варьировать, поэтому общее влияние SCN на урожайность также может варьировать от одной делянки к другому (см., например, www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2009/sce08/). Благоприятные типы почв, хорошая фертильность и достаточное количество осадков могут смягчить воздействие заражения SCN на растение сои и могут минимизировать воздействия на урожайность даже при высокой численности популяций SCN. Многие поля с очень высокой численностью популяций SCN обычно имеют бедные почвы и, следовательно, более низкий потенциал урожайности, что затрудняет выявление статистически значимых воздействий на урожайность. Таким образом, данные об урожайности в полевых испытаниях с SCN могут быть достаточно вариабельными, и при этом не ожидали существенных улучшений урожайности в каждом испытании с высокой численностью популяций SCN. Общие тенденции по всем испытаниям являются наиболее релевантными критериями для оценки продуктивности трансгенного объекта.

Полевые испытания с SCN, которые проводили с растениями, содержащими EE-GM5, ставили в полевых условиях с естественным заражением SCN. Экспериментальные блоки состояли из делянки поля, содержащей от 2 до 4 рядов, расположенных на расстоянии 0,76 м друг от друга и длиной от 3,8 до 9,1 м. Количество рядов на делянку и 5 длину делянки варьировали от места к месту в зависимости от размера поля и конфигурации оборудования. Делянки засевали по 26 семян на метр, поэтому каждый экспериментальный блок содержал от 200 до 960 семян. Делянки рандомизировали в поле с использованием схемы расщепленных делянок или дважды расщепленных делянок. Схемы дробных делянок хорошо подходят для минимизации влияния высокой 10 изменчивости типа почвы или популяций SCN, что является обычным явлением на полях, зараженных SCN. В полевых испытаниях с SCN растения, содержащие EE-GM5, высаживали на субделянке рядом или очень близко к составляющей пару субделянке, содержащей растения, являющиеся ноль-сегрегантами (без EE-GM5). Тесная близость двух делянок помогает минимизировать влияние изменчивости (SCN) в поле на оценку 15 разницы между растениями с трансгенным объектом EE-GM5 и без него. Большинство испытаний воспроизводили четыре раза, но некоторые воспроизводили три раза, а некоторые воспроизводили пять или шесть раз.

В 2016 году в двух местах (Индиана и Айова) наблюдали поражения синдромом внезапной смерти со степенью от умеренной до сильной. Делянки в этих двух местах 20 оценивали по частоте возникновения и тяжести симптомов SDS, а индекс болезни (DX) SDS вычисляли с использованием «способа SIUC подсчета SDS» (www.scnresearch.info/462.pdf). Оценки DX для растений, гомозиготных по EE-GM5, были на 61% ниже в Индиане и на 55% ниже в Айове, чем для восприимчивого ноль-сегреганта (без EE-GM5), что указывает на то, что трансгенный объект обеспечивал 25 защиту от заражения SDS. SDS и SCN часто тесно ассоциированы в полевых условиях и будут демонстрировать некоторую взаимосвязь у растения (см., например, www.cajeresearchinfo.com/pdf_docs/sdsupdate.pdf, и

www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/pages/suddendeath.aspx).

В 2017 году баллы по железодефицитному хлорозу (IDC) были получены в случае 30 с растениями с EE-GM5 (и их ноль-сегрегантами) в одном месте испытания в США (с высоким заражением SCN), где наблюдали симптомы IDC. Испытание имело схему дробных делянок, при этом рассматривали влияние трансгенного объекта в трех разных

фонах. Оценки IDC определяли, как описано в Cianzio et al. (1979) Crop Science 19: 644-646. На фиг. 11 показаны средние значения оценок IDC для растений с трансгенным объектом EE-GM5 и соответствующих им ноль-сегрегантов (без EE-GM5) среди трех генетических фонов (1 устойчивый к SCN (устойчивость PI88788), 1 восприимчивый к SCN и восприимчивый к SCN фон Thorne). Значительно более низкие оценки IDC обнаруживали в случае растений, содержащих EE-GM5, по сравнению с их ноль-сегрегантами. Следовательно, EE-GM5 значительно снижало тяжесть IDC на листьях в полевых испытаниях, где растения сои подвергались заражению как SCN, так и IDC. Это снижение происходило у трех линий сои, одна из которых характеризовалась нативной устойчивостью к SCN типа PI 88788.

Кроме того, семена нетрансформированного Thorne и EE-GM5 проращивали и высаживали в теплицу для проверки контроля ранящей нематоды *Pratylenchus brachyurus*. Нематоды *Pratylenchus brachyurus* (1500/растение, разные стадии развития) наносили на растения 2-недельного возраста. Через 30 дней после нанесения нематод *Pratylenchus* извлекали из корней и подсчитывали. Среднее количество нематод, выявленных в корнях растений, содержащих EE-GM5, сравнивали со средним количеством нематод *Pratylenchus*, выявленных в корнях растений Thorne дикого типа. В среднем на приблизительно 80-90% меньше нематод *Pratylenchus* находили в корнях растений, содержащих EE-GM5, по сравнению с корнями контрольных растений Thorne, что свидетельствует о значимом контроле ранящих нематод за счет трансгенного объекта EE-GM5 у сои.

На фигуре 9 показаны результаты анализа *Pratylenchus brachyurus* в теплице в США, в котором сравнивали элитные линии с EE-GM5 в 5 элитных линиях сои (одна – восприимчивая к SCN (MG 1), одна – устойчивая к SCN (PI88788, MG 3), одна – восприимчивая к SCN (MG 6.2), одна – устойчивая к SCN (Peking, MG 6.2) и одна – восприимчивая к SCN (MG 9)) с восприимчивыми к SCN и устойчивыми к SCN линиям сои США. Растения сои выращивали в маленьких конических горшочках и выдерживали в теплицах с температурой от 25 до 32°C. Нематоды *Pratylenchus brachyurus*, полученные из Южной Каролины и выращенные в теплице, использовали для инокуляции растений на стадии развития V2 - V3. С использованием приблизительно 1500 яиц + взрослых особей инокулировали одно растение, и в каждом варианте было 5 растений. Через 30 дней после заражения нематоды и яйца извлекали из корней и подсчитывали. Каждый

вариант выполняли в двух независимых экспериментах. В то время как восприимчивые к SCN и устойчивые к SCN линии сои США не демонстрировали контроль над *Pratylenchus*, растения с EE-GM5 демонстрировали приблизительно 90% контроль в отношении *Pratylenchus*.

На фигуре 10 показаны результаты анализа *Pratylenchus brachyurus* в теплице в Бразилии, в котором сравнивали растения сои с EE-GM5 с бразильскими линиями сои без устойчивости и 1 линией с низким Rf, а также с восприимчивыми к SCN и устойчивыми растениями. Линии сои выращивали в маленьких конических горшочках и выдерживали в теплицах с температурой от 25 до 32°C. Нематоды *Pratylenchus brachyurus*, полученные из полей Бразилии и выращенные в теплице, использовали для инокуляции растений на стадии развития V2 - V3. С использованием приблизительно 1000 яиц + взрослых особей инокулировали одно растение, и в каждом варианте было 5 растений. Через 30 дней после заражения нематоды и яйца извлекали из корней и подсчитывали. Показаны результаты одного эксперимента. Одна бразильская линия сои (BRS 7380), отмеченная как имеющая низкий репродуктивный фактор в отношении *Pratylenchus*, показала снижение *Pratylenchus* на приблизительно 89%. Растения с EE-GM5 давали ~99% контроль над *Pratylenchus*. Линии сои, которые характеризуются нативной устойчивостью к SCN (rhg1 + rhg4), не контролируют *Pratylenchus brachyurus*.

Кроме того, растения, содержащие EE-GM5, можно использовать для контроля галловых нематод (RKN), таких как *Meloidogyne incognita*. Несмотря на то, что популяция *Meloidogyne incognita* слабо заражает сою Thorne дикого типа, растения Thorne с EE-GM5 демонстрируют дальнейшее снижение количества яиц RKN/масса корня в среднем по сравнению с нетрансформированными растениями Thorne.

1.2.2 Идентификация фланкирующих участков и вставленной Т-ДНК элитного трансгенного объекта EE-GM5

Последовательность участков, фланкирующих вставленную Т-ДНК и смежной с ними Т-ДНК, как они содержатся в элитном трансгенном объекте EE-GM5, показаны в прилагаемом перечне последовательностей.

1.2.2.1 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК

Фрагмент, идентифицированный как содержащий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, секвенировали и его нуклеотидную последовательность представили под SEQ ID No. 5, нуклеотиды 1-166. 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, состоит из

геномных последовательностей сои, соответствующих последовательности прединсерционного локуса (SEQ ID № 5, нуклеотиды 1-166). 5'-пограничный участок, содержащий часть последовательности вставленной Т-ДНК и часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, смежную с ней, представлена под SEQ ID № 1 и 3.

1.2.2.2 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК

Фрагмент, идентифицированный как содержащий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM5, секвенировали, и его нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID № 6, нуклеотиды 359-691. Такой 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, 10 состоит из последовательности 39 нуклеотидов филлер-ДНК (от положения 359 до положения 397 в SEQ ID № 6) с последующими геномными последовательностями сои, соответствующими последовательности прединсерционного локуса (от положения 398 до положения 691 в SEQ ID № 6). 3'-пограничный участок, содержащий часть последовательности вставленной Т-ДНК и часть 3'-последовательности, фланкирующей 15 Т-ДНК, смежную с ней, представлена под SEQ ID № 2 и 4.

1.2.2.3 Вставленная Т-ДНК из EE-GM5

Вставленную Т-ДНК, смежную с вышеупомянутой 5'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, секвенировали, и ее нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID № 5, нуклеотиды 167-353. Также вставленную Т-ДНК, смежную с вышеупомянутой 3'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, секвенировали, и ее нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID № 6, нуклеотиды 1-358. В ходе трансформации 63 п.о. геномной ДНК удаляли в последовательности прединсерционного локуса и заменяли ее вставленной ДНК (состоящей из Т-ДНК и небольшой части филлер-ДНК).

Секвенирование участка Т-ДНК в плазмиде для трансформации pSZ8832 (часть между границами Т-ДНК) давало последовательность, указанную под SEQ ID № 11. Последовательность химерного гена *cry1Ab-1.b* (содержащая промотор Ubi10 и 3'-нетранслируемый участок 35S) представлена в SEQ ID № 11, от нуклеотида 131 до 5276 (против часовой стрелки). Вставленная последовательность Т-ДНК во фланкирующем 5'-участке в SEQ ID № 5 (нуклеотиды 167-353) является идентичной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 187 в SEQ ID № 11, а вставленная последовательность Т-ДНК во фланкирующем 3'-участке в SEQ ID № 6 (нуклеотиды 1-

358) является идентичной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 7102 до нуклеотида 7459 в SEQ ID No. 11. Следовательно, 5'-конец Т-ДНК, вставленной в EE-GM5, соответствует нуклеотиду 1 в последовательности трансформационной плазмиды под SEQ ID No. 11, а 3'-конец Т-ДНК, вставленной в EE-GM5, соответствует нуклеотиду 5 7459 в последовательности трансформационной плазмиды под SEQ ID No. 11. Т-ДНК, вставленная в EE-GM5 между последовательностью под SEQ ID No. 5 и последовательностью под SEQ ID No. 6, содержится в семени, депонированном в ATCC под номером доступа PTA-123625, и имеет последовательность, которая по сути сходна или идентична последовательности от нуклеотида 188 до нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 10 11.

Локус вставки для трансгенного объекта EE-GM5 может быть определен по сорту сои Thorne дикого типа на основании 5'- и 3'-последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, представленных в настоящем документе (SEQ ID No. 5, от нуклеотида 1 до нуклеотида 166, и SEQ ID No. 6, от нуклеотида 359 до нуклеотида 691) известными из 15 уровня техники способами. Последовательность прединсерционного локуса в геноме сои соответствует следующим последовательностям по порядку: от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5, делеция 63 нуклеотидов, и от положения нуклеотида 398 до положения нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6. Полная последовательность прединсерционного локуса приведена в SEQ ID No. 33, где 20 нуклеотиды 1-1000 представляют собой фланкирующие 5'-геномные последовательности, нуклеотиды 1001-1063 представляют собой делецию целевого сайта, а 1064-2063 представляют собой фланкирующие 3'-геномные последовательности.

1.2.3 Подтверждение фланкирующих участков и вставленной Т-ДНК из элитного трансгенного объекта EE-GM5

25 ПЦР-амплификация с использованием праймеров, нацеленных на растительную ДНК в 5'-направлении и в 3'-направлении от вставленной Т-ДНК и на вставленную Т-ДНК в EE-GM5 подтвердила и удлинила фланкирующие 5'- и 3'-последовательности из EE-GM5.

1.2.3.1. Реакция, специфическая для 5'-пограничной последовательности EE-GM5

30 Конструировали два праймера, GLPA210 и GLPB167, для амплификации ампликона размером примерно 5118 п.о., охватывающего пограничный участок между 5'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, и фрагментом вставленной Т-ДНК для

трансгенного объекта EE-GM5. Последовательность праймера GLPA210 происходит из эталонной последовательности сои *Glycine max Williams 82.a2.v1*.

