

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991557** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.02

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

(22) Дата подачи заявки
2017.12.22

**(54) ЭЛИТНЫЙ ТРАНСГЕННЫЙ ОБЪЕКТ ЕЕ-GM4, А ТАКЖЕ СПОСОБЫ И НАБОРЫ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТАКОГО ОБЪЕКТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ**

(31) **62/437,862; 62/481,284; 62/487,707**

(32) **2016.12.22; 2017.04.04; 2017.04.20**

(33) **US**

(86) **PCT/US2017/068116**

(87) **WO 2018/119361 2018.06.28**

(71) Заявитель:

**БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Мозер Хэл (US), Буйзе Максим,
Слаббинк Филип (BE), Байлинсон
Вадим, Клевен Том, Даум Юлия (US),
Аартсен Венди, Хабекс Феерле (BE),
Мэккарвил Майкл (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.

A1

201991557

201991557

A1

Элитный трансгенный объект EE-GM4, а также способы и наборы для идентификации такого объекта в биологических образцах

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США с порядковым № 62/437862, поданной 22 декабря 2016 года, предварительной заявки на патент США с порядковым № 62/481284, поданной 4 апреля 2017 года, и предварительной заявки на патент США с порядковым № 62/487707, поданной 20 апреля 2017 года, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к новым нуклеиновым кислотам и трансгенным растениям сои, растительному материалу и семенам, характеризующимся наличием специфического трансгенного объекта, полученного в результате 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 характеристикой, генетической стабильностью и функциональностью в различных генетических фонах, эквивалентных соответствующему генетическому фону нетрансформированной сои в отсутствие гербицида-ингибитора (гербицидов-ингибиторов) HPPD или заражения нематодой. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам и наборам для идентификации присутствия растительного материала, содержащего специфический трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, в биологических образцах.

Уровень техники изобретения

Фенотипическая экспрессия трансгена в растении определяется как структурой гена или генов самих по себе, так и его или их местоположением в геноме растения. В то же время присутствие трансгенов или "вставленной Т-ДНК" в различных местоположениях в геноме будет по-разному влиять на общий фенотип растения. Агрономически или промышленно успешное внедрение признака, представляющего интерес с коммерческой точки зрения, в организм растения путем генетической манипуляции может представлять собой продолжительную процедуру, зависящую от различных факторов. Фактическая трансформация и регенерация генетически 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 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, позволяющие однозначно определить элитный трансгенный объект без экспертной интерпретации, однако при необходимости выдерживать экспертную оценку. Специализированные средства для применения в идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах описаны в настоящем документе.

В настоящем изобретении EE-GM4 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 комбинации с геном, придающим устойчивость к нематодам, каждый из которых находится под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении.

Выращивание устойчивых к нематоде и выносливых к гербицидам сортов EE-GM4 сои обеспечивает растениеводо 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 патогеном сои. 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. В ходе многолетнего исследования в штате Айова, США (2001-2015 гг.), где почти все устойчивые к SCN сорта сои содержат признак устойчивости к SCN из PI 88788, обнаружили, что вирулентность популяций SCN за эти годы возросла, что приводит к повышенной плотности популяций SCN в конце сезона и снижению урожаев у устойчивых к SCN сортов сои, источником устойчивости которых является PI88788 (Mitchum (2016), *Phytopathology* 106(12): 1444-1450, Allen et al. (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 главным патогеном-нематодой 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* культивары не были выявлены до настоящего времени. Хотя несколько генотипов сои подвергали исследованию в отношении устойчивости к *Pratylenchus brachyurus* и идентифицировали некоторые культивары с повышенной выносливостью, селекция культиваров, устойчивых к *P. brachyurus*, является сложной вследствие того факта, что данная нематода является полифагом и не проявляет 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.* в: *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, глава 6 в книге: *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 fitonematoides: variação populacional, patogenicidade e estimativa de perdas.* *Tropical Plant Pathology* 36: 178-185).

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 приводят к фенотипу, который хорошо заметен, как, например, хлороз/пожелтение листьев, эффект контроля SCN легче заметить, в то время как в ином случае заражение SCN зачастую не "видно" растениюводу. Например, когда у растений сои имеется синдром внезапной смерти (SDS) или железодефицитный хлороз (IDC), защита от SCN будет приводить к тому, что растения будут более зелеными или будут иметь менее тяжелые 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. Выбор сорта является наиболее важным средством в борьбе с дефицитом железа, но выбор сортов осложнен значительным влиянием окружающей среды на генотип, что связано 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 представляет собой микоз, который также встречается в комплексе болезней с соевой цистообразующей нематодой (SCN). SDS является одной из наиболее вредоносных болезней сои в США, которые передаются через почву. Когда эта болезнь возникает в присутствии SCN, симптомы появляются раньше и являются более тяжелыми. SDS вызывается почвенными грибами группы комплекса видов *Fusarium solani*. В Северной Америке возбудителем болезни является *Fusarium virguliforme*, ранее *Fusarium solani* f. sp. *glycine*. В Южной Америке *F. brasiliense*, *F. cuneirostrum*, *F. tucumaniae* и *F. virguliforme* вызывают симптомы SDS. Несмотря на то, что были разработаны культивары сои, которые менее восприимчивы к SDS, высокоустойчивые культивары отсутствуют. Гриб может заражать корни проростков сои вскоре после посадки, но симптомы SDS у надземной части редко проявляются до тех пор, пока

растения сои не достигают репродуктивных стадий. Гриб продуцирует токсины в корнях, которые перемещаются в листья. Первыми заметными симптомами SDS являются пожелтение и дефолиация верхних листьев. Если 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 грибок, вызывающий SDS, может сохраняться в почве в течение длительных периодов, во время каждого периода вегетации симптомы болезни будут проявляться на все большей площади, пока большая часть поля не окажется пораженной (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 нематоду. В уровне техники были описаны 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 как ген *hppd*, так 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 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, 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 Cru была описана, например, в WO2010027805, WO2010027809, WO2010027804, WO2010027799, WO2010027808, а также в WO2007147029.

Ни в одном из изобретений известного уровня техники не заявлен или предложен элитный трансгенный объект в сое, содержащей активный в отношении нематод ген Cru, и, несомненно, отсутствует элитный трансгенный

объект в сое, содержащей активный в отношении нематод ген Cry в комбинации с геном, придающим выносливость к ингибиторам HPPD.

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

Краткое описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

В настоящем изобретении представлена нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cry14Ab-1, такая как кодирующая последовательность *cry14Ab-1.b* под SEQ ID No. 7 или последовательность, кодирующая нематоцидный белок Cry14Ab, которая характеризуется 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 последовательность *hppdPf-4Pa* 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 Cry14Ab, которая характеризуется 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 с комплементарной ей последовательностью, или с последовательностью от положения нуклеотида 412 до положения нуклеотида 3969 из SEQ ID No. 11 (когда она функционально связана с промотором, обеспечивающим экспрессию в растении). Кроме того, в настоящем документе представлен химерный ген *hppdPf-4Pa*, содержащий последовательность от положения нуклеотида 5382 до положения нуклеотида 7621 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, которая характеризуется по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с последовательностью от положения нуклеотида 5382 до положения нуклеотида 7621 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 (когда она функционально связана с промотором, обеспечивающим экспрессию в растении), где указанная последовательность кодирует белок HPPD, обеспечивающий выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD, когда он экспрессируется 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, вследствие чего они контролируют нематод 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, 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. В одном варианте осуществления эта 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 данная химерная 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 или семена сои, устойчивости к нематодам и выносливости к гербицидам-ингибиторам HPPD.

Настоящее изобретение относится к трансгенному растению сои, части растения, его семени, клетке или ткани, содержащим стабильно интегрированную в их геном кассету экспрессии, которая содержит ген устойчивости к нематоду, содержащий кодирующую последовательность гена *cry14Ab-1.b*, и ген выносливости к гербицидам, содержащий кодирующую последовательность гена *hppdPf-4Pa* (обе, как описано в примере 1.1 в настоящем документе и как

представлено под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно), которые обеспечивают устойчивость к нематодам-паразитам растений, таким как соевая цистообразующая нематода, и выносливость к гербициду-ингибитору HPPD, такому 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.

В соответствии с настоящим изобретением растение сои или его семя, клетки или ткани содержат элитный трансгенный объект EE-GM4. В одном варианте осуществления элитный трансгенный объект EE-GM4 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. В одном варианте осуществления EE-GM4 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, а также кодирующую последовательность *cry14Ab-1.b* под SEQ ID No. 7 и кодирующую последовательность *hppdPf-4Pa* под SEQ ID No. 9. В одном варианте осуществления элитный трансгенный объект EE-GM4 представляет собой чужеродную ДНК (или вставленную Т-ДНК), вставленную в специфическое положение в геноме сои, в котором она содержится в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером депонирования PTA-123624. В одном варианте осуществления такая вставленная Т-ДНК в EE-GM4 содержит химерный ген, кодирующий Cry14Ab-1, и ген, кодирующий HPPD-4. В другом варианте осуществления указанный трансгенный 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-GM4, 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 126 п.о. В одном варианте осуществления геномная ДНК, содержащая EE-GM4, при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную

последовательность под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 90 п.о.

В одном варианте осуществления в настоящем документе представлено растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект, было депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624. В одном варианте осуществления растение или семя, содержащие EE-GM4, получены путем размножения и/или селекции с помощью растения сои, выращенного из семени, депонированного в АТСС под номером депонирования РТА- 123624.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к трансгенному растению сои, части растения, его пыльце, семени, клетке или ткани, геномная ДНК которых характеризуется тем, что при анализе с помощью ПЦР, как описано в настоящем документе, с использованием по меньшей мере двух праймеров, направленных на участок, образованный частью 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM4 и частью вставленной Т-ДНК, амплифицируется фрагмент, который является специфическим для трансгенного объекта EE-GM4. 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 являющуюся 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 вставленную Т-ДНК, расположенную в 5'-направлении и являющуюся смежной с ним. В 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. 20 и SEQ ID No. 21, 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 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. 20, и праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 21, или пара праймеров, содержащая праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID 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 п.о., как например, фрагмент длиной 126 п.о. или 90 п.о.

Эталонное семя, содержащее элитный трансгенный объект по настоящему изобретению, было депонировано в ATCC под номером доступа РТА-123624. Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, такой как содержится в семени, депонированном под номером доступа РТА-123624, который, будучи введенным в растение сои, будет обеспечивать устойчивость к нематодам и выносливость к гербицидам, в частности устойчивость к соевой цистообразующей нематодой (*Heterodera glycines*, в настоящем документе "SCN") и/или ранящей нематодой ("ранящая нематода", используемая в настоящем документе, относится к нематодам-вредителям сои *Pratylenchus* spp., в том числе без ограничения к *Pratylenchus brachyurus*) и выносливость к ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. Растения с ЕЕ-GM4 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., такую как *H. columbus*, *H. galeatus* и *H. magnistylus*). В настоящее изобретение включены минорные варианты данного трансгенного объекта, такие как трансгенный объект сои с выносливостью к ингибиторам HPPD и устойчивостью к нематодой SCN, который имеет нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 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 ЕЕ-GM4, содержащегося в семени, депонированном в ATCC под номером депонирования РТА-123624, или трансгенный объект сои с выносливостью к ингибиторам HPPD и устойчивостью к нематодой SCN, который имеет нуклеотидную последовательность, отличающуюся 1-200, 1-150, 1-100, 1-75, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности ЕЕ-GM4, содержащегося в депонированном семени с номером депонирования ATCC РТА-123624, или который имеет нуклеотидную последовательность, отличающуюся 1-200, 1-150, 1-100, 1-75, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10 или 1-5 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, образованной следующими последовательными нуклеотидными последовательностями (5'-3'): SEQ ID No. 5

или SEQ ID No. 24, последовательность от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7368 из SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 6 или SEQ ID No. 25. В одном варианте осуществления EE-GM4 содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 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, последовательность от положения нуклеотида 188 до положения нуклеотида 7368 из SEQ ID No. 11 и SEQ ID No. 6 или 25. Вследствие естественной генетической изменчивости у растений одного вида обычно встречаются отличия по одному основанию ДНК и небольшие вставки и делеции в гомологичных последовательностях ДНК (например, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP)) (Zhu et al.(2003) Genetics 163: 1123-1134).

Семя под номером депонирования ATCC PTA-123624 представляет собой чистую партию семян из трансгенных семян, гомозиготных по элитному трансгенному объекту EE-GM4 по настоящему изобретению, которые вырастут в устойчивые к нематоды растения, при этом растения также являются выносливыми 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 отличающимся генетическим фоном), могут быть посеяны, и семя или выращиваемые растения могут быть обработаны с помощью ингибитора HPPD, такого как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, как описано в настоящем документе, или могут быть протестированы на присутствие EE-GM4, как описано в настоящем документе, с получением растений, содержащих элитный трансгенный объект по настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам, семенам, тканям, потомству и потомкам растения, содержащего элитный трансгенный объект по настоящему изобретению, выращенного из семени, депонированного в ATCC с номером доступа PTA-123624. Настоящее изобретение дополнительно относится к растениям, получаемым (как, например, путем размножения и/или селекции) из растения сои, содержащего элитный трансгенный объект по настоящему изобретению (такого как растение, выращенное из семени, депонированного в ATCC с номером доступа PTA-123624, или растение, содержащее кодирующую последовательность *hppdPf-4Pa* под SEQ ID No. 9 и кодирующую последовательность *cry14Ab-1.b* под SEQ ID No. 7, расположенные между последовательностью под SEQ ID No. 1, 3 5 или 24 и последовательностью под SEQ ID No. 2, 4 6 или 25, или растение, содержащее кодирующую последовательность HPPD под SEQ ID No. 9 и кодирующую последовательность *cry14Ab-1.b* под SEQ ID No. 7, расположенные между любой

из последовательностей под SEQ ID No. 1, 3 или 5 и последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6). Настоящее изобретение также относится к растениям-потомкам и семенам, полученным из упомянутых выше растений или семени, и которые содержат 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-GM4, 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 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 как часть вставленной Т-ДНК, содержащей трансген устойчивости к ингибитору HPPD и к нематоду, так 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-GM4, идентифицированный в настоящем документе.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, при этом способы основаны на праймерах или зондах, которые специфически распознают 5'- и/или 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ней. Любые другие способы идентификации EE-GM4, 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 элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, предусматривающему амплификацию последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в указанных биологических образцах, с использованием полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере

двух праймеров, или полимеразной цепной реакции с помощью по меньшей мере двух праймеров и зонда, где один из этих праймеров распознает 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК в ЕЕ-GM4, другой праймер распознает последовательность в пределах 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-GM4, а второй праймер распознает последовательность в пределах Т-ДНК, содержащую гены выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, которая расположена в 3'-направлении от указанного 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и является смежной с ним, или первый праймер распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК в ЕЕ-GM4, а второй праймер распознает последовательность в пределах Т-ДНК, содержащую гены выносливости к гербицидам и устойчивости к нематоде, которая расположена в 5'-направлении от указанного 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и является смежной с ним, с получением фрагмента ДНК, характерного для элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM4. В одном варианте осуществления указанный способ полимеразной цепной реакции дополнительно предусматривает применение зонда, который распознает ДНК, амплифицированную с помощью указанных праймеров, например, пограничную ДНК, содержащую часть вставленной Т-ДНК и часть ДНК, фланкирующей указанную Т-ДНК в ЕЕ-GM4 (либо на 5'-, либо на 3'-стороне трансгенного объекта, в зависимости от конкретного случая, как, например, зонд, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 14 или 22 в настоящем документе), так, чтобы выявить продукт амплификации, полученный с помощью указанных праймеров. Праймеры могут распознавать последовательность в пределах 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из ЕЕ-GM4 (от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24) или в пределах 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из ЕЕ-GM4 (последовательность, комплементарная последовательности от положения нуклеотида 254 до положения нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6 или от положения нуклеотида 254 до положения нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25) и последовательность в пределах вставленной Т-ДНК (от положения нуклеотида 228 до 398 из SEQ ID No. 5, или от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 SEQ ID No. 23, или комплементарная им последовательность) соответственно. Праймер, распознающий 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 21, SEQ ID No. 26 или SEQ ID No. 27, а праймер, распознающий последовательность в

пределах вставленной Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 28 или SEQ ID No. 29, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение также относится к любой специфической для трансгенного объекта паре праймеров и специфической ДНК, амплифицированной с применением такой пары праймеров, которые могут быть получены рядовым специалистом в данной области техники или которые могут быть получены из коммерческих источников.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, при этом способ предусматривает амплификацию последовательности нуклеиновой 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 126 п.о., или с помощью двух праймеров, содержащих или состоящих (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, для получения фрагмента ДНК размером 90 п.о. Также в настоящем изобретении предусмотрены растения, содержащие идентифицированный таким образом элитный трансгенный объект EE-GM4.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к специфическим последовательностям, фланкирующим Т-ДНК, из EE-GM4, описанным в настоящем документе, которые могут быть использованы для разработки специфических способов идентификации EE-GM4 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-GM4, которые могут быть использованы для разработки специфических праймеров и зондов, что далее описывается в настоящем документе. Также подходящими в качестве эталонного материала являются молекулы нуклеиновой 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. 20 и SEQ ID No. 21.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам идентификации присутствия EE-GM4 в биологических образцах на основе применения таких специфических праймеров или зондов. Праймеры могут содержать, состоять или

состоять по сути из нуклеотидной последовательности размером от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранной из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID 6, или последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, в комбинации с праймерами, содержащими, состоящими или состоящими по сути из нуклеотидной последовательности размером от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранной из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23, такой как нуклеотидная последовательность размером от 17 до приблизительно 200 последовательных нуклеотидов, выбранная из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от положения нуклеотида 17 до положения нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей 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-GM4 в биологических образцах, при этом указанные наборы содержат по меньшей мере одну пару праймеров или зонд, которые специфически распознают в EE-GM4 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и смежную с ним вставленную Т-ДНК, содержащую ген выносливости к гербицидам и ген устойчивости к нематоде.

Набор по настоящему изобретению может содержать в дополнение к праймеру, который специфически распознает 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM4, второй праймер, который специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей ген

выносливости к гербициду-ингибитору HPPD и устойчивости к нематоду, из EE-GM4, для применения в протоколе ПЦР-идентификации. Наборы по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере два специфических праймера, один из которых распознает последовательность в пределах 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM4, или последовательность в пределах 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM4, а другой распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей ген выносливости к гербициду-ингибитору HPPD и ген устойчивости к нематоду. Праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 21, а праймер, распознающий вставленную Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 20, или праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, а праймер, распознающий вставленную Т-ДНК, может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12, или любой другой праймер или комбинацию праймеров, описанных в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать зонд, распознающий последовательность, расположенную между праймером, распознающим 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и праймером, распознающим последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, или распознающий последовательность, расположенную между праймером, распознающим 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и праймером, распознающим последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, такой как зонд, содержащий последовательность под SEQ ID No. 14, или зонд, содержащий последовательность под SEQ ID No. 22.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 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. 20 и SEQ ID No. 21, для применения в протоколе для проведения ПЦР для EE-GM4, описанном в настоящем документе. Указанный набор, содержащий праймеры, содержащие или состоящие (по сути) из нуклеотидной последовательности 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. 20 и SEQ ID No. 21, может дополнительно содержать зонд, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 22. Указанный набор может дополнительно содержать буфер и реагенты, такие как любое или каждое

из следующих соединений: dNTP, (Taq) ДНК-полимераза, $MgCl_2$, стабилизаторы и необязательно краситель.

Настоящее изобретение также относится к набору для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 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-GM4, где такой специфический участок содержит часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM4 и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним. В одном варианте осуществления последовательность зонда соответствует специфическому участку, содержащему часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, из EE-GM4 и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним. 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. В одном варианте осуществления 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 из последовательности под SEQ ID No. 5, или последовательности, характеризующейся от 80% до 100% идентичностью последовательности с частью из по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов из последовательности под SEQ ID No. 6, где каждая из указанной части SEQ ID No. 5 или 6 содержит последовательности вставленной Т-ДНК и последовательности, фланкирующие Т-ДНК, примерно 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-GM4, так, чтобы быть применимыми в качестве праймера или зонда для выявления EE-GM4 или для характеристики растений, содержащих трансгенный объект EE-GM4. Такие последовательности могут содержать любую последовательность из по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или по меньшей мере 30 нуклеотидов, или могут содержать любую последовательность из 9, 10, 15, 20 или 30 нуклеотидов из последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и аналогичное количество нуклеотидов вставленной Т-ДНК из EE-GM4 с каждой стороны пограничного сайта соответственно, и они находятся на каком-

либо одном или обоих 5'- и 3'-участках пограничного сайта трансгенного объекта EE-GM4. 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 и семена сои, содержащие такие специфические молекулы ДНК.

Способы и наборы, охватываемые настоящим изобретением, могут применяться для различных целей, таких как без ограничения следующие: для идентификации присутствия или определения (нижнего) порога EE-GM4 в растениях, растительном материале или в продуктах, таких как без ограничения пищевые или кормовые продукты (свежие или обработанные), содержащие или полученные из растительного материала; дополнительно или в качестве альтернативы способы и наборы по настоящему изобретению могут применяться для идентификации трансгенного растительного материала для целей сегрегации трансгенного и нетрансгенного материала; дополнительно или в качестве альтернативы способы и наборы по настоящему изобретению могут применяться для определения качества (т. е. процентной доли чистого материала) растительного материала, содержащего EE-GM4.