Прямой праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM5:

5 **GLPA210** 5'-CTCTCACCCAgATTCAC-3' (SEQ ID No. 26)

Обратный праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК EE-GM5:

GLPB167 5'-TACAACgTgCTCgCTATTCC-3' (SEQ ID No. 28)

Состав реакционной смеси для реакции с 5'-пограничной последовательностью:

10 5 мкл буфер *Expand*TM (Roche)

1 мкл dNTP (10 мМ)

2 мкл прямой праймер (10 пмоль/мкл)

2 мкл обратный праймер (10 пмоль/мкл)

0,75 мкл ферментная смесь *Expand*TM High Fidelity (3,5 ед. мкл;

15 Roche)

50 нг матричная ДНК

Вода до 50 мкл

Условия амплификации для реакции с 5'-пограничной последовательностью:

	Время	Температура
--	--------------	--------------------

20 4 мин. 94°C

Затем: 1 мин. 94°C

 1 мин. 55°C

 4 мин. 68°C

 5 циклов

25 Затем: 15 сек. 94°C

 45 сек. 60°C

 4 мин. + 5 сек./цикл 68°C

 25 циклов

Затем: 10 мин. 68°C

30 Затем: 10 мин. 4°C

 Длительно 10°C

Последовательность удлиненной 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, которую получали, и которая является смежной с частью вставленной Т-ДНК и расположена в 5'-направлении от нее, показана под SEQ ID No. 5 и показана под SEQ ID No. 24.

5 1.2.3.2. Реакция, специфическая для 3'-пограничной последовательности ЕЕ-GM5

Конструировали два праймера, GLPB170 и GLPA212, для амплификации ампликона размером примерно 4982 п.о., охватывающего пограничный участок между фрагментом вставленной Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM5 и 3'-последовательностью, flankирующей Т-ДНК. Последовательность праймера GLPA212 происходит из эталонной последовательности *Glycine max* Williams 82.a2.v1.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК ЕЕ-GM5:

GLPB170 5'-TCTCggTATCAgCgTTCTTg-3' (SEQ ID No. 29)

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-

ДНК, ЕЕ-GM5:

GLPA212 5'-CCCATgCggTATTATgTg-3' (SEQ ID No. 27)

Состав реакционной смеси для реакции с 3'-пограничной последовательностью:

5 МКЛ буфер *Expand*TM (Roche)

1 мкл dNTP (10 мМ)

2 мкл прямой праймер (10 пмоль/мкл)

2 мкл обратный праймер (10 пмоль/мкл)

0,75 мкл ферментная смесь *Expand™* High Fidelity (3,5 ед. мкл;

Roche)

50 нг матричная ДНК

Вода до 50 мкл

Условия амплификации для реакции с 3'-пограничной последовательностью:

Время	Температура
4 мин.	94°C
1 мин.	94°C
1 мин.	54,3°C
4 мин.	68°C
5 циклов	

	Затем:	15	сек.	94°C
		45	сек.	60°C
		4	мин. + 5 сек./цикл	68°C
		25	циклов	
5	Затем:	10	мин.	68°C
	Затем:	10	мин.	4°C
		Длительно		10°C

Последовательность удлиненной 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, которую получали, и которая является смежной с частью вставленной Т-ДНК и расположена в 3'-направлении от нее, показана под SEQ ID No. 6 и показана под SEQ ID No. 25.

Поскольку полученные ампликоны в вышеупомянутых 2 реакциях перекрываются, это позволяло реконструировать последовательность вставленной Т-ДНК EE-GM5 и удлиненные 5'- и фланкирующие 3'-последовательности, которые показаны в SEQ ID No. 23. 5'-последовательность, фланкирующая Т-ДНК, в SEQ ID No. 23 располагается от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 1113 (что соответствует геномным последовательностям прединсерционного локуса), вставленная последовательность Т-ДНК располагается от положения нуклеотида 1114 до положения нуклеотида 8572, а 3'-последовательность, фланкирующая Т-ДНК, в SEQ ID No. 23 располагается от положения нуклеотида 8573 до положения нуклеотида 9663 (что соответствует филлер-ДНК из 39 нуклеотидов (нуклеотиды 8573-8611 в SEQ ID No. 23), а также геномным последовательностям прединсерционного локуса (нуклеотиды 8612-9663 в SEQ ID No. 23)).

2. Разработка протоколов идентификации EE-GM5

2.1. Способ граничных точек для анализа идентификации EE-GM5

В этом способе описана методика выявления с помощью полимеразной цепной реакции для анализа присутствия специфических для трансгенного объекта EE-GM5 последовательностей ДНК в образцах ДНК, полученных из биологических образцов, таких как растительные материалы (например, лист или семя), с использованием стандартных процедур экстрагирования ДНК.

В описании способа представлена схема способа, включающая последовательности олигонуклеотидных праймеров и зонда, состав реакционной смеси,

условия термостатирования, необходимые для проведения реакции, и настройки устройства для считывания флуоресценции, найденные подходящими для выявления ампликона. В нем также представлены общие рекомендации относительно характера и использования контрольных образцов. Кроме того, предоставлены инструкции по анализу и интерпретации данных, в том числе пример результата способа с учетом рекомендаций по использованию контрольных материалов и руководства по анализу данных.

2.1.1. Схема способа

В способе используют химию Тацман для амплификации и выявления двух последовательностей-мишеней: специфическая для EE-GM5 реакция определяет присутствие трансгенного объекта, специфическая для таксона реакция подтверждает отрицательные результаты для специфической для трансгенного объекта реакции.

2.1.1.1. Специфическая для EE-GM5 реакция

Конструировали два праймера, PRIM1038 и PRIM1039, для амплификации ампликона размером 85 п.о., охватывающего пограничный участок между фланкирующей 3'-последовательностью и фрагментом вставленной Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM5.

Конструировали зонд TM1788 с использованием FAM в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК EE-GM5:

PRIM1038 5'-gAgCCACCTCCTTTCCACTA-3' (SEQ ID No. 12)

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM5:

PRIM1039 5'-ATAgggTTACTgCTTCgTAAAATAAgCA-3' (SEQ ID No. 13)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК EE-GM5 и ее фланкирующей 3'-последовательностью:

TM1788 FAM 5'-CgCgTCCATgATgCTgCgACTATg-3' BHQ1 (SEQ ID No. 14)

2.1.1.2. Специфическая для таксона реакция

Конструировали два праймера, KVM164 и KVM165, для амплификации ампликона размером 102 п.о. последовательности эндогенного гена lectin1 сои.

Конструировали зонд TM1242 с использованием JOE в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

KVM164 5'-CTTTCTCgCACCAATTgACA-3' (SEQ ID No. 15)

Обратный праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

KVM165 5'-TCAAACCTCAACACAgCgACgAC-3' (SEQ ID No. 16)

Зонд, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

TM1242 JOE 5'-CCACAAACACATgCAggTTATCTTgg-3' BHQ1 (SEQ ID No. 17)

2.1.2. Состав реакционной смеси

5,0 мкл 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX

0,2 мкл PRIM1038 [10 пмоль/мкл]

0,2 мкл PRIM1039 [10 пмоль/мкл]

20 0,05 мкл KVM164 [10 пмоль/мкл]

0,05 мкл KVM165 [10 пмоль/мкл]

0,1 мкл TM1788 [10 пмоль/мкл]

0,1 мкл TM1242 [10 пмоль/мкл]

x мкл матричная ДНК (20 нг*)

25 Вода до 10 мкл

Примечания:

- Поставщиком 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX была компания Quanta Bioscience. Могут быть использованы другие ферментные буферы, но их эффективность должна быть подтверждена.

- Праймеры и меченные зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies.

- * Количество матричной ДНК на реакцию может варьировать, но оно должно быть подтверждено.

2.1.3. Условия амплификации

	Время	Температура
5	5 мин.	95°C
Затем:	3 сек.	95°C
	30 сек.	60°C
	35 циклов	
Затем:	Длительно	10°C
10	<i>Примечания:</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> Условия амплификации валидированы для применения на амплификаторе BIORAD C1000. Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена. 	

2.1.4. Настройки длины волны и ширины спектрального интервала

	Возбуждение	Испускание
	FAM	495 нм ± 5 нм
	JOE	530 нм ± 5 нм
	ROX	581 нм ± 5 нм
20	<i>Примечания:</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> настройки длины волны и ширины спектрального интервала были валидированы для применения на устройстве для считывания пластиночек Тесан M1000. Могут быть использованы другое оборудование и настройки, но их эффективность должна быть подтверждена. 	

2.1.5. Контрольные образцы

25	Следующие контрольные образцы должны быть включены в эксперимент для валидации результатов тестируемых образцов:	
	<ul style="list-style-type: none"> положительный контроль: образец ДНК, содержащий целевые и эндогенные последовательности; 	
30	<ul style="list-style-type: none"> отрицательный контроль: образец ДНК, содержащий только эндогенные последовательности; 	
	<ul style="list-style-type: none"> контроль без матрицы: образец с водой (без ДНК). 	

2.1.6. Анализ данных

• Для всех образцов рассчитывали соотношение сигнала флуоресцентной метки и фона (S/B) для реакции как с целевой, так и эндогенной последовательностью.

• Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.

о положительный контроль следует оценивать как «выявленный»,

5 о отрицательный контроль следует оценивать как «не выявленный»,

о контроль без матрицы должен отображать только уровни фоновой флуоресценции.

• Образец оценивается следующим образом:

о выявленный: S/B целевой последовательности и S/B эндогенной последовательности превышают приемлемое пороговое соотношение, например 2,

10 о не выявленный: S/B целевой последовательности ниже приемлемого порогового соотношения, например 1, и кроме того, S/B эндогенной последовательности превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2,

о неинформативный: S/B целевой и эндогенной последовательностей ниже приемлемого порогового значения, например 1.

На фигуре 2 показан пример результата способа для ряда образцов сои, содержащих EE-GM5, и обычных образцов сои. Для каждого образца показаны соотношения S/B как для специфической для EE-GM5 реакции, так и для эндогенной реакции.

20 2.2. Способ граничных точек для анализа идентичности и зиготности EE-GM5.

В этом способе описана методика выявления с помощью полимеразной цепной реакции с целью анализа присутствия и статуса зиготности специфических для трансгенного объекта EE-GM5 последовательностей ДНК в образцах ДНК, полученным из биологических образцов, таких как растительные материалы (например, лист или семя), с использованием стандартных процедур экстрагирования ДНК.

30 В описании способа представлены реакционные реагенты, последовательности олигонуклеотидных праймеров и зонда, состав реакционной смеси, условия амплификации, необходимые для проведения реакции, и настройки устройства для считывания флуоресценции, найденные подходящими для выявления ампликона. В нем также представлены общие рекомендации относительно характера и использования контрольных образцов. Кроме того, предоставлены инструкции по анализу и

интерпретации данных, в том числе пример результата способа с учетом рекомендаций по использованию контрольных материалов и руководства по анализу данных.

Следует отметить, что эффективность способа для анализа зиготности (варианта 1 ниже) может варьировать в зависимости от природы последовательности прединсерционного локуса. Следовательно, проверка продуктивности требуется для каждого сорта, в который интровергессируют трансгенный объект. В случаях неэффективной работы (как в варианте 2 ниже) или альтернативного способа граничных точек можно использовать ПЦР в режиме реального времени, основанную на анализе количества копий, для определения зиготности, например, как описано ниже в разделе 10 2.3.

2.1.1. Схема способа

В способе используют химию Taqman для амплификации и выявления двух последовательностей-мишеней: специфическая для EE-GM5 реакция определяет присутствие трансгенного объекта, специфическая для прединсерционного локуса реакция определяет присутствие прединсерционного локуса трансгенного объекта.

Выявление только специфической для EE-GM5 последовательности указывает на присутствие трансгенного объекта EE-GM5 в гомозиготном статусе зиготности.

Выявление специфической для EE-GM5 и специфической для прединсерционного локуса последовательности указывает на присутствие трансгенного объекта EE-GM5 в гемизиготном статусе зиготности.

Выявление только специфической для прединсерционного локуса последовательности указывает на отсутствие трансгенного объекта EE-GM5.

2.2.1.1. Специфическая для EE-GM5 реакция

A. Вариант 1

Конструировали два праймера, PRIM1040 и PRIM1041, для амплификации ампликона размером 84 п.о., охватывающего пограничный участок между 5'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, и фрагментом вставленной Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM5.

Конструировали зонд TM1789 с использованием FAM в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК ЕЕ-GM5:

PRIM1041 5'-CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT-3' (SEQ ID No. 18)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-
5 ДНК, ЕЕ-GM5:

PRIM1040 5'-TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA-3' (SEQ ID No. 19)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК ЕЕ-GM5 и ее фланкирующей 5'-
последовательностью:

TM1789 FAM 5'-CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT-3' BHQ-1 (SEQ ID No. 20)

10 В. Вариант 2

Конструировали два праймера, PRIM2123 и PRIM1041, для амплификации
ампликона размером 134 п.о., охватывающего пограничный участок между 5'-
последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, и фрагментом вставленной Т-ДНК для
трансгенного объекта ЕЕ-GM5.

15 Конструировали зонд TM1789 с использованием FAM в качестве флуоресцентной
метки и BHQ1 в качестве гасителя для выявления амплифицированной
последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК ЕЕ-
GM5:

20 PRIM1041 5'-CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT-3' (SEQ ID No. 18)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-
ДНК, ЕЕ-GM5:

PRIM2123 5'-gCACTgTTAACCTTAAATAACTCATTgAg-3'(SEQ ID No.30)

25 Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК ЕЕ-GM5 и ее фланкирующей 5'-
последовательностью:

TM1789 FAM 5'-CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT-3' BHQ-1 (SEQ ID No. 20)

2.2.1.1. Специфическая для прединсерционного локуса реакция

A. Вариант 1

Конструировали два праймера, PRIM1629 и PRIM1040, для амплификации
30 ампликона размером 72 п.о., охватывающего границу прединсерционного локуса и
фланкирующей 5'-последовательности прединсерционного локуса ЕЕ-GM5.

Конструировали зонд MGB, TM2083, с использованием VIC в качестве флуоресцентной метки и MGB-NFQ в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность прединсерционного локуса
5 EE-GM5:

PRIM1629 5'-TTggTgAAAAACAATTggTgTACA-3' (SEQ ID No. 21)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, из EE-GM5:

PRIM1040 5'-TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA-3' (SEQ ID No. 19)

Зонд дикого типа, нацеливающийся на границу прединсерционного локуса и фланкирующую 5'-последовательность:

TM2083 VIC 5'-AATCAAATCgACATCAATgT-3' MGB-NFQ (SEQ ID No. 22)

B. Вариант 2

Конструировали два праймера, PRIM2122 и PRIM2123, для амплификации ампликона размером 193 п.о., охватывающего границу прединсерционного локуса и фланкирующей 5'-последовательности прединсерционного локуса EE-GM5.

Конструировали зонд MGB, TM2327, с использованием VIC в качестве флуоресцентной метки и MGB-NFQ в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность прединсерционного локуса
20 EE-GM5:

PRIM2122 5'-CAgCAAAATAAgCAACTAgATCTATTgg-3' (SEQ ID No. 31)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, из EE-GM5:

PRIM2123 5'-gCACTgTTAACCTTAAATAACTCATTggAg-3' (SEQ ID No. 30)

Зонд дикого типа, нацеливающийся на границу прединсерционного локуса и фланкирующую 5'-последовательность:

TM2327 VIC 5'-TTTggTgAAAAACAATTggTgT -3' MGB-NFQ (SEQ ID No. 32)

30 2.2.2. Состав реакционной смеси

A. Вариант 1

5,0 мкл 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX

	0,4	мкл	PRIM1040 [10 пмоль/мкл]
	0,2	мкл	PRIM1041 [10 пмоль/мкл]
	0,2	мкл	PRIM1629 [10 пмоль/мкл]
	0,1	мкл	TM1789 [10 пмоль/мкл]
5	0,1	мкл	TM2083 [10 пмоль/мкл]
	x	мкл	матричная ДНК (20 нг*)

Вода до 10 мкл

B. Вариант 2

	5,0	мкл	2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
10	0,2	мкл	PRIM1041 [10 пмоль/мкл]
	0,2	мкл	PRIM2122 [10 пмоль/мкл]
	0,2	мкл	PRIM2123 [10 пмоль/мкл]
	0,1	мкл	TM1789 [10 пмоль/мкл]
	0,1	мкл	TM2327 [10 пмоль/мкл]
15	x	мкл	матричная ДНК (20 нг*)

Вода до 10 мкл

Примечания:

- Поставщиком 2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX была компания Quanta Bioscience. Могут быть использованы другие ферментные буферы, но их эффективность должна быть подтверждена.
- Праймеры и меченные зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies.
- * Количество матричной ДНК на реакцию может варьировать, но оно должно быть подтверждено.

25 2.2.3. Условия амплификации (такие же, как и для вариантов 1 и 2)

		Время	Температура
		5 мин.	95°C
	Затем:	3 сек.	95°C
		30 сек.	60°C
30		35 циклов	
	Затем:	Длительно	10°C

Примечания:

- Условия амплификации валидированы для применения на амплификаторе BIORAD C1000. Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена.

2.2.4. Настройки длины волны и ширины спектрального интервала (такие же, как для вариантов 1 и 2)

	Возбуждение	Испускание
FAM	495 нм ± 5 нм	517 нм ± 5 нм
JOE	530 нм ± 5 нм	555 нм ± 5 нм
ROX	581 нм ± 5 нм	607 нм ± 5 нм

10 **Примечания:**

- Настройки длины волны и ширины спектрального интервала были валидированы для применения на устройстве для считывания планшетов Tecan M1000. Могут быть использованы другое оборудование и настройки, но их эффективность должна быть подтверждена.

15 2.2.5. Контрольные образцы (такие же, как для вариантов 1 и 2)

Следующие контрольные образцы должны быть включены в эксперимент для валидации результатов тестируемых образцов:

- гомозиготный контроль: образец ДНК, содержащий целевую последовательность в гомозиготном состоянии,
- гемизиготный контроль: образец ДНК, содержащий целевую последовательность в гемизиготном состоянии,
- контроль дикого типа: образец ДНК, не содержащий целевую последовательность,
- контроль без матрицы: образец с водой.

25 2.2.6. Анализ данных (такой же, как и для вариантов 1 и 2)

- Для всех образцов рассчитывали соотношение сигнала флуоресцентной метки и фона (S/B) для реакции как с целевой последовательностью, так и последовательностью прединсерционного локуса.
- Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.
 - о гомозиготный контроль следует оценивать как "гомозиготный",
 - о гемизиготный контроль следует оценивать как "гемизиготный",
 - о контроль дикого типа следует оценивать как «дикий тип»,

о контроль без матрицы должен отображать только уровни фоновой флуоресценции.

- Образец оценивается следующим образом:

о гомозиготный: S/B целевой последовательности превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2, а S/B прединсерционного локуса ниже приемлемого порогового соотношения, например 1

о гемизиготный: S/B и целевой последовательности, и последовательности прединсерционного локуса превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2,

о дикий тип: S/B целевой последовательности ниже приемлемого порогового соотношения, например 1, и S/B последовательности прединсерционного локуса ниже приемлемого порогового отношения, например 2,

о неинформативный: S/B целевой последовательности и последовательности прединсерционного локуса ниже приемлемого порогового значения, например 1.

На фигуре 3 показан пример результата способа (вышеупомянутого варианта 1) для ряда образцов сои, содержащих EE-GM5 в гомозиготном состоянии, образцов сои, содержащих EE-GM5 в гемизиготном состоянии, и обычных образцов сои.

2.3. Способ ПЦР в режиме реального времени для анализа идентификации EE-GM5 и зиготности

В этом способе описана методика количественного выявления с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с целью анализа статуса зиготности последовательностей ДНК EE-GM5 в образцах ДНК, полученным из биологических образцов, таких как растительные материалы (например, лист или семя), с использованием стандартных процедур экстрагирования ДНК.

В описании способа представлены реакционные реагенты, последовательности олигонуклеотидных праймеров и зонда, состав реакционной смеси, условия амплификации, необходимые для проведения реакции, и настройки устройства для считывания флуоресценции, найденные подходящими для выявления ампликона. В нем также представлены общие рекомендации относительно характера и использования контрольных образцов. Кроме того, представлено руководство для анализа и интерпретации данных.

Этот способ не зависит от сорта и может использоваться в качестве альтернативного способа для анализа зиготности в отличие от способа, описанного в разделе 2.2 выше.

2.3.1. Схема способа

В способе используют химию Taqman и принципы ПЦР в режиме реального времени для количественного определения относительного количества копий специфической для EE-GM5 последовательности.

Способ предусматривает специфическую для EE-GM5 реакцию для количественного определения количества копий EE-GM5 и специфическую для таксона реакцию для нормализации количества копий EE-GM5.

Образцы, содержащие вставку последовательности EE-GM5 в гомозиготном состоянии, имеют относительное количество копий, которое в два раза выше, чем у гемизиготных образцов. В азиготных образцах не амплифицировалась последовательность EE-GM5.

2.3.2. Специфическая для EE-GM5 реакция

Конструировали два праймера, PRIM1038 и PRIM1039, для амплификации ампликона размером 85 п.о., охватывающего пограничный участок между фланкирующей 3'-последовательностью и фрагментом вставленной Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM5.

Конструировали зонд TM1788 с использованием FAM в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для количественного определения амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК EE-GM5:

PRIM1038 5'-gAgCCACCTTCCTTTCCACTA-3' (SEQ ID No. 12)

Обратный праймер, нацеленный на фланкирующую 3'-последовательность EE-GM5:

PRIM1039 5'-ATAGggTTACTgCTTCgTAAAATAAgCA-3' (SEQ ID No. 12)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК EE-GM5 и ее фланкирующей 3'-последовательностью:

TM1788 FAM 5'-CgCgTCCATgATgCTgCgACTATg-3' BHQ-1 (SEQ ID

No. 14)

2.3.3. Специфическая для таксона реакция

Конструировали два праймера, KVM164 и KVM165, для амплификации ампликона размером 102 п.о. последовательности эндогенного гена lectin1 сои.

Конструировали зонд TM1242 с использованием JOE в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для количественного определения амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

KVM164 5'-CTTCCTCgCACCAATTgACA-3' (SEQ ID No. 15)

Обратный праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

KVM165 5'-TCAAACCTAACACAgCgACgAC-3' (SEQ ID No. 16)

Зонд, нацеленный на последовательность эндогенного гена Lectin 1 сои:

TM1242 JOE 5'-CCACAAACACATgCAggTTATCTTgg-3' BHQ1 (SEQ

15 ID No. 17)

2.3.4. Состав реакционной смеси

5,0 мкл 2x PerfeCta qPCR FastMix II, Low ROX

0,2 мкл PRIM1038 [10 пмоль/мкл]

0,2 мкл PRIM1039 [10 пмоль/мкл]

20 0,2 мкл KVM164 [10 пмоль/мкл]

0,2 мкл KVM165 [10 пмоль/мкл]

0,05 мкл TM1788 [10 пмоль/мкл]

0,05 мкл TM1242 [10 пмоль/мкл]

x мкл матричная ДНК (20 нг*)

25 Вода до 10 мкл

Примечания:

- Поставщиком 2x PerfeCta qPCR FastMix II, LOW ROX была компания Quanta Bioscience. Могут быть использованы другие ферментные буферы, но их эффективность должна быть подтверждена.

30 • Праймер и меченные зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies.

- * Количество матричной ДНК на реакцию может варьировать, но оно должно быть подтверждено.

2.3.5. Условия амплификации

	Время	Температура
5	5 мин.	95°C
Затем:	3 сек.	95°C
	30 сек.	60°C **
	35 циклов	
Затем:	Длительно	10°C
10	<i>Примечания:</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> • ** считывание флуоресцентной метки выполняют на каждом цикле при завершении стадии удлинения праймера при 60°C, • валидировали условия амплификации для применения в аппарате ViiA7 и Quantstudio 7 Real-Time PCR. Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена. 	
15		

2.3.6. Контрольные образцы

Следующие контрольные образцы должны быть включены в эксперимент для валидации результатов тестируемых образцов:

- гомозиготный контроль: образец ДНК, содержащий целевую последовательность в гомозиготном состоянии,
- гемизиготный контроль: образец ДНК, содержащий целевую последовательность в гемизиготном состоянии,
- контроль дикого типа: образец ДНК, не содержащий целевую последовательность,
- контроль без матрицы: образец с водой.

2.3.7. Анализ данных

- Анализ данных выполняют с использованием способа ddCt. В этом способе вычисляют количество копий для всех образцов относительно выбранного эталонного образца. Рекомендуется использовать гемизиготный контроль в качестве эталонного образца.
- Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.

- о гомозиготный контроль следует оценивать как "гомозиготный",
- о гемизиготный контроль следует оценивать как "гемизиготный",
- о контроль дикого типа следует оценивать как «дикий тип»,
- о контроль без матрицы должен отображать только уровни фоновой

5 флуоресценции.

- Образец оценивается следующим образом:

о гомозиготным: относительное количество копий равняется 2 +/- приемлемое пороговое значение, например 0,5

о гемизиготным: относительное количество копий равняется 1 +/- приемлемое пороговое значение, например 0,25

о дикий тип: относительное количество копий равняется 0 + приемлемое пороговое значение, например 0,1

о неинформативный: относительное количество копий выходит за приемлемые пределы для гомозиготных, гемизиготных и образцов дикого типа.