Кроме того, настоящее изобретение относится к 5'- и/или 3'-участкам, фланкирующим Т-ДНК, из EE-GM4, а также к специфическим праймерам и зондам на основе 5'- и/или 3'-последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, из EE-GM4.

Настоящее изобретение также относится к геномной ДНК, полученной из растений, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, в частности, к геномной ДНК, содержащей последовательности, специфические для трансгенного объекта EE-GM4, такие как одна или обе пограничные последовательности EE-GM4 (содержащие часть ДНК, фланкирующей Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ними, характерные для EE-GM4), 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 нематоду 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 содержит ген *cry14Ab-1.b*, полученный из *Bacillus thuringiensis*, кодирующий белок Cry14Ab-1 под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, такой как химерный ген, содержащий промотор, обеспечивающий экспрессию в растении, и кодирующую последовательность под SEQ ID No. 7, и

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

В одном варианте осуществления указанный элитный трансгенный объект содержит нуклеотиды 1-227 из SEQ ID No. 5 или 1-1058 из SEQ ID No. 24 непосредственно в 5'-направлении и смежные с указанной вставленной Т-ДНК и нуклеотиды 254-501 из SEQ ID No. 6 или нуклеотиды 254-1339 из SEQ ID No. 25 непосредственно в 3'-направлении и смежные с указанной вставленной Т-ДНК.

В дополнительном варианте осуществления указанный элитный трансгенный объект получен путем селекции с помощью растения сои, выращенного из эталонного семени, содержащего указанный трансгенный объект, которое было депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.

В другом варианте осуществления геномная ДНК указанного растения сои или его клеток, частей, семян или потомков при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13, соответственно, дает фрагмент ДНК размером 126 п.о., или при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 90 п.о.

Также в настоящем документе представлен способ идентификации трансгенного растения сои или его клеток, частей, семени или потомка с устойчивостью к нематоде, как, например, устойчивостью к SCN, и/или *Pratylenchus*, и/или галловой нематоды, и/или почковидной нематоды, и 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 применением 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-GM4, причем указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из указанного элитного трансгенного объекта, причем указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом другой праймер из указанных праймеров, распознающих последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или где указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 17 до положения нуклеотида 7621 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 нематоду 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-GM4, причем указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или один праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из указанного элитного трансгенного объекта, причем указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и один праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, причем указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 17 до положения

нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вставленная Т-ДНК из элитного трансгенного объекта EE-GM4, используемого в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность и нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 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 17 до положения нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11, или комплементарную ей последовательность.

Также в настоящем документе представлены растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 80-100% идентичностью последовательности с ней, и/или последовательность под SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 80-100% идентичностью последовательности с такой последовательностью, и нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 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 7368 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей последовательностью.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к растению сои, клетке растения, ткани или семени, содержащим в своем геноме молекулу нуклеиновой 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.

Также в настоящем документе представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется 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 с комплементарной ей последовательностью, или которая характеризуется 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. 2, 4, 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью, или выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся при стандартных условиях жесткости с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24 или с комплементарной ей последовательностью или с нуклеотидной последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью.

Также в настоящем документе представлена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по 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 нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, гибридизирующуюся в условиях стандартной жесткости с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 7 или комплементарной ей последовательностью, где такая молекула нуклеиновой 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 осуществления такая молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей (гетерологичный) промотор, обеспечивающий экспрессию в растении, вследствие чего образуется химерный ген. Также в настоящем документе представлено применение указанной молекулы нуклеиновой кислоты в трансформированных растениях или семенах для контроля патогенных для 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 Cry14Ab, или ДНК, кодирующей белок Cry14Ab, или растения или семени, содержащих указанную ДНК под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, где указанный белок Cry14Ab представляет собой белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8, или белок, который характеризуется по меньшей мере 96% или по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, или белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8 от аминокислотного положения 1 до

аминокислотного положения 706, или белок, который характеризуется по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 98, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Дополнительно в настоящем документе представлен способ контроля почковидных нематод (*Rotylenchulus reniformis*), предусматривающий применение белка Cry14Ab или ДНК, кодирующей белок Cry14Ab, или растения или семени, содержащих указанную ДНК под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении, где указанный белок Cry14Ab представляет собой белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8, или белок, который характеризуется по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, или белок, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID No. 8 от аминокислотного положения 1 до аминокислотного положения 706, или белок, который характеризуется по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 98, или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

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, 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, выносящий 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-GM4, который представляет собой вставленную Т-ДНК в определенном локусе, где элитный трансгенный объект EE-GM4 содержится в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624, где указанная вставленная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Cry 14Ab-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 применением ПЦР с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID 12 и SEQ ID 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 126 п.о.

В настоящем изобретении представлена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность элитного трансгенного объекта EE-GM4, содержащегося в эталонном семени, депонированном в ATCC под номером депонирования РТА-123624, где указанный элитный трансгенный объект содержит химерный ген, кодирующий Cry 14Ab-1, и ген, кодирующий HPPD-4, и содержит последовательность под SEQ ID No. 1 или 3 и последовательность под SEQ ID No. 2 или 4.

В настоящем изобретении также представлена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая по порядку следующие нуклеотидные последовательности: а) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до 227 из SEQ ID NO. 5 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, б) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 188 до нуклеотида 7368 из SEQ ID No. 11 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, и с) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID NO. 6 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, как, например, такая молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность б), которая на по меньшей мере 99,5% или по меньшей мере 99,9% идентична нуклеотидной последовательности от нуклеотида 188 до нуклеотида 7368 из SEQ ID No. 11.

В настоящем изобретении также представлена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая по порядку следующие нуклеотидные последовательности: а) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до 1058 из SEQ ID NO. 24 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, б) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1059 до нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, и с) нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID NO. 25 или последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную ей, как, например, такая молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность б), которая на по 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-GM4, 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, биодизельное топливо, биокompозит, 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-GM4. В одном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного трансгенного объекта EE-GM4, 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-GM4, описываемый выше, где указанный соевый продукт представляет собой или содержит соевый шрот, молотые семена, муку или хлопья, и содержит нуклеиновые кислоты, специфические для элитного трансгенного объекта EE-GM4, где указанная нуклеиновая кислота поддается выявлению с использованием способов, описываемых в настоящем документе. В одном варианте осуществления указанная нуклеиновая кислота, специфическая для элитного трансгенного объекта EE-GM4, 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-GM4, 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-GM4, 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-GM4, для получения соевого продукта, где указанной элитный трансгенный объект содержит последовательность под любым из 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-GM4 в комбинации с другим локусом/геном устойчивости к SCN, например, путем объединения элитного трансгенного объекта EE-GM4 с другим локусом/геном устойчивости к SCN, встречающимся в том же растении/семени сои, и выращивания семени, содержащего EE-GM4 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, клетках или семенах по настоящему изобретению. У сои известно несколько локусов или генов устойчивости к SCN, и один или несколько из них могут быть объединены с EE-GM4 в одном и том же растении, клетке или семени, как, например, любой из генов/локусов устойчивости к SCN из источников устойчивости PI 88788, PI 548402 (Peking), PI 437654 (Hartwig или CystX®) или любая их комбинация, или один или несколько из нативных локусов/генов устойчивости к SCN: *rhg1*, *rhg1-b*, *rhg2*, *rhg3*, *Rhg4*, *Rhg5*, qSCN11, cqSCN-003, cqSCN-005, cqSCN-006, cqSCN-007, или любой из локусов устойчивости к SCN, 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 комбинация (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. 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 настоящему изобретению содержат EE-GM4 в комбинации 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, представлен обширный перечень образцов сои, зарегистрированных как устойчивые к SCN, из которых гены/локусы устойчивости к SCN (один или несколько) могут быть комбинированы с EE-GM4 по настоящему изобретению в одних и тех же растении 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 ЕЕ-GM4, 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 ЕЕ-GM4, описываемый выше, гербицидом-ингибитором HPPD до посадки растений сои или посева семян с последующими посадкой или посевом указанных растений или семян сои 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 ЕЕ-GM4, 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 указанного растения, семени или потомка содержит в своем геноме элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, где ЕЕ-GM4, который представляет собой вставленную Т-ДНК в определенном локусе, содержащуюся в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624, где указанная вставленная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Cry 14Ab-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 трансгенное растение сои, его семя или потомок являются устойчивыми к нематодам и/или выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD. В одном варианте осуществления указанная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Cry 14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и указанный элитный трансгенный объект

характеризуется 5'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 5 и 3'-пограничной последовательностью под SEQ ID No. 6.

Также в настоящем документе представлено применение растения или семени сои, содержащих в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, для выращивания устойчивого к нематоде и/или выносливого к гербицидам растения, где указанный элитный трансгенный объект EE-GM4 представляет собой вставленную Т-ДНК в определенном локусе, содержащуюся в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624, где указанная вставленная Т-ДНК содержит химерный ген, кодирующий Cry 14Ab-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 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 Cry 14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, и указанный элитный 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 семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM4, для получения соевого продукта, где EE-GM4 представляет собой трансгенный объект, который описан выше.

Также в настоящем документе представлен способ получения растения или семени сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, предусматривающий скрещивание растения, содержащего EE-GM4, с другим растением сои и высаживание семени, содержащего EE-GM4, полученного в результате указанного скрещивания. В одном варианте осуществления такой способ предусматривает стадию применения гербицида-ингибитора HPPD в отношении указанного семени или растения.

В соответствии с настоящим изобретением также представлено применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM4, описываемый выше, и гербицида-ингибитора HPPD для контроля сорняков на соевом поле, и применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM4, 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-GM4, 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-GM4, в комбинации с гербицидом-ингибитором HPPD для выращивания сои.

Также в настоящем документе представлена пара праймеров, специфических для EE-GM4, а также наборы или способы с применением такой пары праймеров, где по меньшей мере один праймер из указанной пары является меченым (как, например, с помощью (гетерологичного) выявляемого или поддающегося скринингу фрагмента, который добавляют к праймеру), или где 5'-конец по меньшей мере одного из указанных праймеров содержит одну или несколько ошибок спаривания или нуклеотидную последовательность, неродственную фланкирующим 5'- или 3'-последовательностям из EE-GM4 или неродственную последовательности Т-ДНК из EE-GM4; или где по меньшей мере один из указанных праймеров содержит на своем 3'-конце нуклеотидную последовательность, охватывающую участок соединения между последовательностями, фланкирующими Т-ДНК, и последовательностями Т-ДНК, причем указанный участок соединения находится при нуклеотидах 227-228 в SEQ ID No. 5, нуклеотидах 1058-1059 в SEQ ID No. 24 или при нуклеотидах 253-254 в SEQ ID No. 6 или 25, при условии, что 17 последовательных нуклеотидов на 3'-конце не получены исключительно из одной из последовательности Т-ДНК или последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, в SEQ ID No. 5 или 24, или 6 или 25; или где по меньшей мере один из указанных праймеров содержит последовательность, которая на 80-100% идентична последовательности в пределах фланкирующего 5'- или 3'-участка из EE-GM4 или в пределах вставленной Т-ДНК из EE-GM4 соответственно, и 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 еще позволяет осуществлять специфическую идентификацию элитного трансгенного объекта EE-GM4 с помощью таких праймеров при оптимизированных условиях выявления (например, оптимизированных условиях ПЦР); или где нуклеотидная последовательность по меньшей мере одного из указанных праймеров содержит нуклеотидную последовательность из нуклеиновой кислоты, слитой с нуклеиновой кислотой, имеющей другое происхождение, или комплементарную ей последовательность.

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

1. Способ идентификации элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM4 в биологических образцах, при этом способ предусматривает выявление специфического для ЕЕ-GM4 участка с помощью специфической пары праймеров или зонда, которые специфически распознают в ЕЕ-GM4 (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 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, в случае вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM4, причем указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или распознает 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM4, причем указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом другой праймер из указанных праймеров распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.
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 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из ЕЕ-GM4, содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида

- 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.
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 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM4, содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК содержит на своем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 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 последовательность под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно.

6. Способ по пункту 5, при этом способ предусматривает амплификацию фрагмента, специфического для EE-GM4, размером 126 или 90 п.о. с помощью ПЦР.
7. Способ по любому из пунктов 2-6, дополнительно предусматривающий стадию гибридизации зонда, специфического в отношении фрагмента ДНК, 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. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
10. Набор содержащий один праймер, распознающий 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM4, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или один праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM4, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и один праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6,

или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.

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 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM4 содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 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 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или указанный праймер, распознающий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM4 содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, и указанный праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит на своем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных

нуклеотидов, выбранных из последовательности, комплементарной нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 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. 20, и праймер, содержащий последовательность под SEQ ID No. 21.
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, распознающим 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. 20 и SEQ ID No. 21, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
17. Пара праймеров, подходящая для применения в специфическом выявлении ЕЕ-GM4, 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-GM4, и второй праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК в ЕЕ-GM4, смежной с указанным

фланкирующим 5'- или 3'-участком, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 SEQ ID No. 24, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 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. 20, или последовательность под SEQ ID No. 21.
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. 20, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 21.
20. Способ по пункту 1, при этом способ предусматривает гибридизацию нуклеиновой кислоты из биологических образцов со специфическим для EE-GM4 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 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM4 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, 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 или 4.
24. Набор для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, при этом указанный набор содержит специфический зонд, способный специфически гибридизироваться со специфическим участком из EE-GM4.
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, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ней в EE-GM4.
26. Набор по пункту 25, где последовательность указанного специфического зонда содержит нуклеотидную последовательность, которая 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.
27. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах.
28. Зонд по пункту 27, который содержит нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с последовательностью, содержащей часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, или часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ней в EE-GM4, или с комплементарной ей последовательностью.
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, или указанный зонд, содержащий последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или последовательность под любым из SEQ ID No. 2, 4 или 6.
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-GM4 участка с помощью специфического праймера или зонда, которые специфически распознают в EE-GM4 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ним, в образцах семени.
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, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM4, причем указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM4, причем указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом другой праймер из указанных праймеров, распознающих последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11, или нуклеотидную

последовательность от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность, и гибридизацию зонда, специфического для фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью указанных по меньшей мере двух праймеров.

34. Способ по пункту 33, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером 126 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 90 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
35. Способ скрининга семян на присутствие EE-GM4, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM4 участка с помощью специфической пары праймеров или зонда, которые специфически распознают в EE-GM4 5'- или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, и вставленную Т-ДНК, смежную с ним, 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 применением 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 EE-GM4, причем указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, в случае вставленной Т-ДНК в EE-GM4, причем указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом другой праймер из указанных праймеров, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от положения

нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность, и гибридизацию зонда, специфического для фрагмента ДНК, амплифицированного с помощью указанных по меньшей мере двух праймеров, такого как зонд, содержащий 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 126 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-GM4, при этом 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 последовательность под SEQ ID No. 18, и праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, а третий из указанных праймеров распознает последовательность во вставленной Т-ДНК, такую как нуклеотидная последовательность под SEQ ID No. 12, при этом в указанном способе применяют указанные праймеры, где фрагменты ДНК размером 126 и 108 п.о. являются амплифицированными.
39. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM4 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:
 - а) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты с первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 228 до положения нуклеотида 245 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от

положения нуклеотида 236 до положения нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;

b) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 210 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 271 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 меченым с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;

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-GM4 в указанных биологических образцах.

40. Трансгенное растение сои или его клетки, части, семя или потомок, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект, было депонировано в ATCC под номером депонирования РТА-123624.
41. Трансгенное растение сои, семя, клетки, части или потомок по пункту 40, геномная ДНК которых при анализе с применением ПЦР для EE-GM4 с помощью двух праймеров, содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID 12 и SEQ ID 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 126 п.о.
42. Семя, содержащее элитный трансгенный объект EE-GM4, который представляет собой вставленную Т-ДНК в специфическом положении в

- геноме сои, в котором она содержится в семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624 или полученных из него производных.
43. Растение сои, часть растения, клетка или ткань, или семя, содержащие элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, получаемый из семени по пункту 42.
 44. Растение сои или его семя, клетки или ткани, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, получаемые путем размножения и/или селекции с помощью растения сои, выращенного из семени, депонированного в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
 45. Семя сои, содержащее элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, при этом эталонное семя, содержащее указанный трансгенный объект, было депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
 46. Трансгенное растение, клетка или ткань сои, содержащие элитный трансгенный объект ЕЕ-GM4, 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 ЕЕ-GM4, 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 ЕЕ-GM4.
 50. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность по сути сходную 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, такая как 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 6 или с комплементарной ей последовательностью, такая как указанная молекула нуклеиновой кислоты, 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, которая характеризуется 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 7368 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 нуклеиновой кислоты по любому из таких пунктов, такое как растение сои, его клетка, часть растения, семя или потомок, содержащие молекулу нуклеиновой 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, также содержащее химерный ген, кодирующий Cry14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, в частности, такие химерные гены, содержащие нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно.
53. Молекула нуклеиновой 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 нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 и SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, или, например, молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 24 и SEQ ID No. 25 или комплементарную ей последовательность.

54. Трансгенное растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме трансгенный объект EE-GM4, характеризующийся молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность по сути сходную 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, комплементарной указанным последовательностям, где указанное растение сои также содержит химерный ген, кодирующий Cry14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4.
55. Растение сои, клетка, ткань или семя, содержащие EE-GM4 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 также содержащее химерный ген, кодирующий Cry14Ab-1, и химерный ген, кодирующий HPPD-4, или такие растение сои, клетка, ткань или семя, содержащие 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 6 или 25 или с комплементарной ей последовательностью, или такие 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 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 6 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.
59. 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.
60. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 50, 51, 58 и 59, которая дополнительно содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 7 и 9.
61. 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 7368 из SEQ ID No. 11 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или на 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 указанной вставленной Т-ДНК и является смежным с ней, и содержит последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или на по меньшей мере 99,5% идентична ей, или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или на по меньшей мере 99,5% идентична ей, и где указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположен непосредственно в 3'-направлении от указанной вставленной Т-ДНК и является смежным с ней, и содержит последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6 или последовательность, которая на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или на по меньшей мере 99,5% идентична ей, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, или последовательность, которая

на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или на по меньшей мере 99,5% идентична ей.

62. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID No. 7 или с комплементарной ей последовательностью, такой как нуклеотидная последовательность под SEQ ID No.7, как, например, молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность от нуклеотида 131 до 5276 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или последовательность, кодирующую нематоцидный белок Cry14Ab, которая характеризуется по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID No.7, или с последовательностью от положения нуклеотида 131 до положения нуклеотида 5276 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей последовательностью.
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 7621 из SEQ ID No. 11 или 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 7621 из SEQ ID No. 11 или с комплементарной ей последовательностью, где указанная последовательность кодирует белок HPPD, обеспечивающий выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD при экспрессии в растении.
64. Способ получения соевого продукта, предусматривающий получение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM4, 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.
66. Способ по пункту 4 или 65, где такой соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, специфическую для элитного трансгенного объекта

EE-GM4, как, например, такой продукт, который содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта EE-GM4, такую как 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-GM4, 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-GM4, как, например, такой продукт, который содержит нуклеиновую кислоту, которая дает ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта EE-GM4, такую как последовательность под SEQ ID No. 1 или 3, или последовательность под SEQ ID No. 2 или 4, или комплементарная им последовательность.
70. Способ защиты всходов растений сои от конкуренции с сорняками, предусматривающий обработку поля, которое засеяли семенами, содержащими элитный трансгенный объект EE-GM4, 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-GM4, описываемый выше, гербицидом-ингибитором HPPD до посадки растений сои или посева семян с последующими посадкой или посевом указанных растений или семян сои 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-GM4, 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-GM4, описываемый выше, для получения соевого зерна или семени.
75. Применение растения или семени сои, содержащего в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, описываемый выше, для выращивания растения, устойчивого к нематоду и/или выносливого к гербициду-ингибитору HPPD.
76. Применение семени сои, содержащего элитный трансгенный объект EE-GM4, для получения соевого продукта, где EE-GM4 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-GM4, определяемый выше, в комбинации с гербицидом-ингибитором HPPD для выращивания сои в поле или для выращивания соевой культуры.
78. Молекула нуклеиновой кислоты, получаемая из семени, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-123624, 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.
79. Растение сои, клетка, часть или семя, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, 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 Cry14Ab-1, и фланкирующие 5'- и 3'-последовательности, непосредственно окружающие указанную вставленную Т-ДНК, встречающуюся в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624.