15 **2.4. Способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия низких уровней ЕЕ-GM5**

В данном способе описывается способ выявления с целью анализа низкого уровня присутствия последовательностей ДНК трансгенного объекта ЕЕ-GM5, полученных из нефасованных растительных материалов (например, лист или семя) или переработанных материалов (например, пищевых продуктов или кормов, содержащих переработанное зерно сои), с использованием стандартных процедур экстрагирования ДНК

20 В описании способа представлены реакционные реагенты, последовательности олигонуклеотидного праймера и зонда, а также условия амплификации, необходимые для проведения реакции. В нем также содержатся общие рекомендации по одновременному использованию специфического для таксона способа поддержки анализа данных и интерпретации результатов. Кроме того, даются рекомендации 25 относительно характера и использования контрольных образцов.

Следует отметить, что альтернативные способы могут быть доступны для предполагаемой цели, включая без ограничения способы цифровой капельной ПЦР. В 30 способах цифровой капельной ПЦР используют способы граничных точек для анализа идентичности трансгенных объектов, как описано в разделе 1.1, в сочетании с принципами разделения на образцы образца экстрагированной ДНК. В этом способе

низкий уровень присутствия трансгенного объекта определяют на основании соотношения разделенных образцов ДНК, выявленных положительным и отрицательным для последовательности трансгенного объекта.

2.4.1 Схема способа

В способе используют химию Taqman и принципы ПЦР в режиме реального времени для выявления или количественного определения низких уровней EE-GM5 в образце ДНК.

Конструируют два праймера, PRIM1040 и PRIM1041, для амплификации ампликона размером 84 п.о., охватывающего пограничный участок между фланкирующей 5'-последовательностью и фрагментом вставленной Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM5.

Конструируют зонд TM1789 с использованием FAM в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для количественного определения амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК EE-GM5:

PRIM1041 5'-CATTgTgCTgAATAggTTTATAgCTATgAT-3' (SEQ ID No.

18)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM5:

PRIM1040 5'-TCAAATCAACATgggTgACTAgAAA-3' (SEQ ID No. 19)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК EE-GM5 и ее фланкирующей 5'-последовательностью:

TM1789 FAM 5'-CAgTACTgggCCCTTgTggCgCT-3' BHQ-1 (SEQ ID No. 20)

25

2.4.2 Состав реакционной смеси

10,0 мкл 2x PerfeCta qPCR Fastmix II, Low ROX

0,5 мкл PRIM1040 [10 пмоль/мкл]

0,5 мкл PRIM1041 [10 пмоль/мкл]

30 0,5 мкл TM1789 [10 пмоль/мкл]

x мкл матричная ДНК (200 нг*)

Вода до 20 мкл

Примечания:

- Поставщиком 2x *PerfeCta qPCR FastMix II, LOW ROX* была компания *Quanta Bioscience*. Могут быть использованы другие ферментные буферы, но их эффективность должна быть подтверждена.
- 5 • Пример и меченные зонды заказывали в компании *Integrated DNA Technologies*.
- * Количество матричной ДНК на реакцию может варьировать, но оно должно быть подтверждено.

2.4.3 Условия амплификации

	<u>Время</u>	<u>Температура</u>
10	5 мин.	95°C
	Затем:	3 сек.
		60°C **
		30 сек.
		40 циклов
15	Затем:	Длительно 10°C

Примечания:

- ** считывание флуоресцентной метки выполняют на каждом цикле при завершении стадии удлинения примера при 60°C,
- 20 валидировали условия амплификации для применения в аппарате *ViiA7* и *Quantstudio 7 Real-Time PCR*, Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена.

2.4.4 Специфический для таксона способ

Способ выявления с помощью ПЦР в режиме реального времени, нацеленный на эндогенную последовательность, должен проводиться одновременно с идентичным количеством матричной ДНК, которое используется в специфическом для мишени способе ПЦР в режиме реального времени. Результат специфического для таксона способа должен использоваться для поддержки анализа и интерпретации данных, т. е. для нормализации количества вводимой ДНК и для подтверждения любых отрицательных результатов для реакции, специфической для мишени.

30

2.4.5 Тестируемые образцы, калибровочные образцы и контрольные образцы

- Рекомендуется, чтобы все тестируемые образцы были проанализированы в двух повторностях.
 - Набор калибровочных образцов включен в эксперимент для создания стандартных кривых для способа, специфического и для мишени, и для таксона.
- 5 • Кроме того, включены следующие контрольные образцы:
- о положительный контроль: образец ДНК, содержащей целевую последовательность на уровне предела выявления,
 - о отрицательный контроль: образец ДНК, содержащий только эндогенные последовательности;
 - о контроль без матрицы: образец с водой.
- 10 2.4.6 Анализ данных
- Для всех образцов значения порогового цикла (т. е. Ct-значения) определяют для способа, специфического и для мишени, и для таксона. Пороговый цикл определяют как количество циклов, при котором график амплификации для данного образца достигает определенного порога сигнала (см. фигуру 4)
 - Формулы для стандартной кривой вычисляют для способа, специфического и для мишени, и для таксона, с использованием Ct-значений и количества копий генома калибровочных образцов.
 - Параметры стандартной кривой должны соответствовать критериям приемлемости для наклона и линейности (R^2), например,
- 20
 - о $-3,2 < \text{наклон} < -3,6$
 - о $R^2 > 0,98$
 - о Для всех образцов количество копий генома способа для целевой и эндогенной последовательностей вычисляют с использованием линейного регрессионного анализа.
- 25
 - о Количество присутствия низкого уровня по отношению к общему количеству специфической для таксона ДНК определяют путем расчета процентного соотношения количества копий генома для способа, специфического и для мишени, и для таксона.
- 30
 - Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.
 - о положительный контроль следует оценивать как «выявленный»,
 - о отрицательный контроль следует оценивать как «не выявленный»,

о контроль без матрицы должен отображать только уровни фоновой флуоресценции.

- Образец оценивается следующим образом:

о выявленный: присутствие низкого уровня выше предела выявления для 5 всех повторностей с учетом погрешности измерений способа,

о невыявленный: присутствие низкого уровня ниже предела выявления для 10 всех повторностей с учетом погрешности измерений способа,

- о неинформативный: образцы повторностей дают противоречивые оценки.

На фигуре 4 показан пример результата способа, выполненного с 10 калибровочными образцами.

3. Интродукция EE-GM5 в предпочтительные культивары

Элитный трансгенный объект EE-GM5 вводили путем повторного возвратного скрещивания в шесть разных элитных линий сои. Линии отбирали для представления диапазона групп созревания: две из MG I, одна линия из MG III, две линии из MG VI и 15 одна линия из MG IX. Одна из линий MG I и линия MG III содержали аллель нативной устойчивости *Rhg1* из PI88788, а одна из линий MG VI содержала аллели нативной устойчивости *Rhg1* и *Rhg4* из PI437654. Другие три линии были восприимчивы к SCN.

Кроме того, при первоначальном тестировании в нескольких экспериментах не 20 наблюдали биологически значимые различия для Ст14Ab-1 уровней экспрессии белка HPPD-4, измеренных в листьях выращиваемых в теплице растений (как измеряли с помощью ELISA или вестерн-блоттинга (наблюдали только нормальную вариацию анализа)), и никаких существенных различий не было обнаружено в результатах 25 стандартного анализа SCN в теплице (измерение % снижения количества цист SCN по сравнению с контрольным Thorne), когда трансгенный объект EE-GM5 интродуцировали из фона Thorne в другие фоны зародышевой плазмы сои (различного созревания, на разных стадиях интродукции), по сравнению с тем, которые находили для 30 EE-GM5 на фоне Thorne.

Интродукция элитного трансгенного объекта EE-GM5 в другие культивары сои не оказывает существенного влияния на какие-либо желательные фенотипические или 30 агрономические характеристики этих культиваров (отсутствие сцепленного перемещения), в то время как экспрессия трансгенов соответствует коммерчески

приемлемым уровням. Это подтверждает статус трансгенного объекта EE-GM5 как элитного трансгенного объекта.

Кроме того, элитный трансгенный объект EE-GM5 выгодно сочетается с другими элитными трансгенными объектами сои, полученными в результате трансформации.

- 5 Особенno применимыми растениями в соответствии с настоящим изобретением являются растения, содержащие EE-GM5, в комбинации с другим трансгенным объектом сои, полученным в результате трансформации, или комбинацию более чем одного другого трансгенного объекта сои, полученного в результате трансформации, например, приведенные в базах данных различных национальных или региональных
- 10 регламентирующих органов, в том числе без ограничения трансгенный объект MON87751 (описанный в WO2014201235 и USDA-APHIS Petition 13-337-01p), трансгенный объект pDAB8264.42.32.1 (описанный в WO2013010094), трансгенный объект DAS-81419-2 (известный как ConestaTM Soybean, описанный в WO2013016527 и USDA-APHIS Petition 12-272-01p), трансгенный объект EE-GM3 (известный как FG-072, MST-FG072-3, описанный в WO2011063411, USDA-APHIS Petition 09-328-01p), трансгенный объект SYHT0H2 (известный как OH2, SYN-000H2-5, описанный в WO2012/082548 и 12-215-01p), трансгенный объект DAS-68416-4 (известный как Enlist Soybean, описанный в WO2011/066384 и WO2011/066360, USDA-APHIS Petition 09-349-01p), трансгенный объект DAS-81615-9 (описанный в WO2014004458), трансгенный объект DAS-44406-6 (известный как Enlist E3, DAS-44406-6, описанный в WO2012/075426 и USDA-APHIS 11-234-01p), трансгенный объект MON87708 (Xtend Soybeans, описанный в WO2011/034704 и USDA-APHIS Petition 10-188-01p), трансгенный объект MON89788 (известный как Genuity Roundup Ready 2 Yield, описанный в WO2006/130436 и USDA-APHIS Petition 06-178-01p), трансгенный объект DAS-14536-7 (описанный в WO2012/075429), трансгенный объект 40-3-2 (известный как RoundUp Ready, MON-04032-6, описанный в USDA-APHIS Petition 93-258-01), трансгенный объект A2704-12 (известный как LL27, ACS-GM005-3, описанный в WO2006108674 и USDA-APHIS Petition 96-068-01p), трансгенный объект 127 (известный как BPS-CV127-9, описанный в WO2010/080829), трансгенный объект A5547-127 (известный как LL55, ACS-GM006-4, описанный в WO2006108675 и в USDA-APHIS Petition 96-068-01p), трансгенный объект MON87754 (известный как Vistive III, MON-87754-1, описанный в WO2010/024976), трансгенный объект HOS (известный как DP-

305423-1, Plenish High Oleic Soybean, описанный в WO2008054747), трансгенный объект MON87701 (известный как MON-87701-2, описанный в WO2009064652 и USDA-APHIS Petition 09-082-01p), трансгенный объект MON 87705 (известный как MON-87705-6, описанный в WO2010/037016 и USDA-APHIS Petition 09-201-01p), трансгенный объект 5 MON87712 (известный как MON-87712-4, описанный в WO2012/051199), трансгенный объект pDAB4472-1606 (известный как трансгенный объект 1606, описанный в WO2012/033794), трансгенный объект 3560.4.3.5 (известный как DP-356043-5, описанный в WO2008/002872), трансгенный объект MON87769 (известный как MON-87769-7, описанный в WO2009102873 и USDA-APHIS Petition 09-183-01p), или любая 10 комбинация EE-GM5 с несколькими из этих других трансгенных объектов сои, как например, комбинация EE-GM5 с любым из следующих: трансгенный объект MON98788 x MON87708 (известный как Roundup Ready 2 Xtend Soybeans, MON-87708-9 x MON-89788-1), трансгенный объект HOS x трансгенный объект 40-3-2 (известный как Plenish High Oleic Soybeans x Roundup Ready Soybeans), трансгенный объект EE-GM3 x EE-GM2 15 (известный как FG-072xLL55, описанный в WO2011063413), трансгенный объект MON 87701 x MON 89788 (известный как Intacta RR2 Pro Soybean, MON-87701-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (известный как Conkesta™ Enlist E3™ Soybean, DAS-81419-2 x DAS-44406-6), трансгенный объект DAS-81419-2 x трансгенный объект DAS-68416-4 (описанный в WO2013016516), трансгенный объект DAS-68416-4 x 20 трансгенный объект MON 89788 (известный как Enlist™ RoundUp Ready® 2 Soybean, DAS-68416-4 X MON-89788-1), трансгенный объект MON-87769-7 x трансгенный объект MON-89788-1 (известный как Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans), MON 87705 x MON 89788 (известный как Vistive Gold, MON-87705-6 x MON-89788-1), MON 87769 x MON 89788 (известный как Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans, 25 MON-87769-7 x MON-89788-1).

Используемый в нижеприведенной формуле изобретения, если не указано иное, термин "растение" охватывает ткани растения на любой стадии развития, а также любые клетки, ткани или органы, собранные или происходящие от такого растения, включая без ограничения любые семена, листья, стебли, цветки, корни, отдельные клетки, гаметы, 30 культуры клеток, культуры тканей или протопласты

Эталонное семя, содержащее элитный трансгенный объект EE-GM5, было депонировано в ATCC (10801 University Blvd., Манассас, Виргиния 20110-2209) 9 ноября

2016 года под номером доступа в АТСС РТА-123625, и его жизнеспособность была подтверждена. Альтернативными названиями для ЕЕ-GM5 являются трансгенный объект GMB151 или BCS-GM151-6.

Вышеприведенное описание настоящего изобретения должно рассматриваться в 5 качестве иллюстративного, а не ограничивающего.

Специалисты в данной области техники могут осуществить различные изменения или модификации описанных вариантов осуществления. Эти модификации можно осуществить без отклонения от основной идеи и объема настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по сути сходна с последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или с последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6 или с последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.
5
2. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 3, 4, 5, 6, 24 или 25 или с комплементарной ей последовательностью.
10
3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, содержащая нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1 или 3 или SEQ ID No. 2 или 4 или последовательность, комплементарную указанным последовательностям, или содержащая нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 и SEQ ID No. 2 или 4.
15
4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, которая дополнительно содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 или комплементарную ей последовательность.
5. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, которая содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7101 из SEQ ID No. 11 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 99,5%, или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней.
20
6. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 5, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 или 24 и SEQ ID No. 6 или 25 или комплементарную ей последовательность.
25
7. Молекула нуклеиновой кислоты, получаемая из семени, депонированного в ATCC под номером доступа РТА-123625, где указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 и нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6.
30
8. Геномная ДНК сои, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7.

9. Растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7.

10. Растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие в своем геноме нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 3 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 4.

11. Растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие в своем геноме нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 6 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 24 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 25.

10 12. Растение, клетка, часть растения, семя или потомок по п. 10 или п. 11, которые дополнительно содержат нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 или нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 1114 до положения нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23.

15 13. Растение сои, клетка, часть или семя, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM5, где указанный элитный трансгенный объект представляет собой генетический локус, содержащий вставленную Т-ДНК, содержащую химерный ген, кодирующий белок HPPD-4, и химерный ген, кодирующий белок Сту14Ab-1, и фланкирующие 5'- и 3'-последовательности, непосредственно окружающие указанную вставленную Т-ДНК, содержащуюся в эталонном семени, 20 депонированном в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

14. Растение-потомок, клетка, часть растения или семя от растения, клетки, части растения или семени по п. 13, где указанные растение-потомок, клетка, часть растения или семя содержат нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 3 и нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 4.

25 15. Растение сои, клетка, часть или семя по п. 13 или п. 14, геномная ДНК которых при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 84 п.о.

30 16. Растение по любому из пп. 9-15, которое является выносливым к изоксафлутолу, топрамезону или мезотриону.

17. Соевый продукт, полученный из растения сои, клетки, части или семени по любому из пп. 9-16.

18. Соевый продукт по п. 17, который представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, соевую муку или соевые хлопья.

19. Соевый продукт по п. 17 или п. 18, где указанный соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта ЕЕ-GM5.

5 20. Способ получения соевого продукта, предусматривающий получение растения сои или клетки, части, семени или потомка по любому из пп. 9-16 и получение из них такого соевого продукта.

10 21. Способ по п. 20, где указанный соевый продукт представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, соевую муку или соевые хлопья.

22. Способ по п. 20 или п. 21, где указанный соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта ЕЕ-GM5.

15 23. Способ контроля сорняков, предусматривающий обработку поля, на котором были посеяны семена сои по любому из пп. 9-16, гербицидом-ингибитором HPPD до всхода растений сои, но после посева семян.

24. Способ контроля сорняков, предусматривающий обработку растений сои по любому из пп. 9-16 гербицидом-ингибитором HPPD со стороны надземной части растений.

20 25. Способ защиты всходов растений сои по любому из пп. 9-16 от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, предназначенного для посадки указанных растений сои, гербицидом-ингибитором HPPD до посадки растений сои или посева семян с последующими посадкой или посевом указанных растений сои или семян на указанном предварительно обработанном поле.

25 26. Способ по любому из пп. 23-25, где указанный гербицид-ингибитор HPPD представляет собой изоксафлутол, топрамезон или мезотрион.

27. Способ получения растения сои, устойчивого к SCN и/или выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD, предусматривающий введение признака устойчивости к SCN и/или выносливости к гербицидам-ингибиторам HPPD в геном растения сои путем скрещивания первого растения сои, у которого отсутствует ген, кодирующий Cry14Ab-1, и у которого отсутствует ген, кодирующий HPPD-4, с растением сои по любому из

пп. 9-16 и отбор растения-потомка, устойчивого к SCN и/или выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD.

28. Применение растения, его семени, части, клетки или потомка по любому из пп. 9-16 для получения семени сои.

5 29. Применение растения или семени сои по любому из пп. 9-16 для выращивания растения, устойчивого к нематодам и/или выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD.

10 30. Применение семени сои по любому из пп. 9-16 для получения соевого продукта, где указанный соевый продукт представляет собой или содержит молотое соевое зерно, соевую муку, соевый шрот или соевые хлопья.

31. Способ получения растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, предусматривающий скрещивание растения по любому из пп. 9-16 с другим растением сои и осуществление посадки семени, содержащего EE-GM5, полученного в результате указанного скрещивания.

15 32. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 7941 из SEQ ID No. 11 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует нематоцидный белок Cry14Ab и белок HPPD, выносливый к ингибиторам HPPD.

33. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 32, которая кодирует белок под SEQ ID No. 8 или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему, и белок под SEQ ID No. 10 или белок, который на по меньшей мере 99% идентичен ему.

25 34. Способ идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM5 участка с помощью специфической пары праймеров или специфического зонда, которые специфически распознают в EE-GM5 участок, содержащий часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним.

30 35. Пара праймеров, подходящих для применения в специфическом выявлении EE-GM5, содержащая первый праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает

последовательность в пределах 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM5, и второй праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM5, смежной с указанным 5 фланкирующим 5'- или 3'-участком, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24, при этом 10 указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, которая 15 комплементарна последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от положения 20 нуклеотида 1 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.

36. Пара праймеров по п. 35, где указанный первый праймер содержит 25 нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24 или комплементарной им последовательности, или содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 358 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6 или из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25 или комплементарной им последовательности, и где указанный второй 30 праймер содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от

положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

5 37. Пара праймеров по п. 35, где указанный первый праймер содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1113 из SEQ ID No. 24 или комплементарной ей последовательности, или содержит на своем 10 дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 358 до нуклеотида 691 из SEQ ID No. 6 или из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 359 до нуклеотида 1449 из SEQ ID No. 25 или комплементарной им последовательности, и где указанный второй праймер содержит на 15 своем дальнем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 167 до нуклеотида 353 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от 20 положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 7459 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1114 до нуклеотида 8572 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

25 38. Пара праймеров по п. 35, где указанный первый праймер содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19 или SEQ ID No. 13, или где указанный второй праймер содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 или SEQ ID No. 12 соответственно.

30 39. Пара праймеров по п. 35, содержащая первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, или содержащая второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12.

40. Пара праймеров по п. 38 или п. 39, которая амплифицирует специфический для ЕЕ-GM5 фрагмент размером 85 или 84 п.о. с помощью ПЦР.

41. Пара праймеров, содержащая первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 13, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 12, или содержащая 5 праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 18, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 19.

42. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM5 в биологических образцах, где указанный зонд специфически распознает последовательность, содержащую часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из ЕЕ-GM5 и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, или комплементарную ей последовательность, или специфически распознает последовательность, содержащую часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из ЕЕ-GM5 и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, или 15 комплементарную ей последовательность.

43. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM5 в биологических образцах, который содержит нуклеотидную 20 последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью, содержащей часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, или комплементарную ей последовательность, или 25 часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, в ЕЕ-GM5, или комплементарной ей последовательностью.

44. Зонд по п. 43, который характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью под SEQ ID No. 1 или 3 или 30 последовательностью под SEQ ID No. 2 или 4 или с комплементарной им последовательностью.

45. Зонд по п. 44, содержащий последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6 или комплементарную им последовательность.

46. Зонд по любому из пп. 42-45, содержащий последовательность под SEQ ID No. 3 или последовательность под SEQ ID No. 4.

47. Способ по п. 34, при этом указанный способ предусматривает амплификацию фрагмента ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с применением полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров, где указанные по меньшей мере два праймера представляют собой праймеры по любому из пп. 35-41.

48. Способ по п. 47, дополнительно предусматривающий стадию гибридизации зонда, специфического в отношении фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью указанных по меньшей мере двух праймеров.

49. Способ по п. 48, где указанный зонд распознает часть 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, или где указанный зонд распознает часть 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним.

50. Способ по п. 47, где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

51. Набор, подходящий для применения в специфическом выявлении ЕЕ-GM5, содержащий пару праймеров по любому из пп. 35-41.

52. Набор по п. 51, дополнительно содержащий зонд, специфический в отношении фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью указанной пары праймеров.

53. Набор по п. 52, где указанный зонд распознает часть 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним, или где указанный зонд распознает часть 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним.

54. Набор по п. 52, где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

55. Набор, подходящий для применения в специфическом выявлении EE-GM5, содержащий зонд по любому из пп. 42-46.

10 56. Способ по п. 34, при этом способ предсматривает гибридизацию нуклеиновой кислоты из указанных биологических образцов с зондом по любому из пп. 42-46.

15 57. Способ подтверждения чистоты семени или скрининга семян в отношении присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5, при этом способ предсматривает выявление специфического для EE-GM5 участка с помощью пары праймеров по любому из пп. 35-41 или зонда по любому из пп. 42-46 в образцах указанного семени.

20 58. Способ по п. 57, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером 85 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 14, или амплификацию фрагмента ДНК размером 84 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 18 и SEQ ID No. 19 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 20.

25 59. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах путем гибридизации с по сути комплементарным меченым зондом на основе нуклеиновой кислоты, при котором соотношение зонд:целевая нуклеиновая кислота увеличивается за счет повторного использования последовательности целевой нуклеиновой кислоты, при этом указанный способ предусматривает:

30 а) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты с первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 167 до положения нуклеотида 184 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную

последовательность от положения нуклеотида 341 до положения нуклеотида 358 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;

5 б) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 149 до нуклеотида 166 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 359 до нуклеотида 376 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, где указанные первый и второй олигонуклеотиды перекрываются по меньшей мере по одному нуклеотиду, и где любой из указанного первого или указанного второго олигонуклеотида является меченый с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;

10 15 10 с) расщепление только меченого зонда в пределах дуплекса зонд:последовательность целевой нуклеиновой кислоты с помощью фермента, вызывающего селективное расщепление зонда, что приводит к диссоциации дуплекса и оставляет целевую последовательность интактной;

д) повторное использование последовательности целевой нуклеиновой кислоты путем повторения стадий (а) – (с); и

20 е) выявление расщепленного меченого зонда, за счет чего осуществляют определение присутствия указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты.

60. Способ определения статуса зиготности растения, растительного материала или семени, содержащих элитный трансгенный объект ЕЕ-GM5, при этом указанный способ предусматривает амплификацию фрагментов ДНК размером от 50 до 1000 п.о. из нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с применением полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере трех праймеров, при этом два из указанных праймеров специфически распознают прединсерционную растительную ДНК, а третий из указанных праймеров распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК.

61. Способ по п. 60, где указанные два праймера, специфически распознающие прединсерционную растительную ДНК, представляют собой праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 19, и праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 21, и где праймер, распознающий

последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, представляет собой праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18.

62. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM5 в биологических образцах или определения статуса зиготности растения, растительного материала или семени, содержащих EE-GM5, где указанный способ описан в любом из примеров 2.1, 2.2, 2.3 или 2.4.

63. Способ снижения потери урожая в поле, предназначенном для посадки растений сои, в частности, в поле, которое содержит, содержало или, как предполагается, содержит нематоды или яйца нематод, как например, SCN, RKN или Pratylenchus, или почковидные нематоды или их яйца, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, полученный в результате трансформации, и 2) посадки или посева растений сои или семян, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

64. Способ повышения урожая растений сои при посадке в поле, содержащем нематоды или яйца нематод, как например, SCN, RKN или Pratylenchus, или почковидные нематоды или их яйца, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, полученный в результате трансформации, и 2) посадки или посева растений сои или семян, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123625.