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.
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. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 126 п.о.
82. Растение по любому из вышеприведенных пунктов, которое является выносливым к изоксафлутолу, и/или топрамезону, и/или мезотриону, как, например, такое 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 Cgyl4Ab-1, и отсутствует ген, кодирующий HPPD-4, с растением сои по любому из вышеперечисленных 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-GM4, 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 (а) засевание поля с применением семени, описываемого в любом из предыдущих пунктов; и (b) сбор семени сои, произведенного растениями, выросшими из указанного семени, и необязательно (с) 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 видов галловой нематоды или почкovidной 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-GM4, где элитный трансгенный объект EE-GM4 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 Cry 14Ab-1, где указанные растение, семя или клетка являются выносливыми к гербициду-ингибитору HPPD и характеризуются устойчивостью к SCN.
89. Растение по пункту 88, где элитный трансгенный объект EE-GM4 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-GM4 содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% 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 нематоды, где указанная нематода представляет собой нематоду SCN, или

видов *Pratylenchus*, или видов галловой нематоды или почкovidной 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, выносимый 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) посадки или посева растений или семян сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, как описано выше, на указанном обработанном поле, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
96. Способ контроля сорняков, характеризующийся тем, что он предусматривает стадии: 1) посадки растений или семян сои, выносимых к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, на поле, и 2) применение гербицида-ингибитора HPPD, такого как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, в отношении указанного поля перед посадкой указанных растений или семян, или в отношении указанных растений или семян сои после посадки (может осуществляться до или после прорастания семян), где указанные растения или семена содержат в своих геномах элитный трансгенный объект EE-GM4 сои, полученный в результате трансформации, при этом эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.

97. Способ контроля сорняков, характеризующийся тем, что он 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) посадки растений сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4 сои, полученный в результате трансформации, или посева семян сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4 сои, полученный в результате трансформации, на указанном предварительно обработанном поле, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект EE-GM4 сои, полученный в результате трансформации, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
98. Способ снижения потерь урожая в поле, предназначенном для посадки растений сои, в частности, в поле, которое содержит или, как предполагается, содержит нематод, как, например, SCN, RKN или *Pratylenchus*, или почкovidных нематод или их комбинацию, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, как описано выше, и 2) посадки или посева растений или семян сои, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
99. Способ повышения урожая растений сои при посадке в поле, содержащем нематод, как, например, SCN, RKN или *Pratylenchus*, или почкovidных нематод, или их комбинацию, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, как описано выше, и 2) посадки или посева растений или семян сои, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
100. 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 почкovidным 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 почкovidным нематодам, характеризующийся стадией введения в геном растения или

семени сои описываемого выше элитного трансгенного объекта EE-GM4 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 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-GM4 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-GM4, 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-GM4 и часть геномной ДНК растения сои, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней.
102. Растение или семя, содержащие EE-GM4, описываемый выше, а также характеризующиеся 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 указанные растение или семя содержат EE-GM4 и любой один или комбинацию аллелей/локусов устойчивости к SCN из числа 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.
104. Растение или семя, содержащее EE-GM4, описываемый выше, также характеризующиеся выносливостью к другим гербицидам, обеспечиваемой генами выносливости к гербицидам (или нативными или мутантными генами сои или трансгенами), например, выносливостью к гербицидам на основе глифосата, глюфосината, сульфонилмочевины, имидазолинона, 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 EE-GM4, описываемый выше, и один 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, BPS-CV127-9, ACS-GM006-4, MON-87705-6 или трансгенный объект DP-305423-1.
106. Способ снижения тяжести эффектов синдрома внезапной смерти или железодефицитного хлороза растений сои при наличии заражения SCN или повышения урожая растений сои на полях, содержащих SCN, пораженных синдромом внезапной смерти, или на полях, содержащих SCN, вызывающих железодефицитный хлороз у сои, при этом способ предусматривает посадку растений сои или посев семян сои, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123624.

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 настоящий документ посредством ссылки, где:

Фигура 1. Схематическое изображение взаимосвязи между приводимыми нуклеотидными последовательностями и праймерами. Черный прямоугольник: вставленная Т-ДНК; заштрихованный прямоугольник: ДНК, фланкирующая Т-ДНК. Черные стрелки: олигонуклеотидные праймеры, стрелка с шахматным узором (a): химерный ген *cry14Ab-1.b* (состав химерного гена см. в таблице 1); стрелка со штриховкой (b): химерный ген *hppdPf-4Pa* (состав химерного гена см. в таблице 1); черные стрелки: олигонуклеотидные праймеры; (c) обозначает последовательность, комплементарную указанной нуклеотидной последовательности; черная линия: олигонуклеотидные зонды (число внизу представляет собой соответствующий SEQ ID No.). Числа под прямоугольниками, представляющие 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 EE-GM4.

На фигуре 2 показан пример результата способа, описанного в примере 2.1, для ряда образцов сои, содержащих EE-GM4, и обычных образцов сои. Для каждого образца показаны соотношения S/B как для реакции, специфической в отношении EE-GM4, так и для реакции с эндогенной последовательностью. На данной фигуре образцы, обозначенные "1-15", представляют собой образцы сои, содержащие EE-GM4, образцы, обозначенные "WT", представляют собой образцы сои дикого типа (не содержащие EE-GM4), а образцы, обозначенные "NTC", представляют собой контроли без матрицы. Вертикальные (белые) столбики, обозначенные с помощью "a", показывают сигнал, полученный для трансгенного объекта EE-GM4, вертикальные (темные) столбики, обозначенные с помощью "b", показывают сигнал, полученный для эндогенного гена сои. Горизонтальная линия, обозначенная с помощью "1", представляет собой минимальное отношение "сигнал-фон" для выявления трансгенного объекта EE-GM4, горизонтальная линия, обозначенная с помощью "2", представляет собой минимальное отношение "сигнал-фон" для выявления эндогенной последовательности сои, горизонтальная линия, обозначенная с помощью "3" представляет собой максимальное отношение "сигнал-фон" для образца, не содержащего целевую последовательность (без ДНК) (фоновая флуоресценция).

Фигура 3. Способ граничных точек для анализа идентичности и зиготности EE-GM4.

На фигуре 3 показан пример результата способа, описанного в примере 2.2, для ряда образцов сои, содержащих EE-GM4, в гомозиготном состоянии, образцов сои, содержащих EE-GM4, в гемизиготном состоянии, и обычных образцов сои. На данной фигуре:

- образцы в пределах линий, обозначенных с помощью "a": образцы сои, содержащие EE-GM4 в гомозиготном состоянии;
- образцы в пределах линий, обозначенных с помощью "b": образцы сои, содержащие EE-GM4 в гемизиготном состоянии;
- образцы в пределах линий, обозначенных с помощью "c": образцы сои, не содержащие EE-GM4;
- образцы в пределах прямоугольника, образованного линиями, обозначенными с помощью "d": неопределенные образцы.

Фигура 4. Способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия EE-GM4 на низком уровне

На фигуре 4 показан пример результатов способа RT-PCR, описанного в примере 2.3, для анализа присутствия на низком уровне, осуществляемого в отношении калибровочных образцов, при этом "a", "b", "c", "d", "e" указывают на Ct-значения для калибровочных образцы "A", "B", "C", "D", "E" соответственно. Калибровочные образцы "A", "B", "C", "D", "E" имеют уменьшающиеся количества ДНК EE-GM4.

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 в случае обработки гербицидами в нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет, для растений сои, содержащий трансгенный объект EE-GM4, в сравнении с нетрансформированными/обычными растениями сои (Thorne). Числа в () под обработкой показывают количество испытаний, включенных в столбик, число в верхней части каждого столбика дает среднее значение максимальной 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/гектар (4-кратная доза до появления всходов, 2-кратная доза после появления всходов).

Фигура 6. Урожай зерна EE-GM4 в Thorne на полях, зараженных SCN

Растения с EE-GM4 в исходном генетическом фоне для трансформации (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 собой оцененный урожай гомозиготного трансгенного объекта для каждого испытания (как процентное отличие от нуль-сегреганта), горизонтальные линии представляют 95% доверительные интервалы контраста между гомозиготным трансгенным объектом и нуль-сегрегантом (если линия не пересекает вертикальную линию, указывающую на 100-процентный урожай нуль-сегреганта, то трансгенный объект значительно отличался от нуль-сегреганта). "В разных местах" представляет оцененный результат комбинированного анализа по всем 9 местам.

Фигура 7. Урожай зерна в случае присутствия EE-GM4 в элитном восприимчивом генетическом фоне на полях, зараженных SCN.

ЕЕ-GM4 интрогрессировали (BC2F3) в элитную линию MG I (группа созревания I), которая является восприимчивой к SCN, и тестировали в одном месте в Миннесоте и одном месте в Северной Дакоте в 2016 году (каждое с высокими уровнями заражения SCN). Точка представляет собой оцененный урожай гомозиготного трансгенного объекта для каждого испытания (как процентное отличие от нуль-сегреганта), горизонтальная линия возле точки представляет 95% доверительные интервалы контраста между гомозиготным трансгенным объектом и нуль-сегрегантом (если линия не пересекает вертикальную линию, указывающую на 100-процентный урожай нуль-сегреганта (т.е. отсутствие отличия), то трансгенный объект значительно отличался от нуль-сегреганта). "В разных местах" представляет оцененный результат комбинированного анализа по обоим местам.

Фигура 8. Анализ устойчивости к *Pratylenchus* в теплице на территории США

Элитные растения сои с ЕЕ-GM4 контролируют *Pratylenchus brachyurus* в анализах в теплице на территории США. Растения с ЕЕ-GM4 ("ЕЕ-GM4") сравнивали с другими элитными линиями сои: одной восприимчивой к SCN линией из группы созревания (MG) 3 ("THORNE"), одной восприимчивой к SCN линией из MG3, одной восприимчивой к SCN линией из MG 6.2 и одной восприимчивой к SCN линией из MG9 ("восприимчивые WT" показывают среднее значение для данных 3 линий), одной устойчивой к SCN линией из MG3 (с аллелем устойчивости rhg1 из PI88788, "устойчивая к SCN (PI88788)") и одной устойчивой к SCN линии MG 6.2 с признаком устойчивости к SCN rhg1 и Rhg4 из Peking ("устойчивая к SCN (Peking)"). На график нанесены средние количества *Pratylenchus* в корнях через 30 дней после заражения (5 растений на вариант), при этом также показана вариация, наблюдаемая у разных сортов (что, как правило, наблюдается при анализах в теплице). Результаты показывают ~85% контроль *Pratylenchus* для разных линий ЕЕ-GM4. Линии сои с нативной устойчивостью к SCN (из Peking или PI88788) не контролируют *Pratylenchus brachyurus*.

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

Растения сои с ЕЕ-GM4 ("ЕЕ-GM4") значительно снижают количество *Pratylenchus brachyurus* в корнях сои. *Pratylenchus brachyurus* выделяли из местных полей в Бразилии. Растения с ЕЕ-GM4 (в двух различных элитных линиях из США (обе из группы созревания 6.2, одна восприимчивая к SCN и одна с устойчивостью к SCN из Peking ("ЕЕ-GM4")) и пять бразильских линий сои с ограниченным

контролем *Pratylenchus* ("бразильские линии"), одну бразильскую линию, обозначенную как характеризующуюся низким Rf (репродуктивный фактор) для *Pratylenchus* ("BRS 7380 (низкий Rf)"), одну элитную линию из США (группа созревания 6.2), которая является восприимчивой к SCN ("восприимчивая к SCN") и одну элитную линию из США из MG 6.2 с устойчивостью к SCN из Peking ("устойчивая к SCN (Peking)") оценивали в отношении контроля *Pratylenchus* с помощью анализа в теплице в Бразилии. На график нанесены средние значения для таких вариантов, а также показана вариация, наблюдаемая у разных сортов (что, как правило, наблюдается при анализах в теплице). Одна бразильская линия сои (BRS 7380) показала снижение *Pratylenchus* на ~89%. Линии с EE-GM4 приводили к ~79% контролю *Pratylenchus*. Линии сои, которые несут нативную устойчивость к SCN Peking, не контролируют *Pratylenchus brachyurus*.

Фигура 10. Оценки железодефицитного хлороза (IDC) у растений с EE-GM4 по сравнению с нуль-сегрегантами

На фигуре 10 показаны оценки IDC у растений сои с EE-GM4 в одном месте (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-GM4 ("EE-GM4") и соответствующим нуль-сегрегантом ("нуль-сегрегант", без EE-GM4) для трех генетических фонов (1 устойчивый к SCN, 1 восприимчивый к SCN и восприимчивый к SCN генетический фон Thorne). Один столбик представляет 12 суммарных делянок. Вертикальные линии указывают стандартную ошибку ("SEM" – стандартная ошибка среднего).

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

В настоящем изобретении EE-GM4 был идентифицирован как элитный трансгенный объект из популяции трансгенных растений сои, полученной при разработке устойчивой к нематоде сои (*Glycine max*), содержащий ген, кодирующий признак выносливости к ингибитору 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD), в комбинации с геном, придающим устойчивость к нематодам, каждый под контролем промотора, обеспечивающего экспрессию в растении. В настоящем документе описаны специфические средства для применения в идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах.

Встраивание молекулы рекомбинантной ДНК в геном растения обычно является результатом трансформации клетки или ткани. Встраивание в конкретный сайт обычно происходит вследствие случайного встраивания.

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-GM4 представляют собой ген устойчивости к нематоду SCN и ген 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, называемый "прединсерционная растительная ДНК" (также в настоящем документе называемый "прединсерционный локус"), может быть ассоциирована с делецией растительной ДНК, называемой "делеция целевого сайта". "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 (последовательность/молекула) нуклеиновой кислоты" или "выделенная (последовательность/молекула) ДНК", как используется в настоящем документе, относится к (последовательности/молекуле) нуклеиновой кислоты или ДНК, которые более не находятся в естественном окружении, из которого их выделили, например, к последовательности нуклеиновой кислоты в другой бактерии-хозяине или в геноме растения, или к (последовательности/молекуле) нуклеиновой кислоты или ДНК, слитыми с (последовательностью/молекулой) ДНК или нуклеиновой кислотой, имеющими

другое происхождение, как, например, когда они содержатся в химерном гене под контролем (гетерологичного) промотора, обеспечивающего экспрессию 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 характеризуется фенотипически по экспрессии трансгена или трансгенов. На генетическом уровне трансгенный объект является частью генома 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 представляют собой один или несколько, предпочтительно два или более, наиболее предпочтительно все критерии из следующих:

- а) эффективность признака;
- б) присутствие вставленной ДНК не ставит под угрозу другие благоприятные характеристики растения, такие как характеристики, относящиеся к агрономической характеристике или коммерческой ценности;
- с) трансгенный объект характеризуется четко определенной молекулярной конфигурацией, которая стабильно наследуется и для которой можно разработать подходящее средство контроля идентичности;
- д) 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 интрогрессию в коммерчески требуемые генетические фоны.

Элитный статус трансгенного объекта подтверждают интрогрессией элитного трансгенного объекта в различных релевантных генетических фонах и наблюдением соответствия одному, двум, трем или всем вышеприведенным критериям, например, а), б), с) 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.

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, 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 последовательность из 15-35 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, вследствие чего специфический фрагмент ("интегрированный фрагмент" или отличительный ампликон) амплифицируется 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.

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

- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 нуклеотидов до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранных из 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК (от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24 или геномные последовательности растения, расположенные в 5'-направлении и являющиеся смежными с ними), на своем 3'-конце (праймеры, распознающие 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК); или

- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 нуклеотидов до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранных из 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК (последовательность, комплементарная последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидная последовательность, комплементарная последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, или геномные последовательности растения, расположенные в 5'-направлении и являющиеся смежными с ними), на своем 3'-конце (праймеры, распознающие 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК); или
- олигонуклеотиды, длина которых варьирует от 17 нуклеотидов до приблизительно 200 нуклеотидов, содержащие нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, предпочтительно 20 последовательных нуклеотидов, выбранных из последовательностей вставленной Т-ДНК (последовательность, комплементарная последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11, или последовательность от нуклеотида 1059 до нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23, или комплементарная им последовательность), 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 228 до нуклеотида 398 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 253 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 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или последовательности от нуклеотида 1059 до нуклеотида 8663 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, неродственной фланкирующим последовательностям или вставленной Т-ДНК, такой как, например, нуклеотидная последовательность, представляющая собой один или несколько сайтов распознавания рестриктазами, или такой как нуклеотидные последовательности, способные к связыванию других олигонуклеотидов, таких как меченые олигонуклеотиды, такие как кассета 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.

Более того, подходящие праймеры могут содержать на своем 3'-конце или состоять (по сути) из нуклеотидной последовательности, охватывающей участок соединения между последовательностями, полученными из 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и последовательностями вставленной Т-ДНК (расположенный при нуклеотидах 227 и 228 в SEQ ID No. 5 и нуклеотидах 253 и 254 в SEQ ID No. 6, или нуклеотидах 1058 и 1059 в SEQ ID No. 24 и нуклеотидах 253 и 254 в SEQ ID No. 25), при условии, что указанные 17 последовательных нуклеотидов, расположенных на 3'-конце, не получены исключительно из вставленной Т-ДНК или последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, в 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 на комплементарный им нуклеотид в соответствии с правилами Чаргаффа ($A \rightleftharpoons T$; $G \rightleftharpoons C$) и прочитывания последовательности в направлении от 5'- к 3'-концу, т.е. в направлении, противоположном представленной нуклеотидной последовательности.

Примерами подходящих праймеров являются олигонуклеотидные последовательности под SEQ ID No. 13, или SEQ ID No. 21, или SEQ ID No. 26 или 27 (праймер, распознающий 3'- или 5'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК), или SEQ ID No. 14, или SEQ ID No. 20, 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 реакционную смесь может быть включен меченый зонд, который специфически связывается с амплифицированным фрагментом. В одном варианте осуществления меченый 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 в реакционную смесь может быть включена меченая кассета FRET, т.е.

олигонуклеотид, меченный флуоресцентной меткой и гасителем, которая специфически связывает один из праймеров в реакционной смеси, как, например, кассета FRET, направленная на 5'-выступ праймера, используемого в реакционной смеси (см., например, Semagn et al., 2014, Mol Breeding 33: 1-14, и US 7615620). Флуоресценция 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 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-GM4 в 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, как, например, в "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2-е изд., 1999, или 3-е изд., 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-GM4 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-GM4. 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 гибридизуется 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-GM4. Предпочтительно специфический зонд будет содержать последовательность из от приблизительно 15 до приблизительно 100 смежных нуклеотидов, идентичную (или комплементарную) специфическому участку элитного трансгенного объекта.

Олигонуклеотиды, подходящие для использования в качестве праймеров для ПЦР для выявления элитного трансгенного объекта EE-GM4, 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 предусматривать праймеры, специфически распознающие 5'- и/или 3'-последовательности, фланкирующие Т-ДНК из EE-GM4. 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 специфического локуса EE-GM4, 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 два локус-специфических продукта ПЦР, что отражает амплификацию трансгенного локуса и локуса дикого типа.

В качестве альтернативы для определения статуса зиготности растений, содержащих элитный трансгенный объект, два праймера, распознающих локус дикого типа перед интеграцией, конструируют таким образом, что они направлены друг на друга, 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 пределах SEQ ID No. 6 или 5 или в пределах SEQ ID No. 25 или 24, или специфически распознает прединсерционный локус. В соответствии с настоящим 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. 18, и один праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 13. Этот набор праймеров вместе с третьим праймером, комплементарным трансформирующим 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. 12, который прямо направлен на праймер, содержащий или состоящий (по сути) из нуклеотидной последовательности под SEQ ID No. 13), обеспечивает одновременную диагностическую ПЦР-амплификацию специфического для EE-GM4 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 в отношении прединсерционного локуса, и праймер, специфический в отношении вставленной Т-ДНК, могут иметь 5'-выступ, который специфически связывает меченую кассету FRET, т. е. олигонуклеотид, меченный флуоресцентной меткой и гасителем, где 5'-выступ и соответствующие кассеты FRET являются различными 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-GM4, сконструировали таким образом, что они направлены друг на друга, при этом один праймер специфически распознает 5'- или 3'-последовательность, фланкирующую 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-GM4 локуса. Амплифицированный фрагмент ДНК можно выявлять количественно с применением меченого зонда, который включают в реакционную смесь и который специфически связывается с амплифицированным фрагментом. Меченый 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-GM4 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-GM4, также может быть определен на основе анализа количества копий с использованием химии Taqman и принципов ПЦР в режиме реального времени. Альтернативный способ обычно предусматривает реакцию, специфическую в отношении EE-GM4, для количественного определения количества копий EE-GM4 и реакцию, специфическую в отношении эндогенного гена, для нормализации количества копий EE-GM4. Образцы, содержащие трансгенный объект EE-GM4 в гомозиготном состоянии, будут иметь относительное число копий, которое в два раза превышает число в гемизиготных образцах. В азиготных образцах при таком способе последовательность EE-GM4 амплифицироваться не будет.

Кроме того, используя представленную в настоящем документе специфическую информацию о последовательности элитного трансгенного объекта, можно разработать специфические способы выявления элитного трансгенного объекта EE-GM4, отличающиеся от способов амплификации на основе ПЦР. Такие альтернативные способы выявления включают способы выявления усиления линейного сигнала на основе инвазивного расщепления конкретных структур нуклеиновой 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). Для этой цели целевая последовательность гибридизируется с меченым первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 228 до положения нуклеотида 245 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 236 до положения нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, и дополнительно гибридизируется со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 210 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 271 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность, где указанный первый и второй олигонуклеотид перекрываются по меньшей мере по одному нуклеотиду. Дуплексная или триплексная 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-GM4 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:

а) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты с первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 228 до положения нуклеотида 245 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную

последовательность от положения нуклеотида 236 до положения нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;

b) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 210 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или со вторым указанным олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 271 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 меченым с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;

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-GM4 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-GM4 в биологических образцах или определения статуса зиготности растительного материала, содержащего EE-GM4. Более конкретно, 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-GM4. В качестве альтернативы согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения набор может содержать специфический зонд, описываемый выше, специфически гибридизирующий с нуклеиновой кислотой в биологических образцах, для идентификации присутствия EE-GM4 в них. Необязательно набор может дополнительно содержать любой другой реагент (такой как без ограничения гибридизирующий буфер, метка) для идентификации EE-GM4 в биологических образцах с использованием специфического зонда.

Набор по настоящему изобретению может применяться, а его компоненты могут быть специфически адаптированы для целей контроля качества (например, проверки чистоты партий семян), выявления присутствия или отсутствия элитного трансгенного объекта в растительном материале или материале, содержащем растительный материал или полученный из него, таком как без ограничения пищевые или кормовые 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 проводят с помощью алгоритма Вилбура и Липмана (Wilbur and Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) с применением размера окна из 20 нуклеотидов, длины слова из 4 нуклеотидов и штрафа за введение гэпа, составляющего 4. Компьютерный анализ и интерпретацию данных о последовательности, включая выравнивание последовательностей, описываемое 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 сути сходных или характеризующихся некоторой степенью идентичности с последовательностями ДНК, то тимидин (Т) в последовательности ДНК приравнивают к урацилу (U) в последовательности РНК. Также, ясно, что с течением времени в последовательностях ДНК могут возникать небольшие отличия или мутации, и что некоторые ошибки спаривания могут допускаться у праймеров и зондов по настоящему изобретению, которые являются специфическими в отношении трансгенного объекта, так что любая последовательность ДНК, указанная в настоящем документе в любом варианте осуществления настоящего изобретения для любой ДНК 3'- или 5'-участков, фланкирующих Т-ДНК, или для любой вставки, или вставленной Т-ДНК, или любого праймера или зонда по настоящему изобретению, также включает последовательности по сути сходные с последовательностями, представленными в настоящем документе, такие как последовательности, гибридизирующиеся с последовательностью, приведенной для любой ДНК 3'- или 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, для любого праймер или зонд или для любой вставки или вставленной Т-ДНК по настоящему изобретению, или характеризующиеся по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, как, например, нуклеотидную последовательность, отличающуюся 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 нуклеиновую кислоту, способную являться затравкой синтеза образующейся нуклеиновой 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 одонитевая форма является предпочтительной. Зонды можно использовать в качестве праймеров, однако они предназначены для связывания с ДНК- или РНК-мишенями 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 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) иммобилизации фрагментов геномной ДНК растений на фильтре, 2) предварительной гибридизации фильтра в течение 1-2 часов при 42°C в 50% формамиде, 5 X SSPE, 2X реагенте Денхардта и 0,1% SDS, или в течение 1-2 часов при 68°C в 6 X SSC, 2X реагенте Денхардта и 0,1% SDS, 3) добавления гибридизационного зонда, который был помечен, 4) инкубации в течение 16-24 часов, 5) промывки фильтра в течение 20 минут при комнатной температуре в 1X SSC, 0,1% SDS, 6) промывки фильтра трижды в течение 20 минут каждый раз при 68°C в 0,2X SSC, 0,1% SDS, и 7) экспозиции 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-GM4, предполагая присутствие нуклеиновых кислот в этих образцах. Таким образом, способы в настоящем документе для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 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 компонентов, к которым относится термин, не исключаяющее 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. являться частью более крупной нуклеиновой кислоты или белка. Химерный ген, содержащий функционально или структурно определенную последовательность ДНК, может содержать дополнительные последовательности ДНК, например, промотор, лидерную, трейлерную 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-GM4 в растениях сои, содержащих этот трансгенный объект, к растениям-потомкам и семенам, содержащим элитный трансгенный объект EE-GM4, полученным из этих растений, и к клеткам растений или растительному материалу, полученным из растений, содержащих этот трансгенный объект. Растения, содержащие элитный трансгенный объект EE-GM4, могут быть получены так, как описано в примерах. Настоящее изобретение также относится к семени, содержащему элитный трансгенный объект EE-GM4, депонированный в АТСС под номером депонирования РТА-123624 или полученных из него производных, содержащий элитный трансгенный объект EE-GM4. "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, содержащие EE-GM4, могут быть идентифицированы в соответствии с любым из протоколов идентификации EE-GM4, как описано в примерах, включая способ граничных точек для анализа идентичности EE-GM4 в примере 2.1, способ граничных точек для анализа идентичности и зиготности EE-GM4, описываемый в примере 2.2, или способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия EE-GM4 на низком уровне, описываемый в примере 2.3. Вкратце, геномную ДНК сои, присутствующую в биологическом образце, амплифицируют с помощью ПЦР с применением праймера, который специфически распознает последовательность в пределах 5' или 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM4, как, например, праймера с последовательностью под SEQ ID NO: 13 или SEQ ID No. 21, и праймера, который распознает последовательность во вставленной Т-ДНК, такого как праймер с последовательностью под SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 20, или праймера, который распознает 5'- или 3'-последовательность,

фланкирующую Т-ДНК, из EE-GM4 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-GM4.

Растения, несущие EE-GM4, характеризуются устойчивостью к нематоде, в частности, устойчивостью к нематоде SCN, ранящей и/или галловой нематоде ("RKN"), и/или почковидной нематоде, а также выносливостью к ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион. Растения сои различных коммерчески доступных сортов, несущих EE-GM4, 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 Cry14Ab-1, и отсутствует ген, кодирующий HPPD, с растением сои, содержащим EE-GM4, и отбор растения-потомка, устойчивого к SCN и выносливого к гербицидам-ингибиторам HPPD. Устойчивость к SCN может измеряться с применением стандартного анализа с применением 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 сегрегирующие сестринские линии ("нули"), утратившие трансгены). В частности в настоящем изобретении представлен элитный трансгенный объект в растениях сои, где вставка указанного элитного трансгенного объекта в геном таких растений сои или присутствие в нем, по-видимому, не вызывает повышенной восприимчивости к заболеванию, не вызывает потерь урожая или не вызывает увеличения полегания в сравнении с изогенными линиями или коммерческими линиями сои. Следовательно, в настоящем изобретении представлен элитный трансгенный объект в растениях сои, обозначаемый как EE-GM4, 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 культиварами сои. Указанные характеристики делают данный элитный трансгенный объект ценным средством в программе по контролю нематод и контролю устойчивых сорняков. В одном варианте осуществления, трансгенный объект EE-GM4 комбинируют с одним или несколькими трансгенными объектами GM сои, обеспечивающими выносливость к любому одному или комбинации гербицидов на основе глифосата, гербицидов на основе глюфосината, гербицидов на основе ингибитора HPPD, гербицидов на основе сульфонилмочевины или имидазолинона, гербицидов, ингибирующих AHAS или ALS, и/или гербицидов типа ауксина (например, дикамбы, 2,4-D), таким как трансгенный объект EE-GM3 (также известный как FG-072, MST-FG072-3, описанный в WO2011063411, ходатайстве 09-328-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект SYHT0H2 (также известный как 0H2, SYN-000H2-5, описанный в WO2012/082548 и 12-215-01p), трансгенный объект DAS-68416-4 (также известный как соя Enlist, описанный в WO2011/066384 и WO2011/066360, ходатайстве 09-349-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект DAS-44406-6 (также известный как Enlist E3, DAS-44406-6, описанный в WO2012/075426 и 11-234-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON87708 (выносливый к дикамбе трансгенный объект соя Roundup Ready 2 Xtend, описанный в WO2011/034704 и ходатайстве 10-188-01p от USDA-APHIS, MON-87708-9), трансгенный объект MON89788 (также известный как Genuity Roundup Ready 2 Yield, описанный в WO2006/130436 и ходатайстве 06-178-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект 40-3-2 (также известный как

Roundup Ready, GTS 40-3-2, MON-Ø4Ø32-6, описанный в ходатайстве 93-258-01 от USDA-APHIS), трансгенный объект A2704-12 (также известный как LL27, ACS-GMØØ5-3, описанный в WO2006108674 и ходатайстве 96-068-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект 127 (также известный как BPS-CV127-9, описанный в WO2010/080829), трансгенный объект A5547-127 (также известный как LL55, ACS-GMØØ6-4, описанный в WO2006108675 и в ходатайстве 96-068-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON87705 (MON-877Ø5-6, Vistive Gold, из опубликованной PCT-заявки на патент WO2010/037016, ходатайства 09-201-01p от USDA-APHIS) или трансгенный объект DP305423 (также известный как DP-3Ø5423-1, из опубликованной PCT-заявки на патент WO2008/054747, ходатайства 06-354-01p от USDA-APHIS), или EE-GM4 комбинируют с комбинацией из следующих трансгенных объектов: трансгенный объект MON98788 x MON87708 (также известный как соя Roundup Ready 2 Xtend, MON-877Ø8-9 x MON-89788-1), трансгенный объект HOS x трансгенный объект 40-3-2 (также известный как высокомасличная соя Plenish x соя Roundup Ready), трансгенный объект EE-GM3 x EE-GM2 (также известный как FG-072xLL55, описанный в WO2011063413), трансгенный объект MON 87701 x MON 89788 (также известный как соя Intacta RR2 Pro, MON-877Ø1-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (также известный как соя Conkesta™ Enlist E3™, DAS-81419-2 x DAS-444Ø6-6), трансгенный объект DAS-68416-4 x трансгенный объект MON 89788 (также известный как соя Enlist™ RoundUp Ready® 2, DAS-68416-4 X MON-89788-1), трансгенный объект MON-87769-7 x трансгенный объект MON-89788-1 (также известный как соя Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield), трансгенный объект MON 87705 x трансгенный объект MON 89788 (также известный как Vistive Gold, MON-877Ø5-6 x MON-89788-1) или трансгенный объект MON87769 x трансгенный объект MON89788 (также известный как соя Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield, MON-87769-7 x MON-89788-1).

В настоящем документе также представлено растение сои или его часть, содержащие трансгенный объект EE-GM4, где соответствующее семя сои, содержащее трансгенный объект EE-GM4, было депонировано в ATCC под номером доступа PTA-123624. Кроме того, в настоящем документе представлены семена таких растений, содержащие такой трансгенный объект, а также соевый продукт, полученный из таких семян, где указанный соевый продукт содержит трансгенный объект EE-GM4. Такой соевый продукт может представлять собой или может содержать соевый шрот, молотое соевое зерно, соевые хлопья, соевую муку, или продукт, содержащий любой из данных обработанных соевых продуктов. В частности, такой соевый продукт содержит нуклеиновую кислоту, образующую ампликон, имеющий диагностическое значение или являющийся специфическим для трансгенного объекта EE-GM4,

при этом такой ампликон содержит 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-GM4, и получение из него такого соевого продукта. Также в настоящем документе представлен способ получения обработанных пищевых, кормовых или промышленных продуктов, полученных из соевого зерна, таких как соевое масло, соевый белок, лецитин, соевое молоко, тофу, маргарин, биодизельное топливо, биокomпозиты, клеи, растворители, смазки, очистители, пену, краску, чернила, свечи, пищевые или кормовые продукты (продукты для животных), содержащие соевое масло или соевый белок, при этом указанный способ предусматривает получение зерна, содержащего EE-GM4 и получение указанного обработанного пищевого, кормового или промышленного продукта. В одном варианте осуществления данный способ также может включать стадию получения семени сои или растения, содержащего трансгенный объект EE-GM4, выращивания указанного семени или растения в поле и сбора зерна сои. Необязательно данный способ предусматривает внесение гербицида-ингибитора HPPD, такого как IFT, топрамезон или мезотрион, перед посадкой, перед появлением всходов, после появления всходов или на надземную часть растений, содержащих EE-GM4. В один вариант осуществления настоящего изобретения включены вышеуказанные обработанные пищевые, кормовые или промышленные продукты, полученные из сои, как, например, такие обработанные продукты, которые дают ампликон, специфический для трансгенного объекта EE-GM4, с применением способов, описанных в настоящем документе, или которые содержат нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID No. 1, 3 или 5 или под 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 объект EE-GM4, 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. 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, 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, устойчивого к нематодам и выносливого к гербициду изоксафлутолу, и/или топрамезону, и/или мезотриону, предусматривающий введение в геном такого растения трансгенного объекта EE-GM4, в частности, путем скрещивания первого растения сои без трансгенного объекта EE-GM4 с растением сои, содержащим EE-GM4, 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 агрономическими характеристиками, содержащее белок Cry14Ab-1 и HPPD-4 и такое, из которого можно получить ампликон, имеющий диагностическое значения для трансгенного объекта EE-GM4. Также в настоящем документе представлены специфические выделенные ампликоны (фрагменты последовательности ДНК) сами по себе, которые могут быть получены с применением специфических средств для выявления, описанных в настоящем документе, в частности ампликоны, содержащие в своей последовательности фрагмент ДНК, происходящий из ДНК 5'- или 3'-участков, фланкирующих Т-ДНК, и Т-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-GM4, 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-GM4. 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 описана химерная ДНК, содержащая вставленную Т-ДНК, где последовательность указанной вставленной Т-ДНК содержит последовательность от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от нуклеотида 1059 до нуклеотида 8663 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, фланкированную 5'- и 3'-участком, фланкирующим Т-ДНК, где 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположенный непосредственно в 5'-направлении и смежный с указанной вставленной Т-ДНК, характеризуется последовательностью, содержащей последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, и где 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, расположенный непосредственно в 3'-направлении и смежный с указанной вставленной Т-ДНК, характеризуется последовательностью, содержащей последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6 или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25. В одном варианте осуществления последовательность указанной вставленной Т-ДНК состоит из последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или от нуклеотида 1059 до нуклеотида 8663 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, фланкированной частью 5'- и 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, где указанная часть 5'-участка, фланкирующего Т-ДНК, расположенного непосредственно в 5'-направлении и смежного с указанной вставленной Т-ДНК, характеризуется последовательностью, состоящей из последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, или последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или по меньшей мере 99,9% идентичностью последовательности с ней, и где указанная часть 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, расположенного непосредственно в 3'-направлении и смежного с указанной вставленной Т-ДНК, характеризуется последовательностью, состоящей из последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности, комплементарной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, или последовательности, 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. 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 трансгенное растение сои, клетка растения, ткань или семя, содержащие в своем геноме трансгенный объект EE-GM4, 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 трансгенный объект EE-GM4, 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.

Далее в настоящем документе представлены растение сои, клетка, ткань или семя, содержащие EE-GM4, 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 последовательностью под любым из SEQ ID No. 1, 3, 5 или 24, и последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере 80%, 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 последовательностью под любым из SEQ ID No. 2, 4, 6 или 25, или последовательностью, комплементарной указанным последовательностям.

Термин "изоксафлутол", как используют в настоящем документе, относится к гербициду изоксафлутолу [т. е. (5-циклопропил-4-изоксазолил)[2-(метилсульфонил)-4-(трифторметил)фенил]метанон], его активному метаболиту дикетонитрилу и любым смесям или растворам, содержащим указанное соединение. Гербициды, ингибирующие HPPD, которые подходят для применения в отношении трансгенного объекта по настоящему изобретению, представляют собой 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-фион; 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-метил-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-GM4, может быть обработано гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол ('IFT'), топрамезон или мезотрион, или как гербицидом-ингибитором HPPD, так и глифосатом, перед посевом сои, что очищает поле от сорняков, которые уничтожает ингибитор HPPD и/или глифосат, что обеспечивает возможность технологий нулевой обработки почвы, с последующей посадкой или посевом сои на том же предварительно обработанном поле позднее (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 (традиционным) гербицидом для сои, или смесь ингибитора HPPD с гербицидом, которые является неселективным в отношении сои (например, глифосат или глюфосинат), но к которому у растений имеется ген/локус выносливости, вследствие чего они являются выносливыми к указанному гербициду, могут применяться 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-GM4, 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 свободным от сорняков, уничтожаемых гербицидом, вследствие чего у всходов и растущих растений сои отсутствует конкуренция с сорняками (довсходовое применение гербицида-ингибитора HPPD). Как только растения сои достигают определенного размера, а сорняки начинают вновь появляться, ингибитор HPPD, или смесь ингибитора HPPD с

селективным (традиционным) гербицидом для сои, или смесь ингибитора HPPD с гербицидом, которые является неселективным в отношении сои (например, глифосат или глюфосинат), но к которому у растений имеется ген/локус выносливости, вследствие чего указанные растения являются выносливыми к указанному гербициду, могут применяться 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-GM4, и обработку указанного поля гербицидом-ингибитором HPPD до появления всходов растений из указанного семени, но после посева семян.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растения, содержащие трансгенный объект EE-GM4, могут быть обработаны гербицидом-ингибитором HPPD, таким как IFT, топрамезон или мезотрион, со стороны надземной части растений сои, взошедших из посеянных семян, что очищает поле от сорняков, уничтожаемых ингибитором HPPD, при этом применение можно осуществлять совместно (например, в результате смешивания в опрыскивателе), после или до обработки с помощью селективного (традиционного) послевсходового гербицида для сои, или гербицида, который является неселективным в отношении сои (например, глифосат или глюфосинат), но к которому у растений имеется ген/локус выносливости, вследствие чего указанные растения являются выносливыми к указанному гербициду, со стороны надземной части растений (послевсходовое применение гербицида-ингибитора HPPD (с указанным гербицидом, селективным или неселективным в отношении сои или без него)).

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением растения сои, несущие EE-GM4 (которые также могут содержать другой трансгенный объект/признак выносливости к гербицидам, как описывается в настоящем документе), могут быть обработаны, или семена сои, несущие EE-GM4, могут быть покрыты любым соевым инсектицидом, гербицидом или фунгицидом.

В следующих примерах описано конструирование и идентификация элитного трансгенного объекта EE-GM4, выведение различных линий сои, содержащих данный трансгенный объект, и разработка средств для специфической идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 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 способы полимеразных цепных реакций (ПЦР) можно найти в "McPherson MJ and Möller 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, применение другого способа для получения ДНК или выбор других праймеров в способе ПЦР могут 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-GM4 |
| SEQ ID No. 2: | 3'-пограничная последовательность из EE-GM4 |
| SEQ ID No. 3: | 5'-пограничная последовательность из EE-GM4 |
| SEQ ID No. 4: | 3'-пограничная последовательность из EE-GM4 |
| SEQ ID No. 5: | 5'-участок из EE-GM4 |
| SEQ ID No. 6: | 3'-участок из EE-GM4 |
| SEQ ID No. 7: | кодирующая последовательность <i>cry14Ab-1.b</i> |
| SEQ ID No. 8: | аминокислотная последовательность белка Cry14Ab-1 |
| SEQ ID No. 9: | кодирующая последовательность <i>hppdPf-4Pa</i> |
| SEQ ID No. 10: | аминокислотная последовательность белка HPPD-4 |
| SEQ ID No. 11: | плазида для трансформации pSZ8832 – последовательность между границами T-ДНК |

SEQ ID No. 12:	праймер PRIM0937
SEQ ID No. 13:	праймер PRIM0938
SEQ ID No. 14:	зонд TM1734
SEQ ID No. 15:	праймер SHA071
SEQ ID No. 16:	праймер SHA072
SEQ ID No. 17:	зонд TM1428
SEQ ID No. 18:	праймер PRIM1652
SEQ ID No. 19:	зонд TM2084
SEQ ID No. 20:	праймер PRIM0939
SEQ ID No. 21:	праймер PRIM0940
SEQ ID No. 22:	зонд TM1735
SEQ ID No. 23:	трансгенный объект EE-GM4 сои
SEQ ID No. 24:	5'-пограничная последовательность из EE-GM4
SEQ ID No. 25:	3'-пограничная последовательность из EE-GM4
SEQ ID No. 26:	праймер GLPB173
SEQ ID No. 27:	праймер GLPB175
SEQ ID No. 28:	праймер GLPB167
SEQ ID No. 29:	праймер GLPB170
SEQ ID No. 30:	последовательность прединсерционного локуса

Примеры

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

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

Сою с EE-GM4 разрабатывали с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с применением вектора pSZ8832, содержащего кассеты экспрессии *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b*.

(i) Мутантный ген *hppdPf-4Pa*, который кодирует белок HPPD-4. Кодировочную последовательность *hppdPf-4Pa* разрабатывали путем введения точечных мутаций в положение 335 (замена Glu на Pro), в положение 336 (замена Gly на

Тгр), в положение 339 (замена Lys на Ala) и в положение 340 (замена Ala на Gin) в ДНК, кодирующей белок HPPD, полученный из штамма A32 *Pseudomonas fluorescens*. Экспрессия белка HPPD-4 придает выносливость к гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлутол или мезотрион.