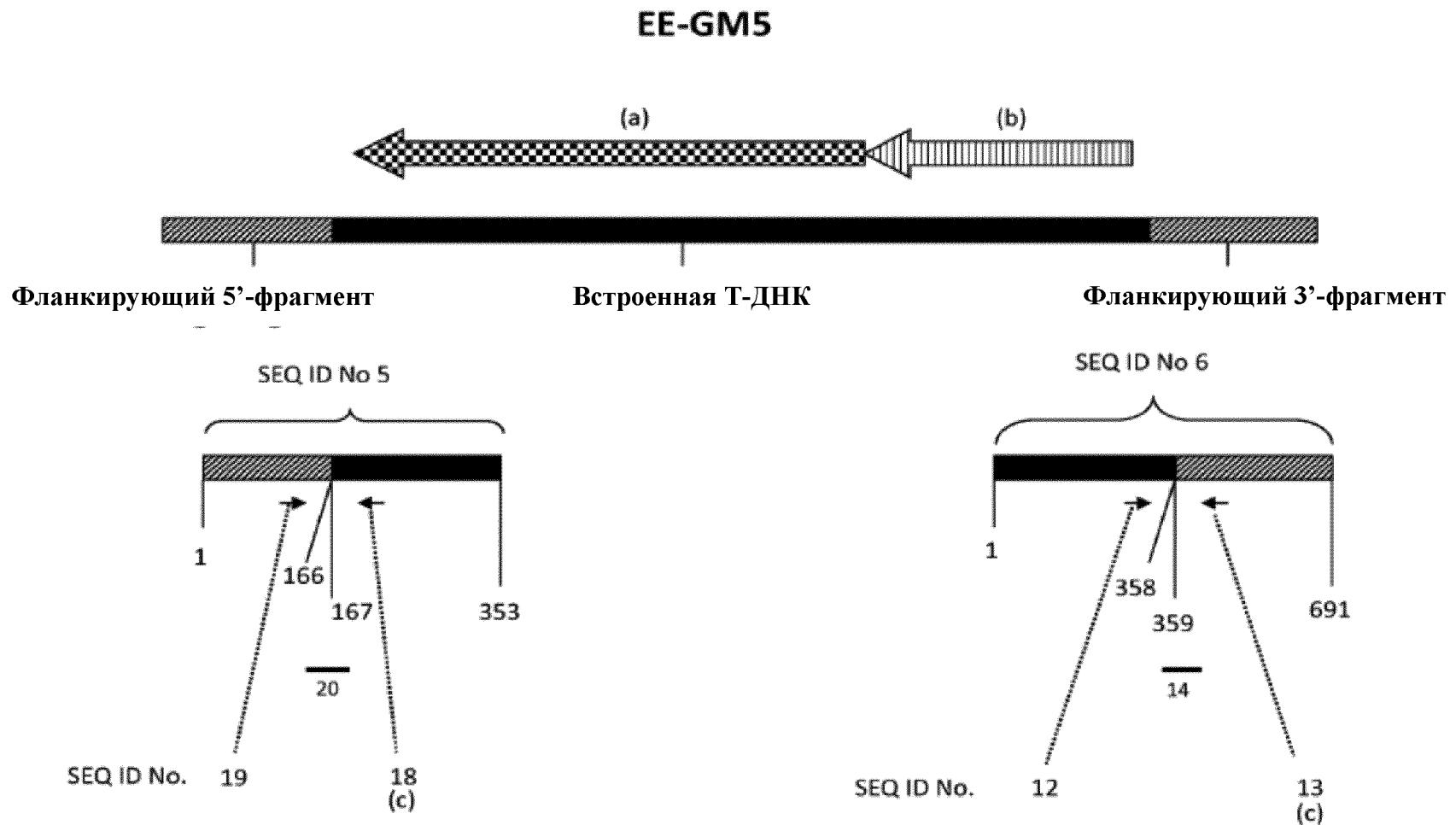
65. Способ получения растения или семени сои, выносливого к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, или получения растения или семени сои, выносливого к нематодам, таким как SCN, RKN или Pratylenchus, или к почковидным нематодам, или получения растения или семени сои, выносливого к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и выносливого к нематодам, таким как SCN, RKN или Pratylenchus, или к почковидным нематодам, характеризующийся стадией введения в геном растения или семени элитного трансгенного объекта EE-GM5 сои, полученного в результате трансформации, и необязательно обработки указанного растения или семени гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, или необязательно обработки поля, на котором будут осуществлять посадку указанного

растения или семени, гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, и посадки указанного растения или семени на указанном предварительно обработанном поле.

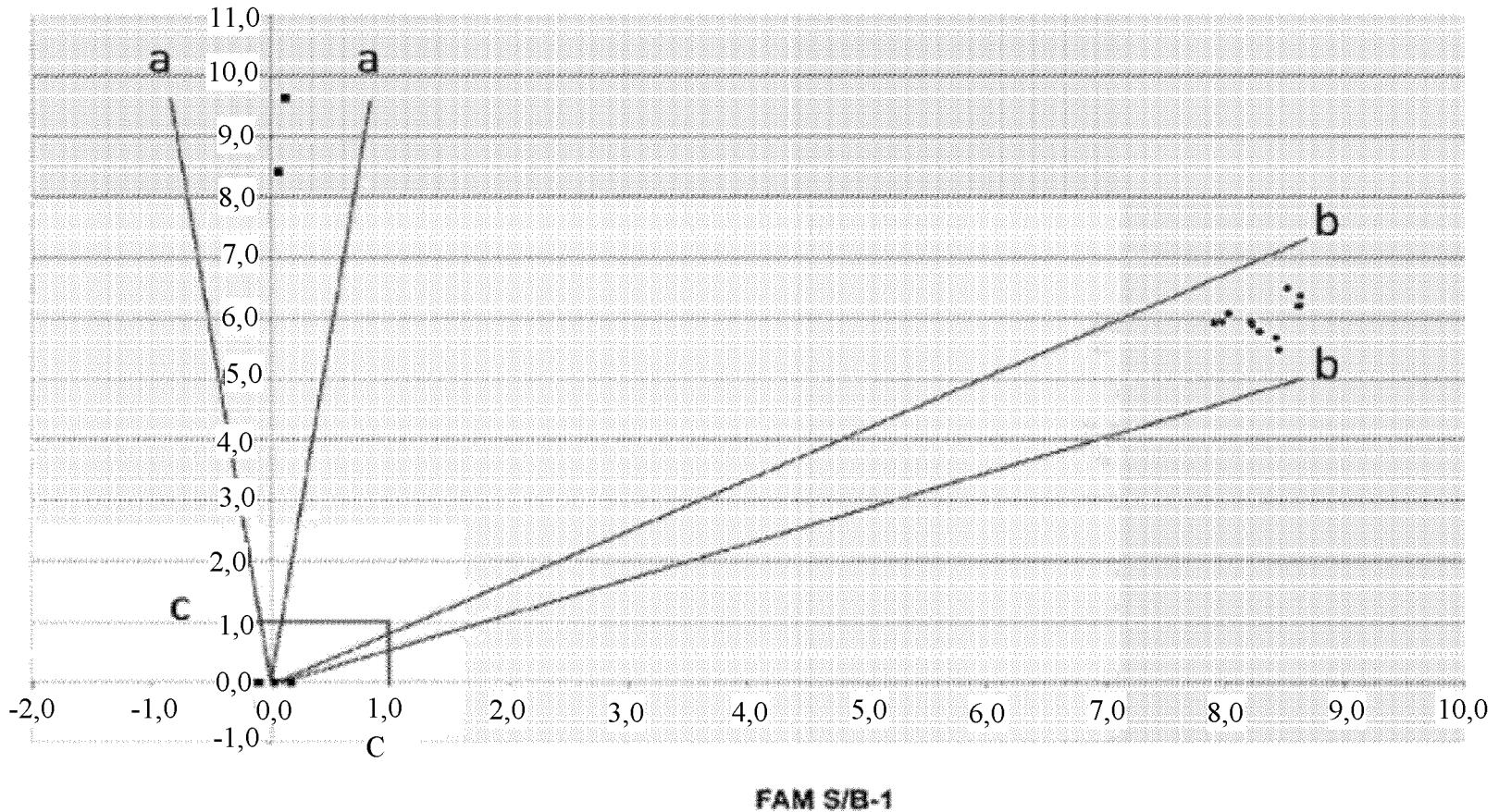
66. Молекула нуклеиновой кислоты, которая специфически характеризует 5 элитный трансгенный объект EE-GM5 сои, полученный в результате трансформации, характеризующаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5, которая содержит часть геномной ДНК растения сои и часть вставленной чужеродной ДНК из EE-GM5, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, и/или характеризующаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 2, 4 или 6, которая содержит часть 10 вставленной чужеродной ДНК EE-GM5 и часть геномной ДНК растения сои, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней.

67. Способ по п. 27 или п. 31, который предусматривает стадию применения 15 ингибитора HPPD, такого как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, по отношению к семени сои, из которого будут выращивать указанное растение, или по отношению к полу, предназначенного для посадки указанного семени, или по отношению к надземной части указанного растения.

68. Способ повышения урожая растений сои на полях, содержащих SCN, 20 пораженных синдромом внезапной смерти, или на полях, содержащих SCN, вызывающих железодефицитный хлороз у сои, при этом способ предусматривает посадку растений или посев семян, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM5, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.

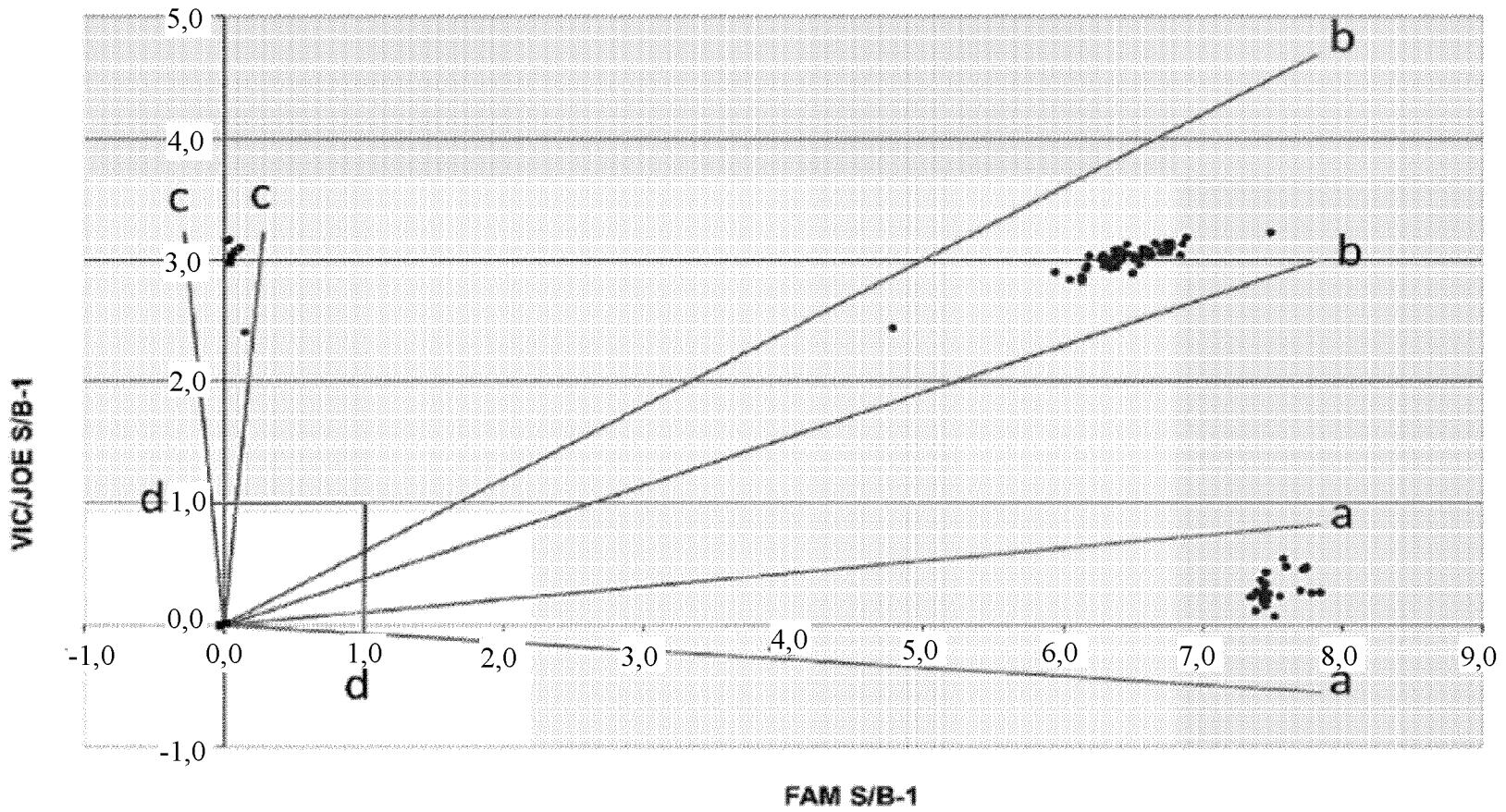
**Фигура 1**

заменивший лист (правило 25)