(ii) Ген *cry14Ab-1.b* кодирует белок Cry14Ab-1. Экспрессия белка Cry14Ab-1 придает устойчивость к нематодам, таким как соевая цистообразующая нематода, *Heterodera glycines*.

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* (показана кодирующая нить) представлена под SEQ ID No. 7 и 9 соответственно.

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, содержащая 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> : кодирующая последовательность гена дельта-эндотоксина из <i>Bacillus thuringiensis</i>

3970-5276	В направлении против часовой стрелки	Pubi10At: последовательность, содержащая промоторный участок гена убиквитина-10 из <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, содержащая 3'-нетранслируемый участок транскрипта 35S из вируса мозаики цветной капусты (Sanfaçon et al., 1991, Genes & development, 5(1), 141-149)
5577-5588		Полилинкерная последовательность: последовательность используемая в клонировании
5589-6665	В направлении против часовой стрелки	<i>hppdPf-4Pa</i> : последовательность, кодирующая вариант 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы, полученная из <i>Pseudomonas fluorescens</i>
6666-7037	В направлении против часовой стрелки	TPotpY-I Pf: кодирующая последовательность производного оптимизированного транзитного пептида (в положении 55 замена на Tyr), содержащая последовательность генов малой субъединицы RuBisCO из <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-GM4

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 подвергали самоопылению с получением семени T1. Последующие поколения получали посредством самоопыления или посредством скрещивания с другой зародышевой плазмой сои.

1.2.1 Идентификация элитного трансгенного объекта EE-GM4

Элитный трансгенный объект EE-GM4 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 трансгенных объектов, полученных с использованием одних и тех же химерных генов. Обнаружили, что растения сои, содержащие EE-GM4, имеют вставку трансгенов в одном локусе в геноме растения сои, имеют комплексные агрономические признаки, сходные с родительскими растениями, применяемыми для трансформации, не вызывают потерь урожая, обусловленных вставкой трансформирующей ДНК (в сравнении с соответствующей изогенной линией без трансгенного объекта, такой как "нулевая" линия растений, полученная из трансформированного растения, которые сегрегировали с отсутствием трансгенов), приводят к значимому снижению взрослых самок, заражающих корни, при стандартном анализе с применением SCN в теплице и характеризуются улучшенным урожаем при высоком давлении нематод SCN в поле в сравнении с изогенной нулевой линией, не содержащей EE-GM4. 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-GM4 содержит один трансгенный локус, который содержит одну копию химерного гена *cry14Ab-1.b* и одну копию химерного гена *hppdPf-4Pa*. В EE-GM4 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-GM4 в нескольких поколениях EE-GM4 демонстрирует структурную стабильность трансгенного объекта.

1.2.1.2 Наследование трансгенного объекта

Наследование вставки из вставленной Т-ДНК у последующих поколений путем тестирования генотипа на наличие генов *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b* с помощью ПЦР-анализа показало, что гены *hppdPf-4Pa* и *cry14Ab-1.b*, содержащиеся в пределах вставки EE-GM4, наследовались прогнозируемым образом и, как и ожидалось, в виде одной вставки. Эти данные согласуются с менделевскими принципами и подтверждают вывод о том, что трансгенный объект EE-GM4 состоит из одной вставки, интегрированной в один хромосомный локус в пределах ядерного генома сои.

Кроме того, анализ паттернов сегрегации EE-GM4 в последующих поколениях после интрогрессии EE-GM4 в 5 элитных линий сои подтвердил нормальную менделевскую сегрегацию. В таблице 2 показана наблюдаемая сегрегация EE-GM4 в разных сегрегирующих популяциях.

Таблица 2. Анализ сегрегации EE-GM4

Родительское растение	Поколение	Наблюдали				Статистические показатели		
		НН	Гемизиготные	Нулевые	Всего	Хи-квадрат	Р-значение	Признак
Родительское растение 1	BC2F2	437	863	457	1757	1,00	0,61	ns
Родительское растение 1	BC3F2	101	201	96	398	0,17	0,92	ns
Родительское растение 2	BC2F2	52	127	70	249	2,70	0,26	ns
Родительское растение 2	BC3F2	14	41	28	83	4,73	0,09	ns
Родительское растение 3	BC2F2	41	76	32	149	1,15	0,56	ns

Родительское растение 3	BC3F2	21	31	20	72	1,42	0,49	ns
Родительское растение 4	F2	185	393	203	781	0,86	0,65	ns
Родительское растение 5	BC2F2	63	143	87	293	4,10	0,13	ns

В таблице 2 "НН" обозначает гомозиготные растения, "Гемизиготные" - гемизиготные растения, а «нулевые» - нуль-сегреганты, утратившие EE-GM4, а «ns» - отсутствие статистической значимости (в отношении любого отклонения от нормальной/ожидаемой сегрегации). В данных испытаниях родительским растением 1 была линия MG VI с признаками устойчивости к SCN, *Rhg1* и *Rhg4*, 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 признаком устойчивости к SCN, *Rhg1*, а родительским растением 5 была линия MG I, восприимчивая к SCN.

1.2.1.3. Стабильность экспрессии белка

Уровни белковой экспрессии для белков HPPD-4 и Cry14Ab-1 у растений, выращенных в теплице, определяли с помощью сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в образцах листьев, корней и семян, собранных из различных поколений (например, T4, T6 и BC2F3) сои с EE-GM4. Белки HPPD-4 и Cry 14Ab-1 проявляли сходные средние уровни экспрессии в листе, корнях и семенах у всех протестированных поколений. Любого отличия, наблюдаемые в концентрациях Cry14Ab-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 EE-GM4, в исходном генетическом фоне для трансформации (Thorne) сравнивали с сегрегирующими нуль-сегрегантами (без EE-GM4) 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. Не наблюдали никаких отличий, воздействующих на агрономическую характеристику биологически значимым образом, между растениями, содержащими трансгенный объект, и нуль-сегрегантами (без EE-GM4) при выращивании в сопоставимых испытаниях в разных местах, в случае проверки качественных характеристик растения, таких как цвет цветка, цвет боба, цвет семян и опушение, и количественных характеристик, таких как

урожайность, высота, полегание, травостой и дни до созревания. Следовательно, растения, содержащие EE-GM4, показали нормальные агрономические характеристики, сопоставимые с соответствующими нетрансгенными растениями.

Дополнительные испытания с EE-GM4 в исходном генетическом фоне для трансформации Thorne проводили в 2017 году. Предварительные испытания, в которых EE-GM4 находился в элитных генетических фонах MG1 и MG3, также проводили в ограниченном количестве участков в 2017 году. При проверке качественных характеристик растения, таких как цвет цветка, цвет боба, цвет семян и опушение, и количественных характеристик, таких как урожайность, высота, полегание, травостой, натурный вес и дни до созревания, у растений с EE-GM4 обнаружили небольшую задержку (0,8 дня) созревания, при этом никаких агрономически значимых отличий не наблюдали между растениями, содержащими трансгенный объект, и нуль-сегрегантами (без EE-GM4) при любом из трех генетических фонов, что подтверждает то, что растения, содержащие EE-GM4, демонстрировали нормальные агрономические характеристики.

Выносливость растений, содержащих EE-GM4, к гербицидам-ингибиторам HPPD тестировали в разных местах в поле на протяжении 2-х лет. В данных испытаниях было установлено, что растения с EE-GM4 характеризовались коммерчески соответствующей выносливостью к изоксафлутолу (IFT) при применении до появления всходов, но повреждение культуры было немного более высоким в случае послевсходового применения IFT. Эти испытания также показали, что растения, содержащие трансгенный объект EE-GM4, имели коммерчески значимую выносливость к мезотриону (MST) при применении до появления всходов или при применении 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 максимальной фитотоксичности (повреждения растений), зарегистрированных в случае обработки гербицидами в нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет, для растений сои, содержащих трансгенный объект EE-GM4, по сравнению с нетрансформированными/обычными растениями сои (Thorne). Для контрольных нетрансформированных растений Thorne в таких же испытаниях были показаны средние значения максимальной фитотоксичности, составляющие приблизительно 80-90%, что показывает, что соя (без GM) не выносит данные гербициды-ингибиторы HPPD. "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 случае существующих применений для контроля сорняков нормальная (1х) доза изоксафлутола (IFT) при довсходовом или послевсходовом применении и MST при послевсходовом применении составляет 105 г/га, а нормальная (1х) доза мезотриона при довсходовом применении составляет 210 г/га. Следовательно, в данных испытаниях, представленных на фиг. 5, применения, используемые до появления всходов на фиг. 5 (420 г/га для IFT, 840 г/га для мезотрион) 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.

Также в нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет растения сои с трансгенным объектом EE-GM4 характеризовались хорошей выносливостью 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 применении до появления всходов из расчета 400 г а.и./га или после появления всходов из расчета 200 г а.и./га соответственно (среднее значение максимальной фитотоксичности для каждой обработки было ниже 20%). В данных испытаниях растения сои с трансгенным объектом EE-GM4 продемонстрировали выносливость к экспериментальному соединению, 2-хлор-3-(метилсульфанил)-N-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-4-(трифторметил)бензамиду (патент США № 8481749) при применении после появления всходов из расчета 100-150 г а.и./га, но среднее значение максимальной фитотоксичности, составлявшее 30%, было немного выше, чем в случае других ингибиторов HPPD. Все обработки после появления всходов проводили на стадии V2 - V3 с добавлением вспомогательных средств, масляного концентрата и сульфата аммония для повышения активности гербицидов.

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 применением гербицида изоксафлутола в тех же дозировках до появления или после появления всходов растений с EE-GM4, но в другом географическом месте.

1.2.1.5. Устойчивость к нематоде

Стандартные анализы с применением SCN в теплице продемонстрировали значимое снижение числа цист SCN на корнях растений, содержащих EE-GM4, в сравнении с растениями сои Thorne дикого типа. Кроме того, стандартные

анализы SCN с измерением индекса самок в теплице также показали, что растения сои, содержащие трансгенный объект EE-GM4 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-GM4. Когда EE-GM4 интрогрессировали в элитную линию сои с признаком устойчивости сои PI88788 (группа созревания 3) или в элитную линию сои с признаком устойчивости сои Peking (группа созревания 6.2), постоянно наблюдали уменьшение числа цист SCN на корнях в сравнении с корнями растений только с нативным признаком устойчивости.

В нескольких полевых испытаниях в течение 2 лет в нескольких местах растения сои, содержащие EE-GM4, давали значимое увеличение урожая в сравнении с изогенными нуль-сегрегантами в полях с естественным заражением SCN. На фигуре 6 показан урожай зерна растений с EE-GM4 в исходном генетическом фоне для трансформации (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 исследования с растениями с EE-GM4 в исходном генетическом фоне для трансформации (Thorne) проводили в 2017 году в общей сложности в 12 местах с варьирующим (естественным) давлением SCN. Во всех этих 12 испытаниях растения, содержащие EE-GM4, давали в среднем на 8% более высокие урожаи, чем нуль-сегреганты без EE-GM4 ($p = 0,02$). На фиг. 7 показан урожай зерна EE-GM4 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 линию MG I тестировали в тех же двух местах (каждое снова с высокими уровнями заражения SCN) и в дополнительном местоположении в Висконсине (последнее характеризовалось умеренным давлением SCN), и урожай зерна у растений, содержащий EE-GM4, постоянно был выше, чем у соответствующих нуль-сегрегантов без EE-GM4. Наконец, в предварительных исследованиях в трех местах с умеренным-сильным давлением SCN в Бразилии в испытаниях с поздней посадкой в 2017 году продемонстрировано значимое среднее повышение, составляющее 29% ($p=0,002$), у восприимчивой элитной линии растений с EE-GM4 в сравнении с нуль-сегрегантами (без EE-GM4). 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 значимое и визуально заметное увеличение урожая у растений с EE-GM4. Следовательно, трансгенный объект EE-GM4 обеспечивает значимое увеличение урожая растений сои на полях, зараженных SCN.

В предварительном исследовании для оценки влияния трансгенного объекта EE-GM4 на урожай при комбинации с нативным признаком устойчивости к SCN серию популяций F3 получали за счет однократного скрещивания EE-GM4 с элитной традиционной линией MG III, несущей ген устойчивости *rhg1* из PI88788. В популяциях F3 одну 'пакетированную' популяцию, которая была гомозиготной как по трансгенному объекту EE-GM4, так и по аллелю *rhg1*, сравнивали с популяцией, гомозиготной только по аллелю *rhg1* (без EE-GM4). Предварительные испытания на урожайность проводили с данными популяциями в 2016 году в трех местах с умеренным-сильным заражением SCN. Во всех трех местах 'пакетированная' популяция (растения, гомозиготные по трансгенному объекту EE-GM4 и аллелю *rhg1*) давали на 8% большие урожаи, чем популяция, несущая только аллель *rhg1* ($p=0,05$). Данные результаты показывают предварительные признаки того, что добавление трансгенного объекта к сортам с традиционным признаком устойчивости к SCN может увеличивать урожаи при умеренных-высоких уровнях давления 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 осуществляли с растениями, содержащими EE-GM4, проводили на поле 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. Число рядов на делянку и длина делянки варьировали от одного места к другому, исходя из размера поля и конфигураций 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 изменчивости типа почвы или популяций SCN, что является обычным явлением на полях, зараженных SCN. В полевых испытаниях с SCN растения, содержащие EE-GM4, высаживали на субделянке рядом или очень близко к составляющей пару субделянке, содержащей растения, являющиеся нуль-сегрегантами (без EE-GM4). Тесная близость двух делянок помогает минимизировать влияние изменчивости (SCN) в поле на оценку разницы между растениями с трансгенным объектом EE-GM4 и без него. Большинство испытаний воспроизводили четыре раза, но некоторые воспроизводили три раза, а некоторые воспроизводили пять или шесть раз.

Также, в 2016 году в двух местах (Индиана и Айова) с умеренным-тяжелым заражением, где проводили полевое тестирование растений с EE-GM4, наблюдали синдром внезапной смерти (SDS). Делянки в данных двух местах оценивали по частоте возникновения и тяжести симптомов SDS и индекс болезни (DX) SDS, рассчитывали с применением "способа SIUC для подсчета SDS" (www.scnresearch.info/462.pdf). Оценки DX у растений, гомозиготных по трансгенному объекту EE-GM4, были на 43% ниже в Индиане и на 33% ниже в Айове, чем у восприимчивого нуль-сегреганта (без EE-GM4), что указывает на то, что трансгенный объект обеспечивал защиту от инфекции SDS. SDS и SCN зачастую тесно ассоциированы в полевых условиях и будут демонстрировать некоторую взаимосвязь у растения (см., например, www.soybeanresearchinfo.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 с растениями с EE-GM4 (и их нуль-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. 10 показаны средние значения оценок IDC для растений с трансгенным объектом EE-GM4 и соответствующих им нуль-сегрегантов (без EE-GM4) для трех генетических фонов (1 устойчивый к SCN (устойчивость PI88788), 1 восприимчивый к SCN и восприимчивый к SCN генетический фон Thorne). Более низкие баллы IDC обнаружили у растений, содержащий EE-GM4, в сравнении с их нуль-сегрегантами. Следовательно, EE-GM4 может снижать тяжесть IDC для листьев в полевом испытании, где растения сои подвергали заражению как SCN, так и IDC.

Кроме того, семена нетрансформированных растений Thorne и растений с EE-GM4 проращивали и высаживали в теплицу для проверки контроля ранящей нематоды *Pratylenchus brachyurus*. Нематоды *Pratylenchus brachyurus* (1500/растение, разные стадии развития) вносили на растения 2-недельного возраста. Через 30 дней после внесения нематод *Pratylenchus* извлекали из корней и подсчитывали. Среднее количество нематод, выявленных в корнях растений, содержащих EE-GM4, сравнивали со средним количеством нематод *Pratylenchus*, выявленных в корнях растений Thorne дикого типа. В корнях растений, содержащий EE-GM4, обнаружили среднее на приблизительно 80-90% меньше нематод *Pratylenchus* по сравнению с контрольными корнями Thorne, что указывает на значимый контроль ранящих нематод под действием трансгенного объекта EE-GM4 сои.

На фигуре 8 показаны результаты анализа в теплице с применением *Pratylenchus brachyurus* в США, сравнивающего элитные линии с EE-GM4 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 линиями сои из США. Растения сои выращивали в маленьких конических горшочках и выдерживали в теплицах с температурой от 25 до 32°C. Нематод *Pratylenchus brachyurus*, полученных из Южной Каролины и выращенных 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 нематод 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-GM4 демонстрировали приблизительно 85% контроль *Pratylenchus*.

На фигуре 9 показаны результаты анализа в теплице с применением *Pratylenchus brachyurus* в Бразилии, сравнивающего растения сои с EE-GM4 с бразильскими линиями сои, у которых отсутствует устойчивость, и 1 линией, характеризующейся низким Rf, а также растениями, восприимчивыми и устойчивыми к SCN. Линии сои выращивали в маленьких конических горшочках и выдерживали в теплицах с температурой от 25 до 32°C. Нематод *Pratylenchus brachyurus*, полученных из полей Бразилии и выращенных 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 нематод и яйца извлекали из корней и подсчитывали. Показаны

результаты одного эксперимента. Одна бразильская линия сои (BRS 7380), обозначенная как характеризующаяся низким репродуктивным фактором для *Pratylenchus*, показала приблизительно 89% снижение *Pratylenchus*. Растения с EE-GM4 приводили к ~97% контролю *Pratylenchus*. Линии сои, которые несли нативный признак устойчивости к SCN (*rhg1 + Rhg4*), не приводили к контролю *Pratylenchus brachyurus*.

Кроме того, растения, содержащие EE-GM4, можно использовать для контроля галловых нематод (RKN), таких как *Meloidogyne incognita*. Несмотря на то, что популяция *Meloidogyne incognita* не достаточно хорошо заражает сою Thorne дикого типа, для растений Thorne с EE-GM4 продемонстрировано дополнительное снижение среднего значения число яиц RKN/корневая масса в сравнении с нетрансформированными растениями Thorne.

1.2.2. Идентификация фланкирующих участков и вставленной Т-ДНК элитного трансгенного объекта EE-GM4

Последовательность участков, фланкирующих вставленную Т-ДНК, и Т-ДНК, смежная с ними, в элитном трансгенном объекте EE-GM4 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-GM4 секвенировали, и его нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID No. 5, нуклеотиды 1-227. 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, состоит из геномных последовательностей сои, соответствующих последовательности прединсерционного локуса (SEQ ID No. 5, нуклеотиды 1-227). 5'-пограничный участок, содержащий часть последовательности вставленной Т-ДНК и часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, смежную с ней, представлена под SEQ ID No. 1 и 3.

1.2.2.2. 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК

Фрагмент, идентифицированный как содержащий 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, из EE-GM4, секвенировали, и его нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID No. 6, нуклеотиды 254-501. Данный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, состоит из геномных последовательностей сои, соответствующих последовательности прединсерционного локуса (SEQ ID No. 6, нуклеотиды 254-501). 3'-пограничный участок, содержащий часть последовательности вставленной Т-ДНК и часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, смежную с ней, представлена под SEQ ID No. 2 и 4.

1.2.2.3. Вставленная Т-ДНК из EE-GM4

Вставленную Т-ДНК, смежную с вышеупомянутой 5'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, секвенировали, и ее нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID No. 5, нуклеотиды 228-398. Также вставленную Т-ДНК, смежную с вышеупомянутой 3'-последовательностью, фланкирующей Т-ДНК, секвенировали, и ее нуклеотидная последовательность представлена под SEQ ID No. 6, нуклеотиды 1-253. Во время трансформации 970 п.о. геномной ДНК в последовательности прединсерционного локуса удаляли и их замещали вставленной Т-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 *cry14Ab-l.b* (содержащая промотор Ubi10 и 3'-нетранслируемый участок 35S) представлена под SEQ ID No. 11, нуклеотиды 131-5276 (в направлении против часовой стрелки). Последовательность вставленной Т-ДНК в фланкирующем 5'-участке в SEQ ID No. 5 (нуклеотиды 228-398) идентична нуклеотидной последовательности от нуклеотида 17 до нуклеотида 187 из SEQ ID No. 11, и последовательность вставленной Т-ДНК в фланкирующем 3'-участке в SEQ ID No. 6 (нуклеотиды 1-253) идентична нуклеотидной последовательности от нуклеотида 7369 до нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11. Следовательно, 5'-конец Т-ДНК, вставленной в EE-GM4, соответствует нуклеотиду 17 в последовательности трансформационной плазмиды под SEQ ID No. 11, а 3'-конец Т-ДНК, вставленной в EE-GM4, соответствует нуклеотиду 7621 в последовательности трансформационной плазмиды под SEQ ID No. 11. Т-ДНК, вставленная в EE-GM4 между последовательностью под SEQ ID No. 5 и последовательностью под SEQ ID No. 6, содержится в семени, депонированном в ATCC под номером доступа PTA-123624, и характеризуется последовательностью по сути сходной или идентичной последовательности от нуклеотида 188 до нуклеотида 7368 из SEQ ID No. 11.

Прединсерционный локус для трансгенного объекта EE-GM4 может быть определен на основании сои дикого типа сорта Thorne, исходя из 5'- и 3'-последовательностей, фланкирующих Т-ДНК, приведенных в настоящем документе (от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 и от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6) с помощью способов, известных из уровня техники. Последовательность прединсерционного локуса в геноме сои соответствует следующим последовательностям по порядку: от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5, делеция 970 нуклеотидов, и от положения нуклеотида 254 до положения нуклеотида 501 из

SEQ ID No. 6. Полная последовательность прединсерционного локуса приведена в SEQ ID No. 30, где нуклеотиды 1-1000 представляют собой фланкирующие 5'-геномные последовательности, нуклеотиды 1001-1970 представляют собой делецию целевого сайта, а 1971-2970 представляют собой фланкирующие 3'-геномные последовательности.

1.2.3. Подтверждение фланкирующих участков и вставленной Т-ДНК элитного трансгенного объекта ЕЕ-GM4

ПЦР-амплификация с применением праймеров, нацеленных на растительную ДНК, расположенную в 5'-направлении и в 3'-направлении от вставленной Т-ДНК, и на вставленную Т-ДНК в ЕЕ-GM4, подтверждала и приводила к удлинению фланкирующих 5'- и 3'-последовательностей.

1.2.3.1. Реакция, специфическая в отношении 5'-пограничной последовательности из ЕЕ-GM4

Конструировали два праймера, GLPB173 и GLPB167, для амплификации ампликона из примерно 5059 п.о., охватывающего пограничный участок 5'-последовательности, фланкирующий Т-ДНК, с фрагментом вставки Т-ДНК трансгенного объекта ЕЕ-GM4. Последовательность праймера GLPB173 происходит из эталонной последовательности сои *Glycine max* Williams 82.a2.v1.

Прямой праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, ЕЕ-GM4:

GLPB173 5'- СТTCATCTCCCCgTTAAAgTg -3' (SEQ ID No. 26)

Обратный праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК ЕЕ-GM4:

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

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

5	мкл	буфер II для ПЦР AccuPrime™ (Thermo Scientific)
2	мкл	прямой праймер (10 пмоль/мкл)
2	мкл	обратный праймер (10 пмоль/мкл)
0,75	мкл	ДНК-полимераза Taq с высокой точностью воспроизведения от AccuPrime™ (2 Ед/мкл; Thermo Scientific)

50 нг ДНК-матрица
Вода не более 50 мкл

Условия термоциклирования для реакции с 5'-пограничной последовательностью:

	Время	Температура
	1 мин	94°C
Затем:	30 с	94°C
	30 с	57°C
	7 мин	68°C
	В течение 30 циклов	
Затем:	10 мин	4°C
	Постоянно	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.

1.2.3.2. Реакция, специфическая в отношении 3'-пограничной последовательности из EE-GM4

Конструировали два праймера, GLPB170 и GLPB175, для амплификации ампликона из примерно 5141 п.о., охватывающего пограничный участок фрагмента вставки Т-ДНК трансгенного объекта EE-GM4 с фланкирующей 3'-последовательностью Т-ДНК. Последовательность праймера GLPB175 происходит из эталонной последовательности *Glycine max* Williams 82.a2.v1.

Прямой праймер, нацеленный на вставленную последовательность Т-ДНК EE-GM4:

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

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM4:

GLPB175 5'- gTTgTCAACAATgACCAgAAg -3' (SEQ ID No. 27)

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

5	мкл	буфер II для ПЦР AccuPrime™(Thermo Scientific)
2	мкл	прямой праймер (10 пмоль/мкл)

2	мкл	обратный праймер (10 пмоль/мкл)
0,75	мкл	ДНК-полимераза Taq с высокой точностью воспроизведения от AccuPrime™ (2 Ед/мкл; Thermo Scientific)
50	нг	ДНК-матрица
Вода не более 50 мкл		

Условия термоциклирования для реакции с 3'-пограничной последовательностью:

	Время	Температура
	1 мин	94°C
Затем:	30 с	94°C
	30 с	57°C
	7 мин	68°C
	В течение 30 циклов	
Затем:	10 мин	4°C
	Постоянно	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-GM4 и удлиненные 5'- и фланкирующие 3'-последовательности, которые показаны в SEQ ID No. 23. 5'-последовательность, фланкирующая Т-ДНК, в SEQ ID No. 23 занимает от положения нуклеотида 1 до положения нуклеотида 1058 (соответствуют геномным последовательностям прединсерционного локуса), последовательность вставленной Т-ДНК занимает от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 и 3'-последовательность, фланкирующая Т-ДНК, в SEQ ID No. 23 занимает от положения нуклеотида 8664 до положения нуклеотида 9749 (соответствуют геномным последовательностям прединсерционного локуса).

2. Разработка протоколов идентификации EE-GM4

2.1. Способ граничных точек для анализа идентичности EE-GM4

В этом способе описан способ выявления с помощью полимеразной цепной реакции с целью анализа присутствия специфических для трансгенного объекта EE-GM4 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 термоциклирования, 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 используется химия Taqman для амплификации и выявления двух целевых последовательностей: реакция, специфическая в отношении EE-GM4, определяет присутствие трансгенного объекта, реакция, специфическая в отношении таксона, валидирует отрицательные результаты реакции, специфической в отношении трансгенного объекта.

2.1.1.1. Реакция, специфическая в отношении EE-GM4

Конструировали два праймера, PRIM0937 и PRIM0938, для амплификации ампликона из 126 п.о., охватывающего пограничный участок фланкирующей 3'-последовательности с фрагментом вставки Т-ДНК трансгенного объекта EE-GM4.

Конструировали зонд, TM1734, 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-GM4:

PRIM0937 5'- gAgACTgTATCTTTgATATTTTggAgTAga -3' (SEQ ID No. 12)

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM4:

PRIM0938 5'- CTgAgTCgATCAAAACCAATCAAT -3' (SEQ ID No. 13)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК ЕЕ-GM4 и ее фланкирующей 3'-последовательностью:

TM1734 FAM 5'- AAgTgTgTCgTgCTCCACCAgTTATCACA -3' BHQ1 (SEQ ID No. 14)

2.1.1.2. Специфическая реакция, специфическая в отношении таксона

Конструировали два праймера, SHA071 и SHA072, для амплификации ампликона из 74 п.о. последовательности эндогенного гена лектина 1 сои.

Конструировали зонд, TM1428, с использованием JOE в качестве флуоресцентной метки и BHQ1 в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена лектина 1:

SHA071 5'- CCAgCTTCgCCgCTTCCTTC -3' (SEQ ID No. 15)

Обратный праймер, нацеленный на последовательность эндогенного гена лектина 1:

SHA072 5'- gAAggCAAgCCCATCTgCAAgCC -3' (SEQ ID No. 16)

Зонд, нацеленный на последовательность эндогенного гена лектина 1:

TM1428 JOE 5'- CTTCACCTTCTATgCCCCTgACAC -3' BHQ1 (SEQ ID No. 17)

2.1.2. Состав реакционной смеси

5,0	мкл	2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
0,5	мкл	PRIM0937 [10 пмоль/мкл]
0,5	мкл	PRIM0938 [10 пмоль/мкл]
0,5	мкл	SHA071 [10 пмоль/мкл]
0,5	мкл	SHA072 [10 пмоль/мкл]
0,1	мкл	TM1734 [10 пмоль/мкл]
0,1	мкл	TM1428 [10 пмоль/мкл]
x	мкл	ДНК-матрица (20 нг*)
Вода не более 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 меченые зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies
- * Количество ДНК-матрицы на реакцию может варьировать, но должно быть подтверждено

2.1.3. Условия термоциклирования

	<u>Время</u>	<u>Температура</u>
	5 мин	95°C
Затем:	3 с	95°C
	30 с	60°C
	В течение 35 циклов	
Затем:	Постоянно 10°C	

Примечания:

- Условия термоциклирования валидировали для применение на термоциклере 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	517 нм ± 5 нм
JOE	530 нм ± 5 нм	555 нм ± 5 нм
ROX	581 нм ± 5 нм	607 нм ± 5 нм

Примечания:

- Настройки длины волны и ширины спектрального интервала валидировали для применения на планшет-ридере Tecan M1000. Могут быть использованы другое оборудование и настройки, но их эффективность должна быть подтверждена.

2.1.5. Контрольные образцы

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

- положительный контроль: образец ДНК, содержащий целевую и эндогенную последовательности;
- отрицательный контроль: образец ДНК, содержащий только эндогенную последовательность;
- контроль без матрицы: образец, содержащий воду (без ДНК).

2.1.6. Анализ данных

- Для всех образцов рассчитывали отношение флуоресценции "сигнал-фон" (S/B) как для реакции с целевой, так и для реакции с эндогенной последовательностью.
- Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.:
 - положительный контроль должен иметь оценку "выявленный";
 - положительный контроль должен иметь оценку "невыявленный";
 - контроль без матрицы должен демонстрировать только уровни флуоресценции фона.
- Образец оценивали следующим образом:
 - выявленный: S/B целевой последовательности и S/B эндогенной последовательности превышают приемлемое пороговое соотношение, например 2;
 - невыявленный: S/B целевой последовательности ниже приемлемого порогового соотношения, например 1,3, и, кроме того, S/B эндогенной последовательности превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2;
 - неопределенный: S/B целевой и эндогенной последовательности ниже приемлемого порога, например 1,3.

На фигуре 2 показан пример результата способа для ряда образцов сои, содержащих EE-GM4, и обычных образцов сои. Для каждого образца показаны соотношения S/B как для реакции, специфической в отношении EE-GM4, так и для реакции с эндогенной последовательностью.

2.2. Способ граничных точек для анализа идентичности и зиготности EE-GM4

В этом способе описан способ выявления с помощью полимеразной цепной реакции с целью анализа присутствия и статуса зиготности специфических для трансгенного объекта EE-GM4 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 представлены реакционные реагенты, последовательности олигонуклеотидных праймеров и зонда, состав реакционной смеси, условия термоциклирования, 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 характеристики способа для анализа зиготности могут зависеть от сорта, что обусловлено природой последовательности прединсерционного локуса. Следовательно, проверка продуктивности требуется для каждого сорта, в который интрогрессируют трансгенный объект. Для случаев неадекватных характеристик можно применять альтернативный способ ПЦР в режиме реального времени на основе анализа числа копий. Например, в таком анализе числа копий может использоваться химия Taqman и принципы ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки относительного числа копий специфической для EE-GM4 последовательности. Альтернативный способ, как правило, будет предусматривать реакцию, специфическую в отношении EE-GM4, для количественной оценки числа копий EE-GM4, и реакцию, специфическую в отношении таксона, для нормализации числа копий EE-GM4. Образцы, содержащие последовательность вставки EE-GM4 в гомозиготном состоянии, будут иметь относительное число копий, которое в два раза превышает таковое у гемизиготных образцов. В азиготных образцах при таком способе последовательность EE-GM4 амплифицироваться не будет.

2.2.1. Схема способа

В способе используется химия Taqman для амплификации и выявления двух целевых последовательностей: реакция, специфическая в отношении GM4, определяет присутствие трансгенного объекта, реакция, специфическая в отношении прединсерционного локуса, определяет присутствие прединсерционного локуса трансгенного объекта.

Выявление только специфической для EE-GM4 последовательности указывает на присутствие трансгенного объекта EE-GM4 в гомозиготном статусе зиготности.

Выявление специфической для EE-GM4 и специфической для прединсерционного локуса последовательности указывает на присутствие трансгенного объекта EE-GM4 в гемизиготном состоянии зиготности.

Выявление только специфической для прединсерционного локуса последовательности указывает на отсутствие трансгенного объекта EE-GM4.

2.2.1.1. Реакция, специфическая в отношении EE-GM4

Конструировали два праймера, PRIM0937 и PREVI0938, для амплификации ампликона из 126 п.о., охватывающего пограничный участок 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, с фрагментом вставки Т-ДНК трансгенного объекта EE-GM4.

Конструировали зонд TM1734 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-GM4:

PRIM0937 5'- gAgACTgTATCTTTgATATTTTTggAgTAga -3' (SEQ ID No. 12)

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM4:

PRIM0938 5'- CTgAgTCgATCAAAACCAATCAAT -3' (SEQ ID No. 13)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК EE-GM4 и ее фланкирующей 3'-последовательностью:

TM1734 FAM 5'- AAgTgTgTCgTgCTCCACCAgTTATCACA -3' BHQ1 (SEQ ID No. 14)

2.2.1.2. Реакция, специфическая в отношении прединсерционного локуса

Конструировали два праймера, PRIM 1652 и PRIM0938, для амплификации ампликона из 108 п.о., охватывающего границу прединсерционного локуса и фланкирующей 3'-последовательности прединсерционного локуса EE-GM4.

Конструировали зонд MGB, TM2084, с использованием VIC в качестве флуоресцентной метки и MGB-NFQ в качестве гасителя для выявления амплифицированной последовательности.

Прямой праймер, нацеленный на последовательность прединсерционного локуса EE-GM4:

PRIM1652 5'- gAgAAgTTTCAATACTAATAgTATCAATACTCAgAAT -3' (SEQ ID No. 18)

Обратный праймер, нацеленный на 3'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM4:

PRIM0938 5'- CTgAgTCgATCAAAACCAATCAAT -3' (SEQ ID No. 13)

Зонд дикого типа, нацеленный на границу между прединсерционным локусом и фланкирующей 3'-последовательностью:

TM2084 VIC 5'- CgAgTATTAgCCATATTTA -3' MGB-NFQ (SEQ ID No. 19)

2.2.2. Состав реакционной смеси

5,0	мкл	2x PerfeCta qPCR FastMix II, ROX
0,4	мкл	PRIM1652 [10 пмоль/мкл]
0,4	мкл	PRIM0938 [10 пмоль/мкл]
0,1	мкл	PRIM0937 [10 пмоль/мкл]
0,2	мкл	TM2084 [10 пмоль/мкл]
0,05	мкл	TM1734 [10 пмоль/мкл]
x	мкл	ДНК-матрица (20 нг*)
Вода не более 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 меченые зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies
- * Количество ДНК-матрицы на реакцию может варьировать, но должно быть подтверждено

2.2.3. Условия термоциклирования

	<u>Время</u>	<u>Температура</u>
	5 мин	95°C
Затем:	3 с	95°C
	30 с	60°C
	В течение 35 циклов	
Затем:	Постоянно	10°C

Примечания:

- Условия термоциклирования валидировали для применения на термоциклере BIORAD C1000. Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена.

2.2.4. Настройки длины волны и ширины спектрального интервала

	Возбуждение	Испускание
FAM	495 нм $\pm$ 5 нм	517 нм $\pm$ 5 нм
JOE	530 нм $\pm$ 5 нм	555 нм $\pm$ 5 нм
ROX	581 нм $\pm$ 5 нм	607 нм $\pm$ 5 нм

Примечания:

- Настройки длины волны и ширины спектрального интервала валидировали для применения на планшет-ридере Tecan M1000. Могут быть использованы другое оборудование и настройки, но их эффективность должна быть подтверждена.

2.2.5. 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, содержащий воду.

2.2.6. Анализ данных

- Для всех образцов рассчитывали отношение флуоресценции "сигнал-фон" (S/B) как для реакции с целевой последовательностью, так и для реакции с последовательностью прединсерционного локуса.
- Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.:
 - гомозиготный контроль должен иметь оценку "гомозиготный";
 - гемизиготный контроль должен иметь оценку "гемизиготный";
 - типа контроль дикого типа должен иметь оценку "дикий тип";
 - контроль без матрицы должен демонстрировать только уровни флуоресценции фона.
- Образец оценивали следующим образом:
 - гомозиготный: S/B целевой последовательности превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2, и S/B последовательности прединсерционного локуса ниже приемлемого порогового соотношения, например 1;

- гемизиготный: S/B как целевой последовательности, так и последовательности прединсерционного локуса превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2;
- дикого типа: S/B целевой последовательности ниже приемлемого порогового соотношения, например 1, и S/B последовательности прединсерционного локуса превышает приемлемое пороговое соотношение, например 2;
- неопределенные: S/B целевой последовательности и последовательности прединсерционного локуса ниже приемлемого порога, например 1.

На фигуре 3 показан пример результата применения способа в отношении серии образцов сои, содержащей EE-GM4 в гомозиготном состоянии, образцов сои, содержащих EE-GM4 в гемизиготном состоянии, и обычных образцов сои.

2.3. Способ ПЦР в режиме реального времени для анализа присутствия EE-GM4 на низком уровне

В способе описан способ выявления с целью анализа присутствия на низком уровне последовательности ДНК трансгенного объекта EE-GM4, полученной из подвергнутых обработке растительных материалов (например, лист или семя) или обработанных материалов (например, пищевые или кормовые продукты, полученные из обработанного зерна сои, содержащий ДНК EE-GM4) с применением стандартных процедур экстрагирования ДНК.

В описании способа представлены реакционные реагенты, последовательности олигонуклеотидного праймера и зонда, а также условия термоциклирования, 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 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 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 присутствие трансгенного объекта на низком уровне определяют на основании соотношения разделенных образцов ДНК, выявленных

положительными и отрицательными в отношении последовательности трансгенного объекта.

2.3.1. Схема способа

В способе используют химию Taqman и принципы ПЦР в режиме реального времени для выявления или количественного определения низких уровней EE-GM4 в образце ДНК.

Конструировали два праймера, PRIM0939 и PRIM0940, для амплификации ампликона из 90 п.о., охватывающего пограничный участок 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, с фрагментом вставки Т-ДНК для трансгенного объекта EE-GM4.

Конструировали зонд TM1735 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-GM4:

PRIM0939 5'- CCATTgTgCTgAATAggTTTATAgCT -3' (SEQ ID No. 20)

Обратный праймер, нацеленный на 5'-последовательность, фланкирующую Т-ДНК, EE-GM4:

PRIM0940 5'- gACAAATACTACTTTgTTAAgTTTAgACCCC -3' (SEQ ID No. 21)

Зонд, нацеленный на границу между Т-ДНК EE-GM4 и ее фланкирующей 5'-последовательностью:

TM1735 FAM 5'- TgATAgAgCgCCTgggCCTAACTTTCTAAA -3' BHQ-1 (SEQ ID No. 22).

2.3.2. Состав реакционной смеси

10,0	мкл	2x PerfeCta qPCR Fastmix II, Low ROX
0,5	мкл	PRIM0939 [10 пмоль/мкл]
0,5	мкл	PRIM0940 [10 пмоль/мкл]
0,5	мкл	TM1735 [10 пмоль/мкл]
х	мкл	ДНК-матрица (200 нг*)
Вода не более 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.
- Праймер и меченые зонды заказывали в компании Integrated DNA Technologies.
- * Количество ДНК-шаблона на реакцию может варьировать, но должно быть подтверждено.

2.3.3. Условия термоциклирования

	<u>Время</u>	<u>Температура</u>
	5 мин	95°C
Затем:	3 с	95°C
	30 с	60°C**
	В течение 40 циклов	

Примечания:

- ** Считывание флуоресценции проводят в каждом цикле после окончания стадии удлинения праймера при 60°C.
- Условия термоциклирования валидировали для использования на устройстве для ПЦР в режиме реального времени VUA7 и Quantstudio 7. Может быть использовано другое оборудование, но его эффективность должна быть подтверждена.

2.3.4. Специфический для таксона способ

Способ выявления с помощью ПЦР в режиме реального времени, нацеленный на эндогенную последовательность, должен проводиться одновременно с идентичным количеством ДНК-матрицы, 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 в отношении целевой последовательности.

2.3.5. Тестируемые образцы, калибровочные образцы и контрольные образцы

- Рекомендуются, чтобы все тестируемые образцы анализировались в двух повторностях.
- Набор калибровочных образцов включен в эксперимент для получения стандартных кривых в способе, специфическом как для целевой последовательности, так и для таксона.
- Кроме того, следующие контрольные образцы включают:

- положительный контроль: образец ДНК, содержащий целевую последовательность на уровне предела выявления;
- отрицательный контроль: образец ДНК, содержащий только эндогенную последовательность (без EE-GM4);
- контроль без матрицы: образец, содержащий воду.

2.3.6. Анализ данных

- Для всех образцов значения порогового цикла (т. е. C_t -значения) определяли как для специфического для целевой последовательности способа, так и для специфического для таксона способа. Пороговый цикл определяют как количество циклов, при котором график амплификации для данного образца достигает определенно порога сигнала (см. фигуру ниже).
- Формулы стандартной кривой рассчитывают как для специфического для целевой последовательности способа, так и для специфического для таксона способа, с применением C_t -значений и количества копий генома в калибровочных образцах.
- Параметры стандартной кривой должны соответствовать критериям приемлемости в отношении наклона и линейности (R^2) кривой, например,
 - $-3,2 < \text{наклон} < -3,6$;
 - $R^2 > 0,98$.
- Для всех образцов число копий генома для способа с целевой и эндогенной последовательностью рассчитывают с применением линейный регрессионного анализа.
- Количество присутствия на низком уровне относительно общего количества специфической для таксона ДНК определяли путем расчета % соотношения числа копий генома для способа, специфического как для целевой последовательности, так и для мишени.
- Контрольные образцы должны давать ожидаемый результат, т. е.:
 - положительный контроль должен иметь оценку "выявленный";
 - отрицательный контроль должен иметь оценку "невыявленный";
 - контроль без матрицы должен демонстрировать только уровни флуоресценции фона.
- Образец оценивали следующим образом:
 - выявленный: присутствие на низком уровне выше предела выявления для всех повторностей с учетом погрешности измерения способа;

- не выявленный: присутствие на низком уровне ниже предела выявления для всех повторностей с учетом погрешности измерения способа;
- неопределенный: образцы повторностей дают противоречивые оценки.