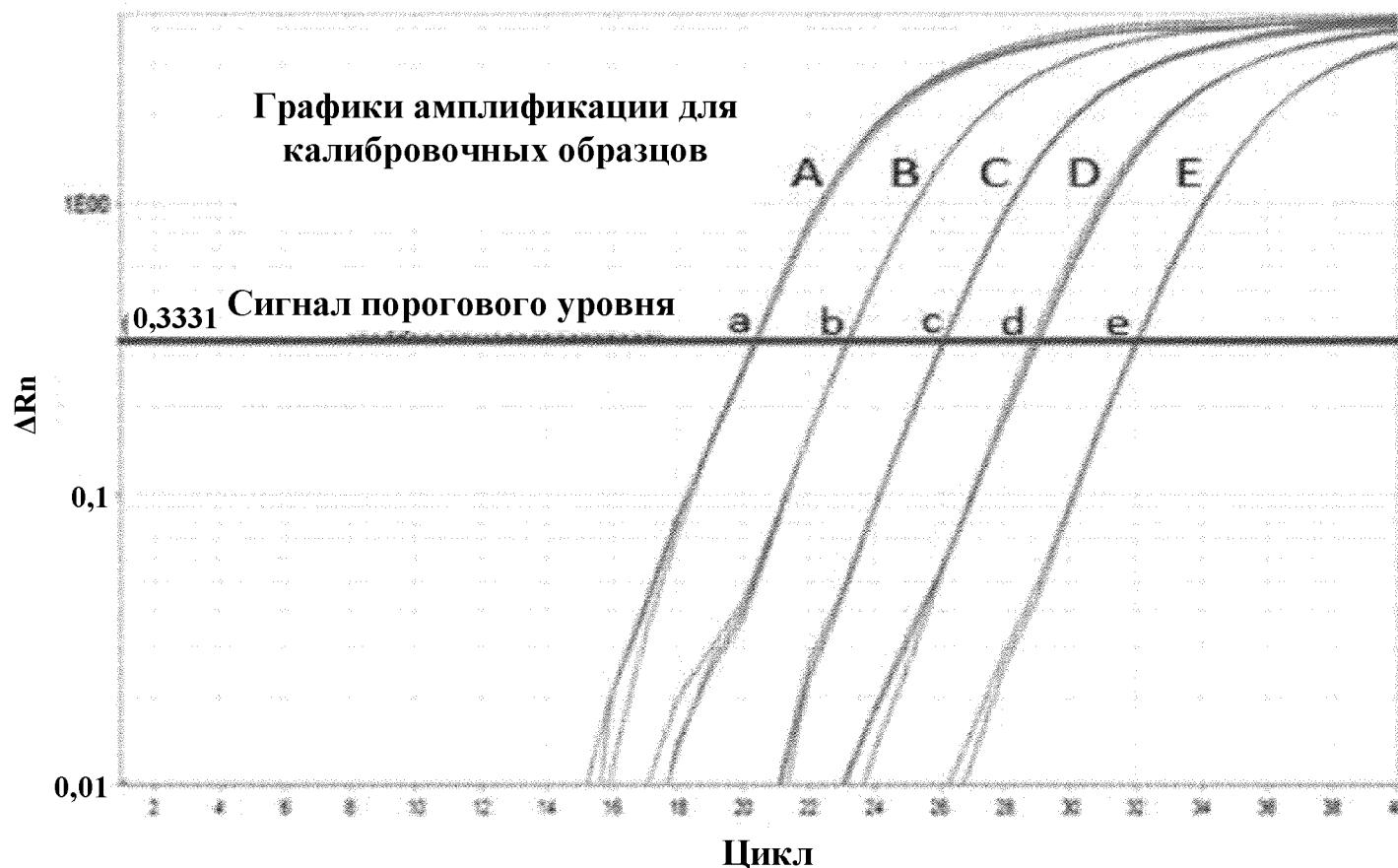
Фигура 2

заменивший лист (правило 25)

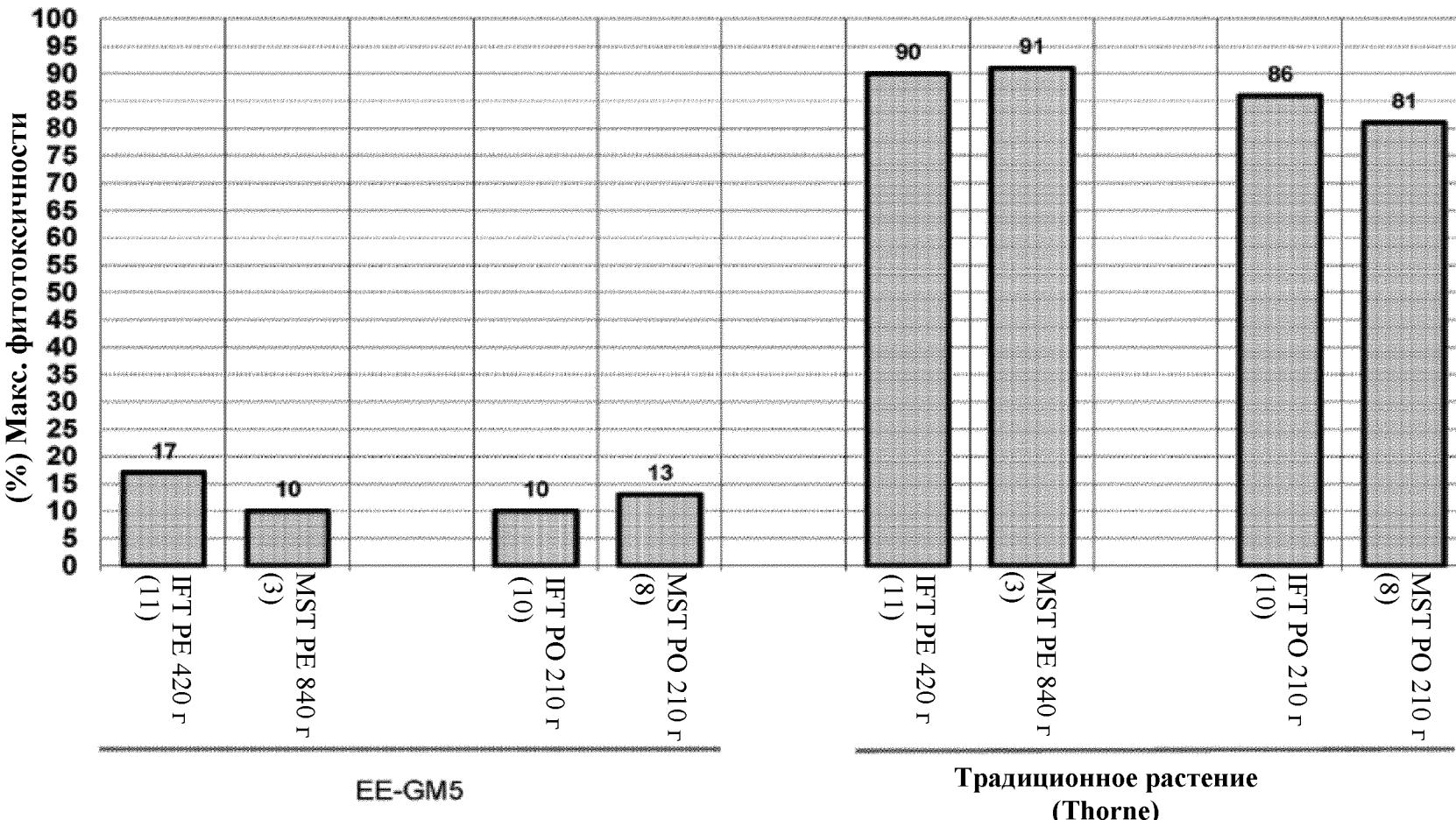


Фигура 3

График амплификации

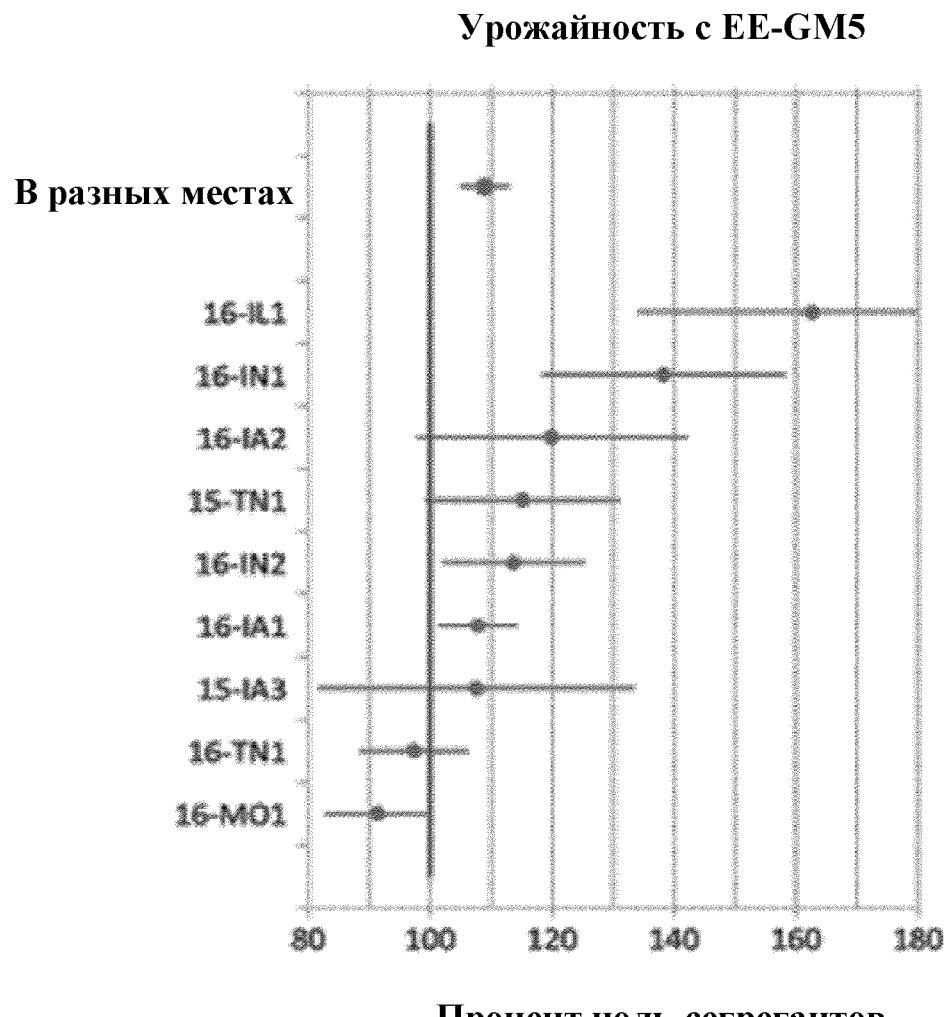


Фигура 4



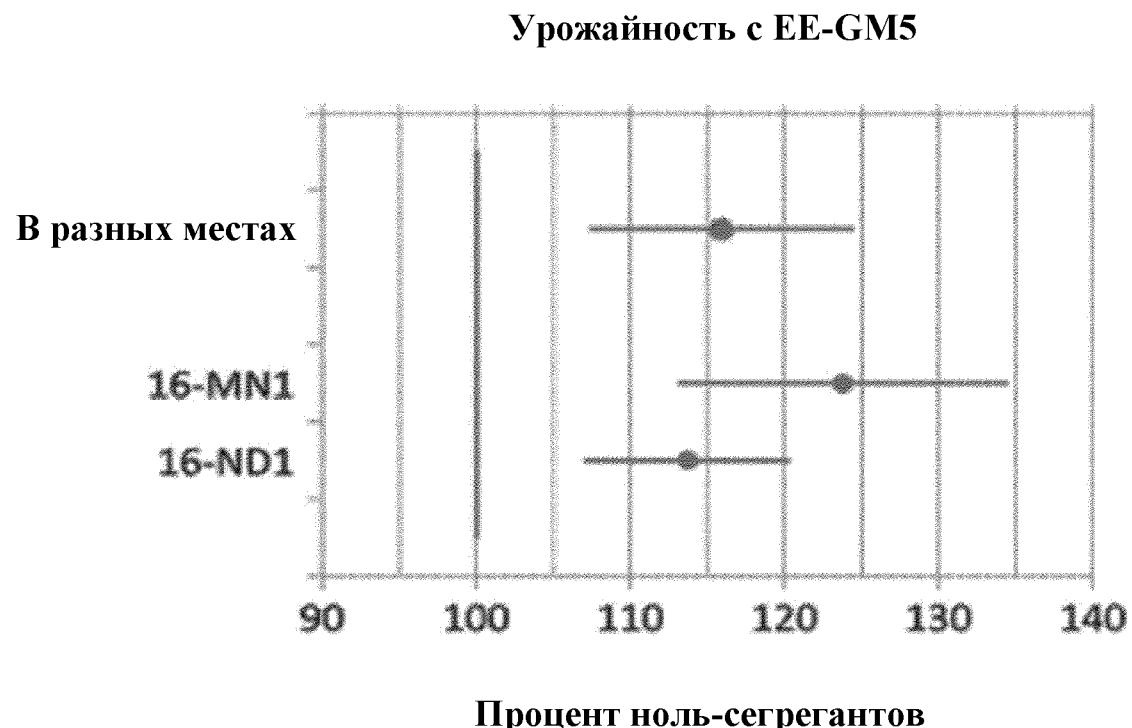
Фигура 5

заменивший лист (правило 25)