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

3. Интрогрессия EE-GM4 в предпочтительные культивары

Элитный трансгенный объект EE-GM4 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 одна линия из MG IX. Одна из линий из MG I и линия из MG III содержали нативный аллель устойчивости *Rhgl* из PI 88788, и одна из линий из MG VI несла нативные аллели устойчивости *Rhgl* и *Rhg4* из PI 437654. Другие три линии были восприимчивы к SCN.

Также, при исходном тестировании в нескольких экспериментах не наблюдали никаких биологически значимых отличий для уровней экспрессии белка Cry14Ab-1 или HPPD-4, измеренных в листьях выращиваемых в теплице растений (как измерено с помощью ELISA или вестерн-блоттинга (наблюдали только нормальную вариацию в анализе)), и не наблюдали никаких значимых отличий в результатах стандартного анализа SCN в теплице (измерение % снижения цист SCN в сравнении с контрольными растениями Thorne), когда трансгенный объект EE-GM4 интрогрессировали из генетического фона Thorne в другие генетические фоны зародышевой плазмы сои (из разных групп созревания, на разных стадиях интрогрессии), в сравнении с таковыми, наблюдаемыми в случае генетического фона Thorne. Хотя в исходном эксперименте для трансгенного объекта EE-GM4 в растении сои с генетическим фоном BC2F3 из группы созревания 9.1 продемонстрирована более низкая экспрессия белка Cry14Ab-1, никаких биологически значимых отличий в экспрессии белка Cry14Ab-1 относительно EE-GM4 в генетическом фоне Thorne не обнаруживали, когда этот эксперимент повторяли с большим числом растений из данной группы созревания.

Интрогрессия элитного трансгенного объекта EE-GM4 в другие культивары сои не оказывала значимого влияния на какую-либо из требуемых фенотипических или агрономических характеристик таких культиваров (отсутствие сцепленного груза), в то же время экспрессия трансгенов соответствует коммерчески

приемлемым уровням. Это подтверждает статус трансгенного объекта EE-GM4 как элитного трансгенного объекта.

Кроме того, элитный трансгенный объект EE-GM4 выгодно сочетается с другими элитными трансгенными объектами сои, полученными в результате трансформации. Особенно применимыми растениями в соответствии с настоящим изобретением являются растения, содержащие EE-GM4 в комбинации с другим трансгенным объектом сои, полученным в результате трансформации, или комбинацией из нескольких других трансгенных объектов сои, полученных в результате трансформации, таких как перечисленные в базах данных различных национальных или региональных регламентирующих органов, включающие без ограничения трансгенный объект MON87751 (описанный в WO2014201235 и ходатайстве 13-337-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект pDAB8264.42.32.1 (описанный в WO2013010094), трансгенный объект DAS-81419-2 (также известный как соя ConkestaTM, описанный в WO2013016527 и ходатайстве 12-272-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект EE-GM3 (также известный как FG-072, MST-FG072-3, описанный в WO2011063411, ходатайстве 09-328-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект SYHT0H2 (также известный как 0H2, SYN-000H2-5, описанный в WO2012/082548 и 12-215-01p), трансгенный объект DAS-68416-4 (также известный как соя Enlist, описанный в WO2011/066384 и WO2011/066360, ходатайстве 09-349-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект DAS-81615-9 (описанный в WO2014004458), трансгенный объект DAS-44406-6 (также известный как Enlist E3, DAS-44406-6, описанный в WO2012/075426 и 11-234-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON87708 (соя Xtend, описанный в WO2011/034704 и ходатайстве 10-188-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON89788 (также известный как Genuity Roundup Ready 2 Yield, описанный в WO2006/130436 и ходатайстве 06-178-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект DAS-14536-7 (описанный в WO2012/075429), трансгенный объект 40-3-2 (также известный как RoundUp Ready, MON-04032-6, описанный в ходатайстве 93-258-01 от USDA-APHIS), трансгенный объект A2704-12 (также известный как LL27, ACS-GM005-3, описанный в WO2006108674 и ходатайстве 96-068-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект 127 (также известный как BPS-CV127-9, описанный в WO2010/080829), трансгенный объект A5547-127 (также известный как LL55, ACS-GM006-4, описанный в WO2006108675 и в ходатайстве 96-068-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON87754 (также известный как Vistive III, MON-87754-1, описанный в WO2010/024976), трансгенный объект HOS (также известный как DP-305423-1, высокомасличная соя Plenish, описанный в WO2008054747), трансгенный объект MON87701 (также известный как MON-87701-2, описанный в WO2009064652 и ходатайстве 09-082-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON 87705 (также известный

как MON-87705-6, описанный в WO2010/037016 и ходатайстве 09-201-01p от USDA-APHIS), трансгенный объект MON87712 (также известный как MON-87712-4, описанный в WO2012/051199), трансгенный объект pDAB4472-1606 (также известный как трансгенный объект 1606, описанный в WO2012/033794), трансгенный объект 3560.4.3.5 (также известный как DP-356043-5, описанный в WO2008/002872), трансгенный объект MON87769 (также известный как MON-87769-7, описанный в WO2009102873 и в ходатайстве 09-183-01p от USDA-APHIS), или любую комбинацию EE-GM4 с несколькими из этих других трансгенных объектов сои, такую как комбинация EE-GM4 с любой из следующих комбинаций: трансгенный объект MON98788 x MON87708 (также известный как соя Roundup Ready 2 Xtend, MON-87708-9 x MON-89788-1), трансгенный объект HOS x трансгенный объект 40-3-2 (также известный как высокомасличная соя Plenish x соя Roundup Ready), трансгенный объект EE-GM3 x EE-GM2 (также известный как FG-072xLL55, описанный в WO2011063413), трансгенный объект MON 87701 x MON 89788 (также известный как соя Intacta RR2 Pro, MON-87701-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (также известный как соя Conkesta™ Enlist E3™, 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 трансгенный объект MON 89788 (также известный как соя Enlist™ RoundUp Ready® 2, DAS-68416-4 X MON-89788-1), трансгенный объект MON-87769-7 x трансгенный объект MON-89788-1 (также известный как соя Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield), MON 87705 x MON 89788 (также известный как Vistive Gold, MON-87705-6 x MON-89788-1), MON 87769 x MON 89788 (также известный как соя Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield, 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, культуры клеток, культуры тканей или протопласты

Эталонное семя, содержащее элитный трансгенный объект EE-GM4, было депонировано в ATCC (10801 University Blvd., Манассас, Виргиния 20110-2209) 9 ноября 2016 года под номером доступа в ATCC PTA-123624, и его жизнеспособность была подтверждена. Альтернативными названиями для EE-GM4 являются трансгенный объект GMB471 или BCS-GM471-2.

Вышеприведенное описание настоящего изобретения должно рассматриваться в 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.
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.
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 или комплементарную ей последовательность.
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 7368 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.
6. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 5, которая содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 5 или 24 и SEQ ID No. 6 или 24 или комплементарную ей последовательность.
7. Молекула нуклеиновой кислоты, получаемая из семени, депонированного в ATCC под номером доступа PTA-123624, 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.
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.
 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 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23.
 13. Растение сои, клетка, часть или семя, каждое из которых содержит в своем геноме элитный трансгенный объект EE-GM4, 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 Cry14Ab-1, и фланкирующие 5'- и 3'-последовательности, непосредственно окружающие указанную вставленную Т-ДНК, встречающуюся в эталонном семени, депонированном в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
 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.
 15. Растение сои, клетка, часть, семя или потомок по п. 13, геномная ДНК которых при анализе с применением ПЦР с помощью двух праймеров,

содержащих нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 и SEQ ID No. 13 соответственно, дает фрагмент ДНК размером 126 п.о.

16. Растение по любому из пп. 9-15, которое является выносливым к изоксафлутолу или мезотриону.
17. Соевый продукт, полученный из растения сои, клетки, части, семени или потомка 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 EE-GM4.
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.
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 EE-GM4.
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.
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 или семян сои на указанном предварительно обработанном поле.
26. Способ по любому из пп. 23-25, где указанный гербицид-ингибитор HPPD представляет собой изоксафлутол 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 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.
 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.
 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-GM4, предусматривающий скрещивание растения по любому из пп. 9-16 с другим растением сои и посадку семени, содержащего EE-GM4, полученного в результате указанного скрещивания.
 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.

34. Способ идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM4 участка с помощью специфической пары праймеров или специфического зонда, которые специфически распознают в EE-GM4 участок, содержащий часть 5'- или 3'-участка, фланкирующего Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, смежной с ним.
35. Пара праймеров, подходящая для применения в специфическом выявлении EE-GM4, 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-GM4, и второй праймер, содержащий последовательность, которая при оптимизированных условиях выявления специфически распознает последовательность в пределах вставленной Т-ДНК в EE-GM4, смежной с указанным фланкирующим 5'- или 3'-участком, при этом указанный 5'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24, при этом указанный 3'-участок, фланкирующий Т-ДНК, содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25, при этом указанная вставленная Т-ДНК содержит последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5, или нуклеотидную последовательность от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 17 до положения нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или комплементарную ей последовательность, или нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарную ей последовательность.
36. Пара праймеров по п. 35, где указанный первый праймер содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24 или комплементарной ей

последовательности, или содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25 или комплементарной им последовательности, и где указанный второй праймер содержит нуклеотидную последовательность из 17-200 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от положения нуклеотида 17 до положения нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

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 227 из SEQ ID No. 5 или от нуклеотида 1 до нуклеотида 1058 из SEQ ID No. 24 или комплементарной ей последовательности, или содержит на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность из по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранную из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 501 из SEQ ID No. 6, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 254 до нуклеотида 1339 из SEQ ID No. 25 или комплементарной им последовательности, и где указанный второй праймер содержит на своем дальнем 3'-конце по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, выбранных из нуклеотидной последовательности от нуклеотида 228 до нуклеотида 398 из SEQ ID No. 5 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от нуклеотида 1 до нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от положения нуклеотида 17 до положения нуклеотида 7621 из SEQ ID No. 11 или комплементарной ей последовательности, или нуклеотидной последовательности от положения нуклеотида 1059 до положения нуклеотида 8663 из SEQ ID No. 23 или комплементарной ей последовательности.

38. Пара праймеров по п. 35, где указанный первый праймер содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13 или SEQ ID No. 21, или где указанный второй праймер содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 или SEQ ID No. 20 соответственно.
39. Пара праймеров по п. 35, содержащая первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 21, или содержащая второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12 или нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 20.
40. Пара праймеров по п. 38 или п. 39, которая амплифицирует специфический для EE-GM4 фрагмент размером 126 или 90 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 первый праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 21, и второй праймер, содержащий на своем дальнем 3'-конце последовательность под SEQ ID No. 20.
42. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, где указанный зонд специфически распознает последовательность, содержащую часть 5'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM4 и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, вставленную Т-ДНК, расположенную в 3'-направлении от нее и являющуюся смежной с ней, или специфически распознает последовательность, содержащую часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, из EE-GM4 и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, или комплементарную ей последовательность.
43. Специфический зонд для идентификации элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах, который содержит нуклеотидную 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 часть 3'-последовательности, фланкирующей Т-ДНК, и часть вставленной Т-ДНК, расположенной в 5'-направлении от нее и являющейся смежной с ней в ЕЕ-GM4, 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 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. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
 51. Набор, подходящий для применения в специфическом выявлении ЕЕ-GM4, 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. 20 и SEQ ID No. 21, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
55. Набор, подходящий для применения в специфическом выявлении EE-GM4, содержащий зонд по любому из пп. 42-46.
56. Способ по п. 34, при этом способ предусматривает гибридизацию нуклеиновой кислоты из указанных биологических образцов с зондом по любому из пп. 42-46.
57. Способ подтверждения чистоты семени или скрининга семян в отношении присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM4, при этом способ предусматривает выявление специфического для EE-GM4 участка с помощью пары праймеров по любому из пп. 36-41 или зонда по любому из пп. 42-45 в образцах указанного семени.
58. Способ по п. 57, предусматривающий амплификацию фрагмента ДНК размером 126 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 90 п.о., где указанные праймеры содержат последовательность под SEQ ID No. 20 и SEQ ID No. 21 соответственно, и где указанный зонд содержит последовательность под SEQ ID No. 22.
59. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM4 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:

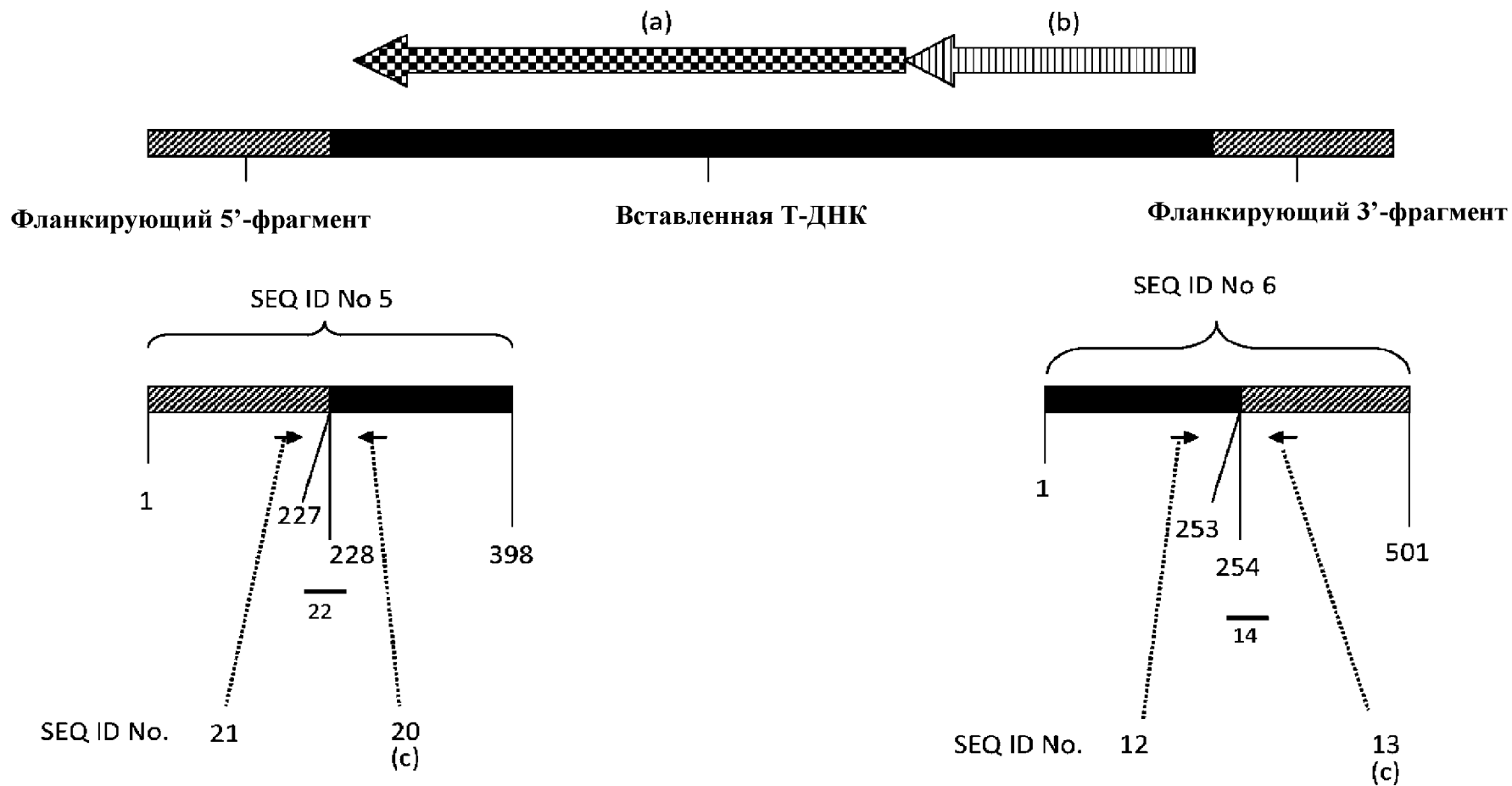
- a) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты с первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 228 до положения нуклеотида 245 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным первым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от положения нуклеотида 236 до положения нуклеотида 253 из SEQ ID No. 6 или комплементарную ей последовательность;
- b) гибридизацию указанной последовательности целевой нуклеиновой кислоты со вторым олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 210 до нуклеотида 227 из SEQ ID No. 5 или комплементарную ей последовательность, или с указанным олигонуклеотидом нуклеиновой кислоты, содержащим нуклеотидную последовательность от нуклеотида 254 до нуклеотида 271 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 меченым с образованием указанного меченого зонда на основе нуклеиновой кислоты;
- 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.
60. Способ определения статуса зиготности растения, растительного материала или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, 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.

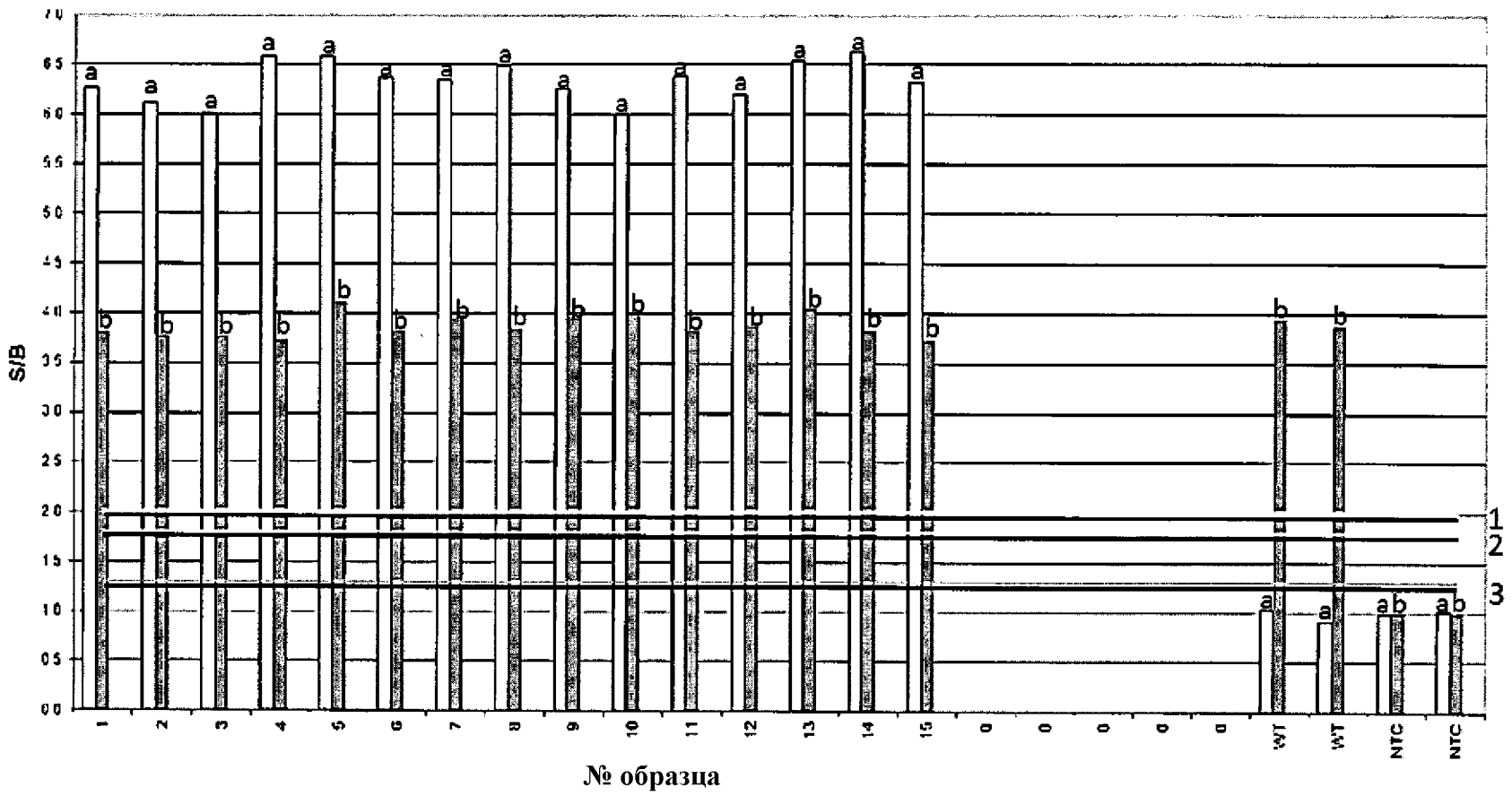
61. Способ по п. 60, где указанные два праймера, специфически распознающие прединсерционную растительную ДНК, представляют собой праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 18, и праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 13, и где праймер, распознающий последовательность в пределах вставленной Т-ДНК, представляет собой праймер, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 12.
62. Способ выявления присутствия элитного трансгенного объекта EE-GM4 в биологических образцах или определения статуса зиготности растения, растительного материала или семени, содержащих EE-GM4, где указанный способ является таким, как описано в любом из примеров 2.1, 2.2 или 2.3.
63. Способ снижения потерь урожая в поле, предназначенном для посадки растений сои, в частности, в поле, которое содержит, содержало или, как предполагается, содержит нематод или яйца нематод, как, например, SCN, RKN или *Pratylenchus*, или почковидных нематод или их яйца, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, и 2) посадки или посева растений или семян сои, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
64. Способ повышения урожая растений сои при посадке в поле, содержащем нематод или яйца нематод, как, например, SCN, RKN или *Pratylenchus*, или почковидных нематод или их яйца, предусматривающий стадию 1) получения растений или семени, содержащих элитный трансгенный объект EE-GM4, полученный в результате трансформации, и 2) посадки или посева растений или семян сои, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в АТСС под номером депонирования РТА-123624.
65. Способ получения растения или семени сои, выносимых к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол или мезотрион, или получения растения или семени сои, выносимых к нематодам, таким как SCN, RKN или *Pratylenchus*, или к почковидным нематодам, или получения растения или семени сои, выносимых к гербициду-ингибитору HPPD, такому как изоксафлутол или мезотрион, и выносимых к нематодам, таким как SCN,

- RKN или *Pratylenchus*, или к почковидным нематодам, который характеризуется стадией введения в геном растения или семени сои элитного трансгенного объекта EE-GM4 сои, полученного в результате трансформации, и необязательно обработки указанного растения или семени гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол или мезотрион, или необязательно обработки поля, на котором будут осуществлять посадку указанного растения или семени, гербицидом-ингибитором HPPD, таким как изоксафлутол или мезотрион, и посадки указанного растения или семени на указанном предварительно обработанном поле.
66. Молекула нуклеиновой кислоты, которая специфически характеризует элитный трансгенный объект EE-GM4 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-GM4, расположенной в 3'-направлении от нее и являющейся смежной с ней, или характеризующаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID No. 2, 4 или 6, которая содержит часть вставленной чужеродной ДНК из EE-GM4 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 ингибитора HPPD, такого как изоксафлутол, топрамезон или мезотрион, по отношению к семени сои, из которого будут выращивать указанное растение, или по отношению к полю, предназначенному для посадки указанного семени, или по отношению к надземной части указанного растения.
68. Способ повышения урожая растений сои на полях, содержащих SCN, 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-GM4, где эталонное семя, содержащее указанный элитный трансгенный объект, депонировано в ATCC под номером депонирования PTA-123624.