Фигура 6

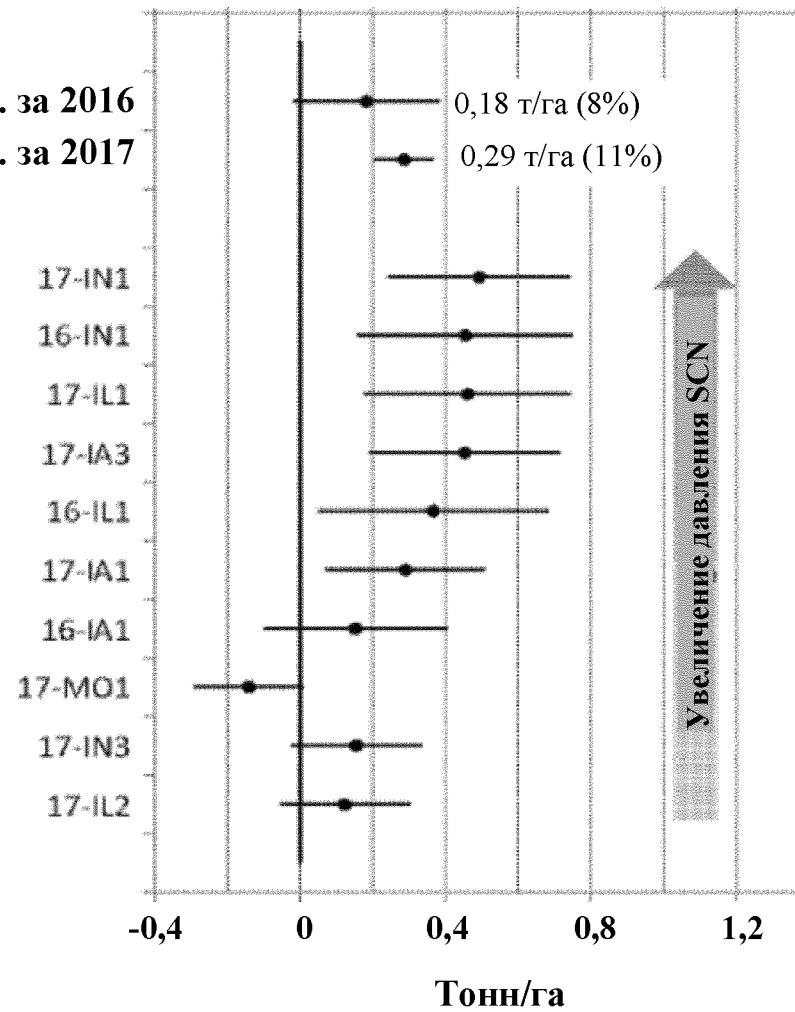
заменивший лист (правило 25)



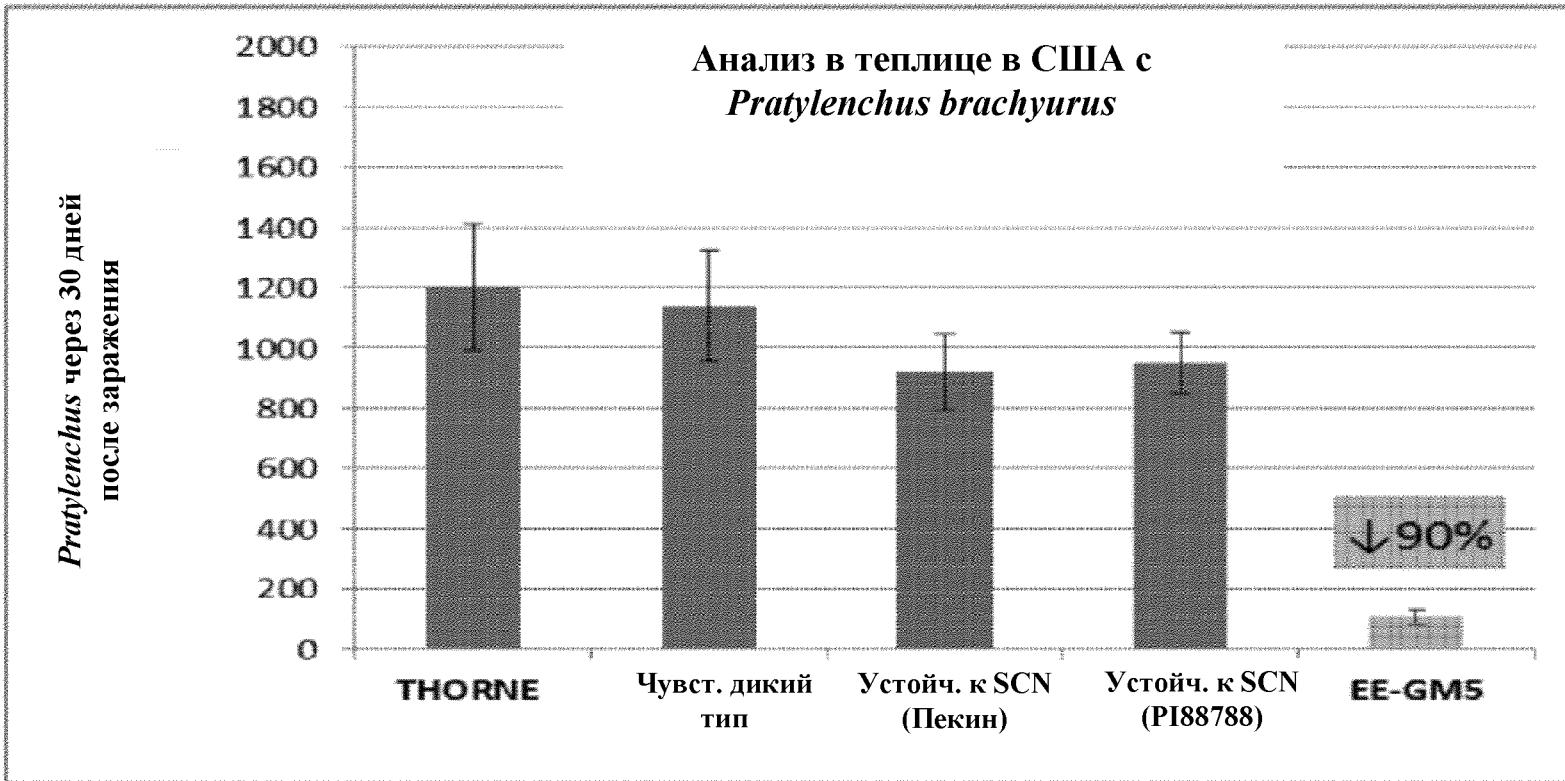
Фигура 7

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 25)

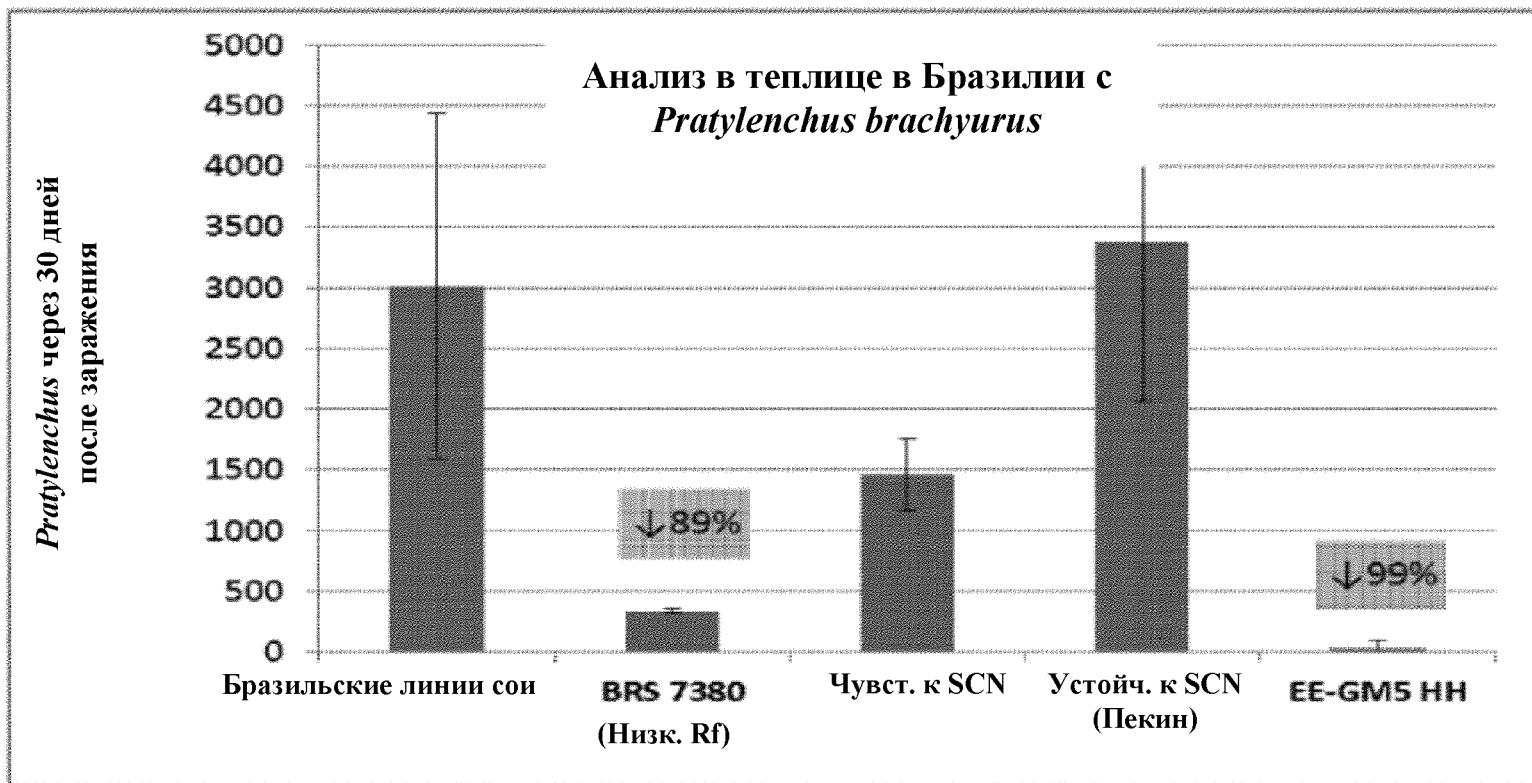
Средн. за 2016
Средн. за 2017



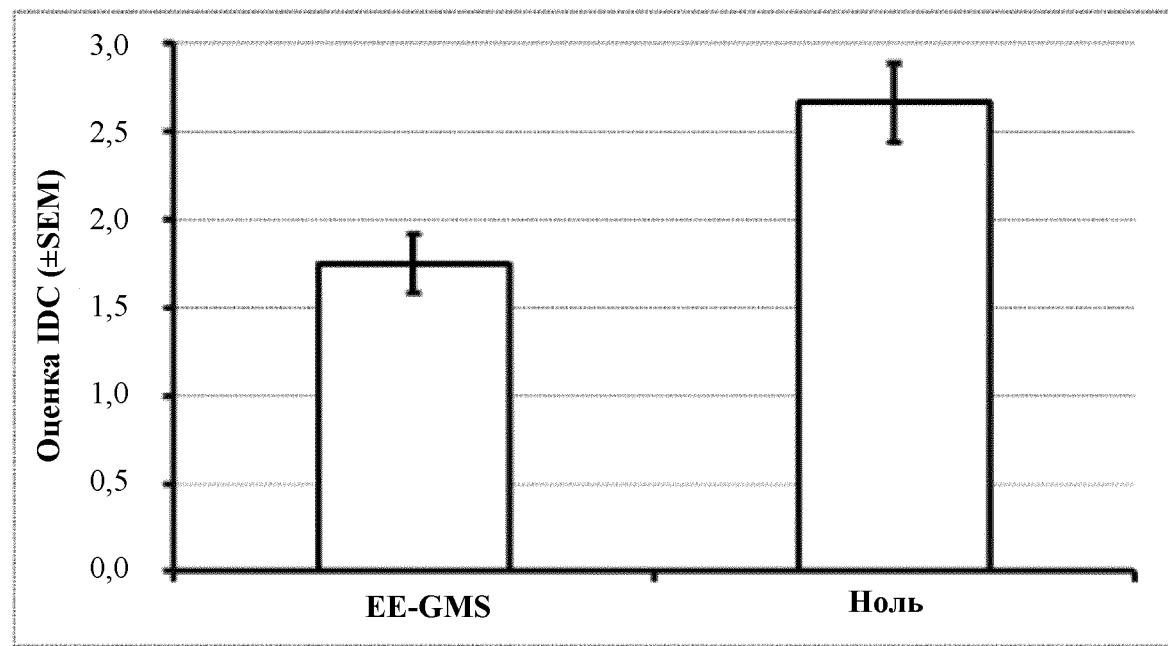
Фигура 8



Фигура 9

**Фигура 10**

заменивший лист (правило 25)



Фигура 11