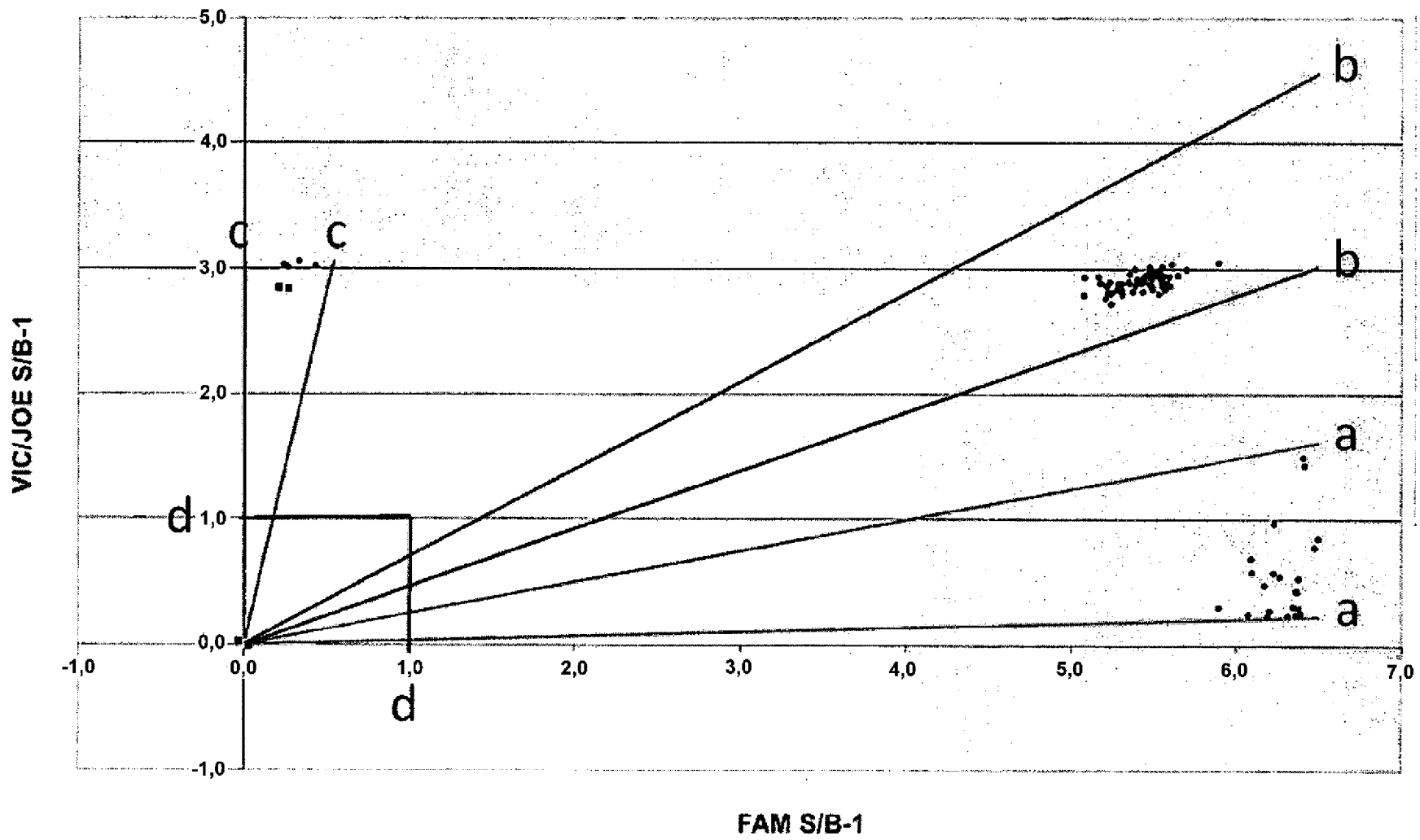
EE-GM4



Фигура 1

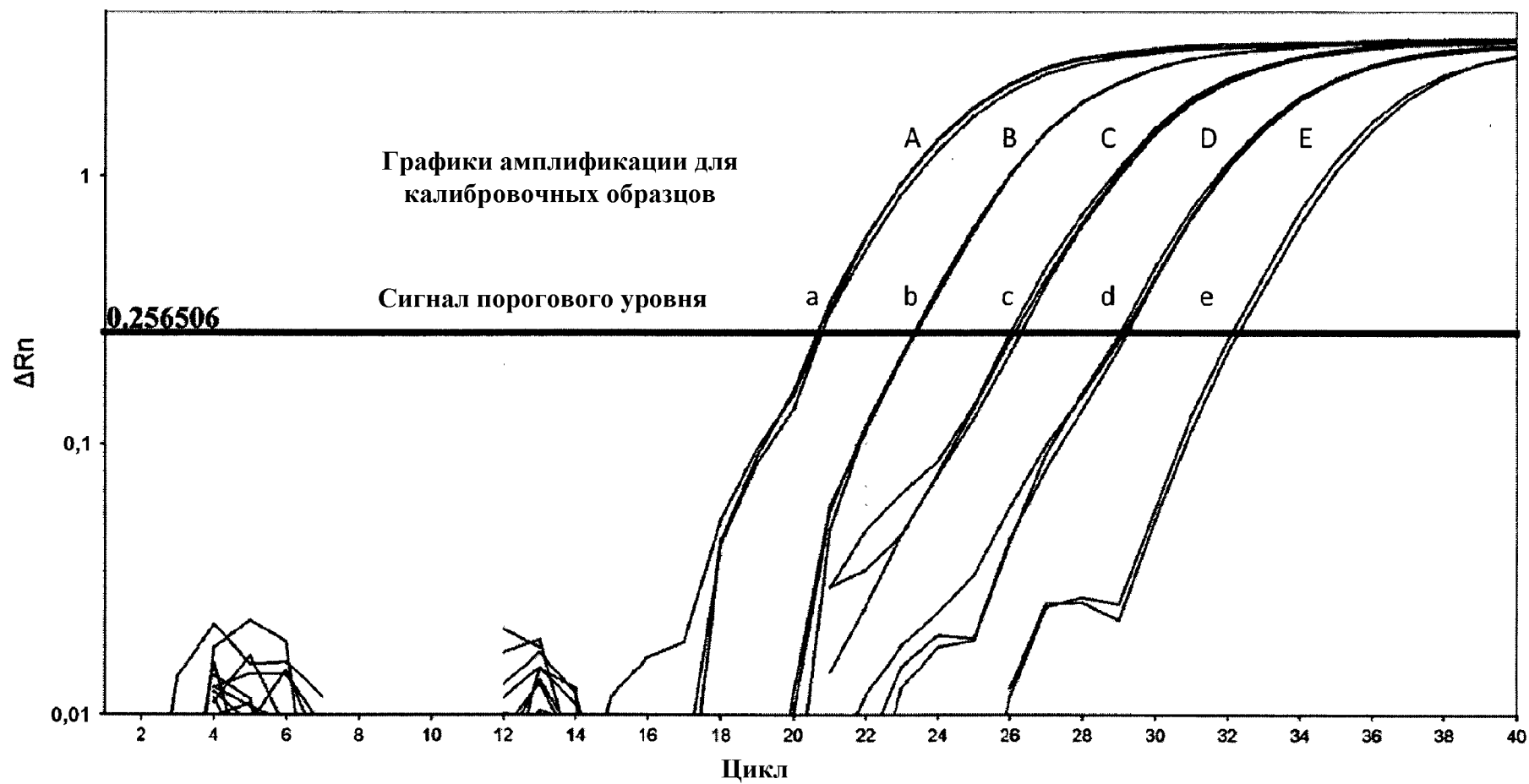


Фигура 2

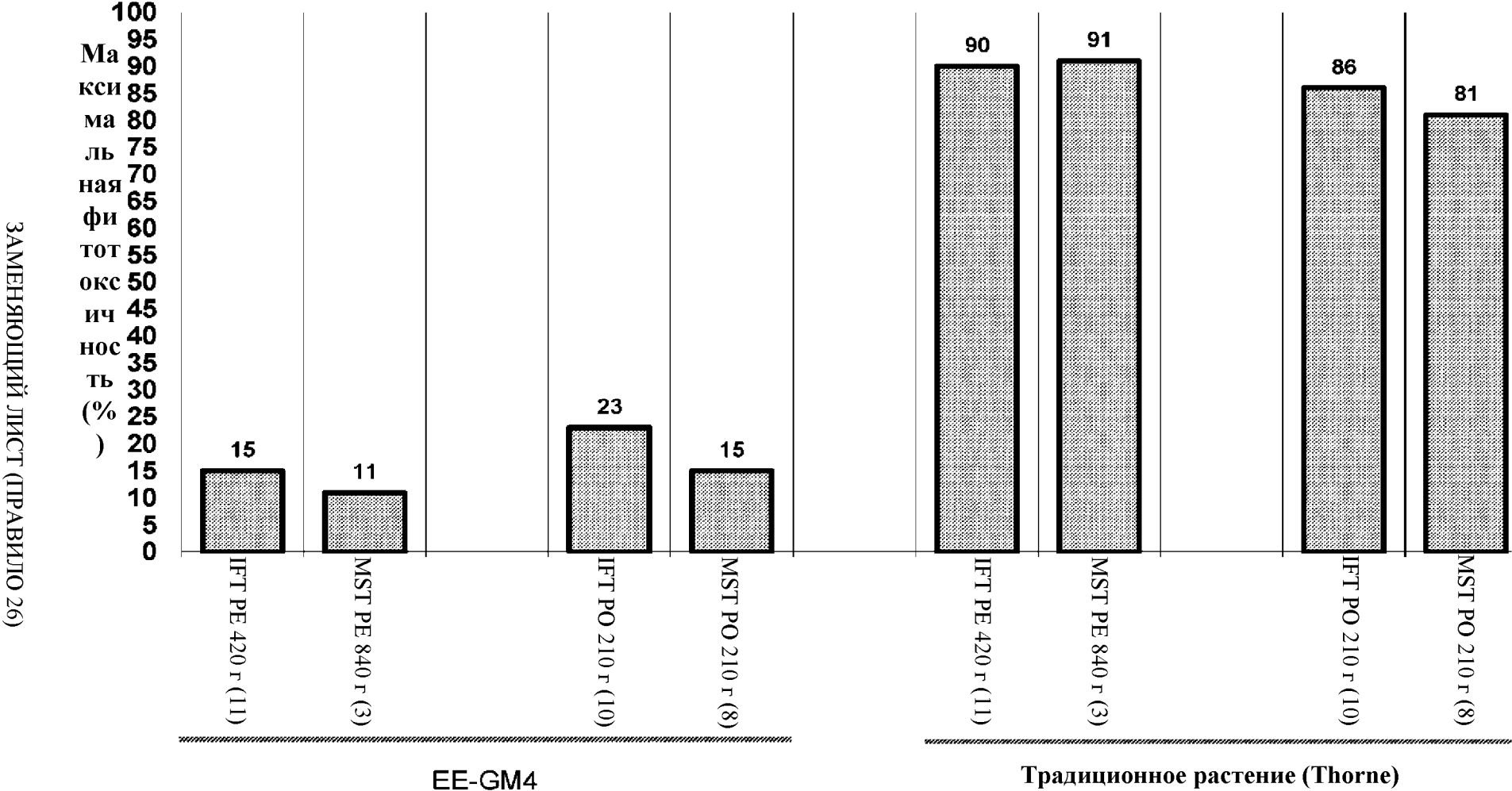


Фигура 3

График амплификации

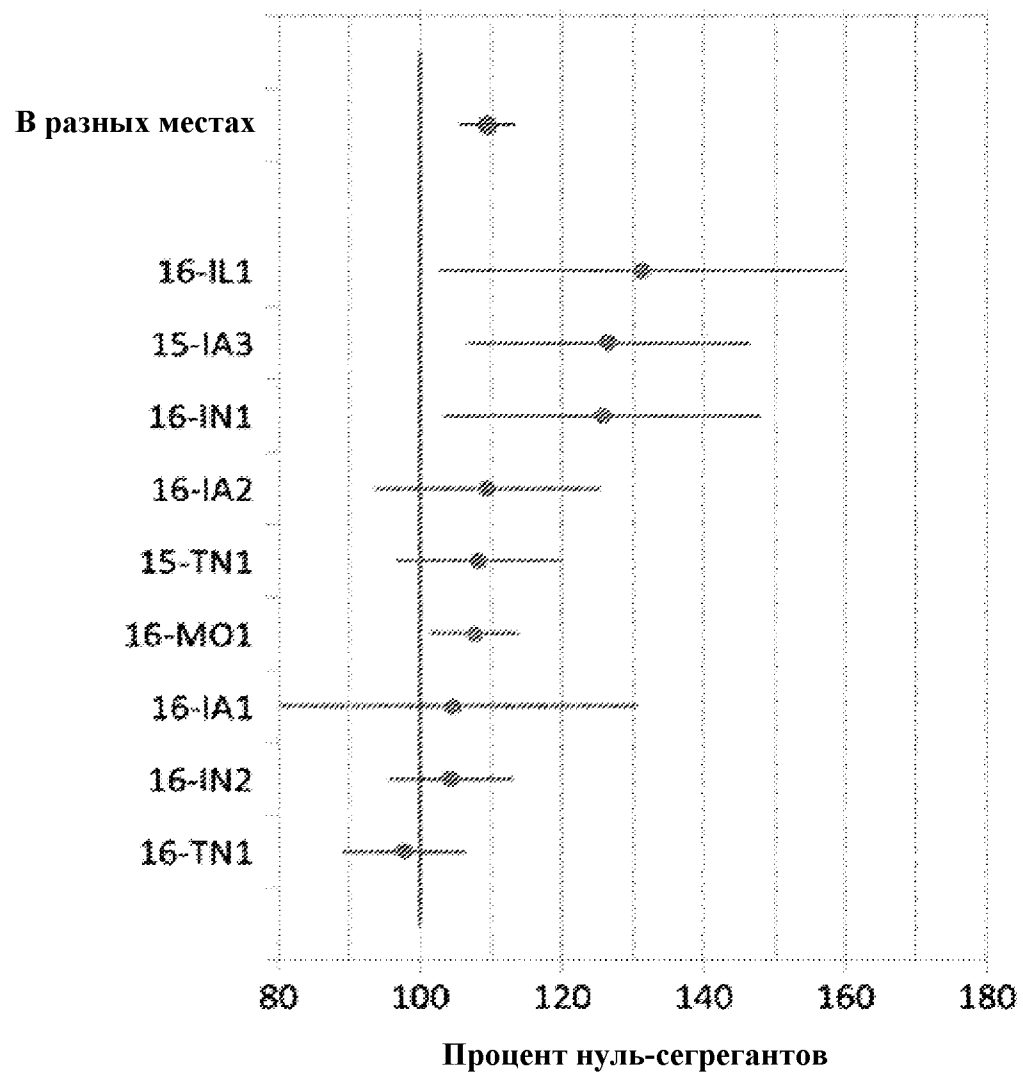


Фигура 4



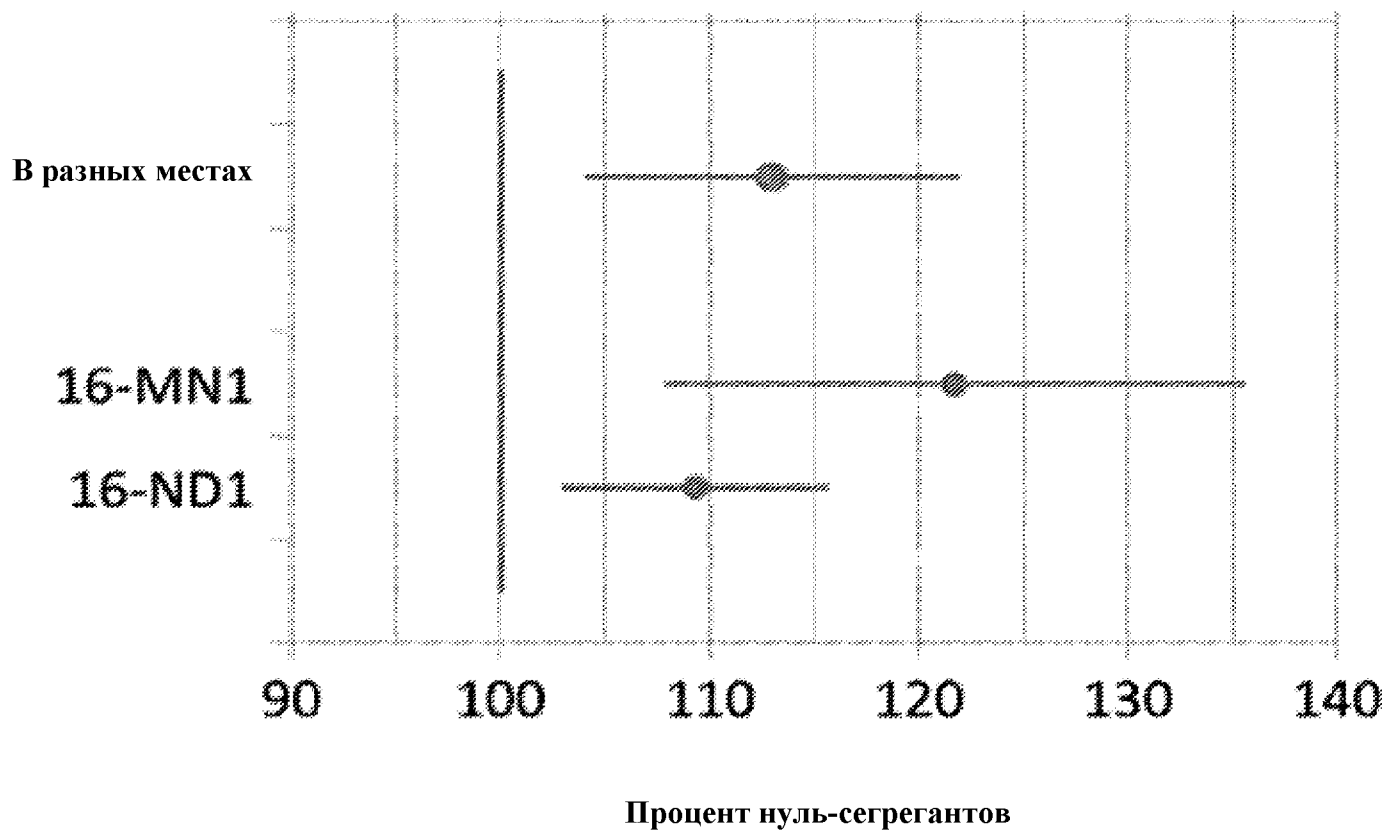
Фигура 5

Урожайность с ЕЕ-GM4

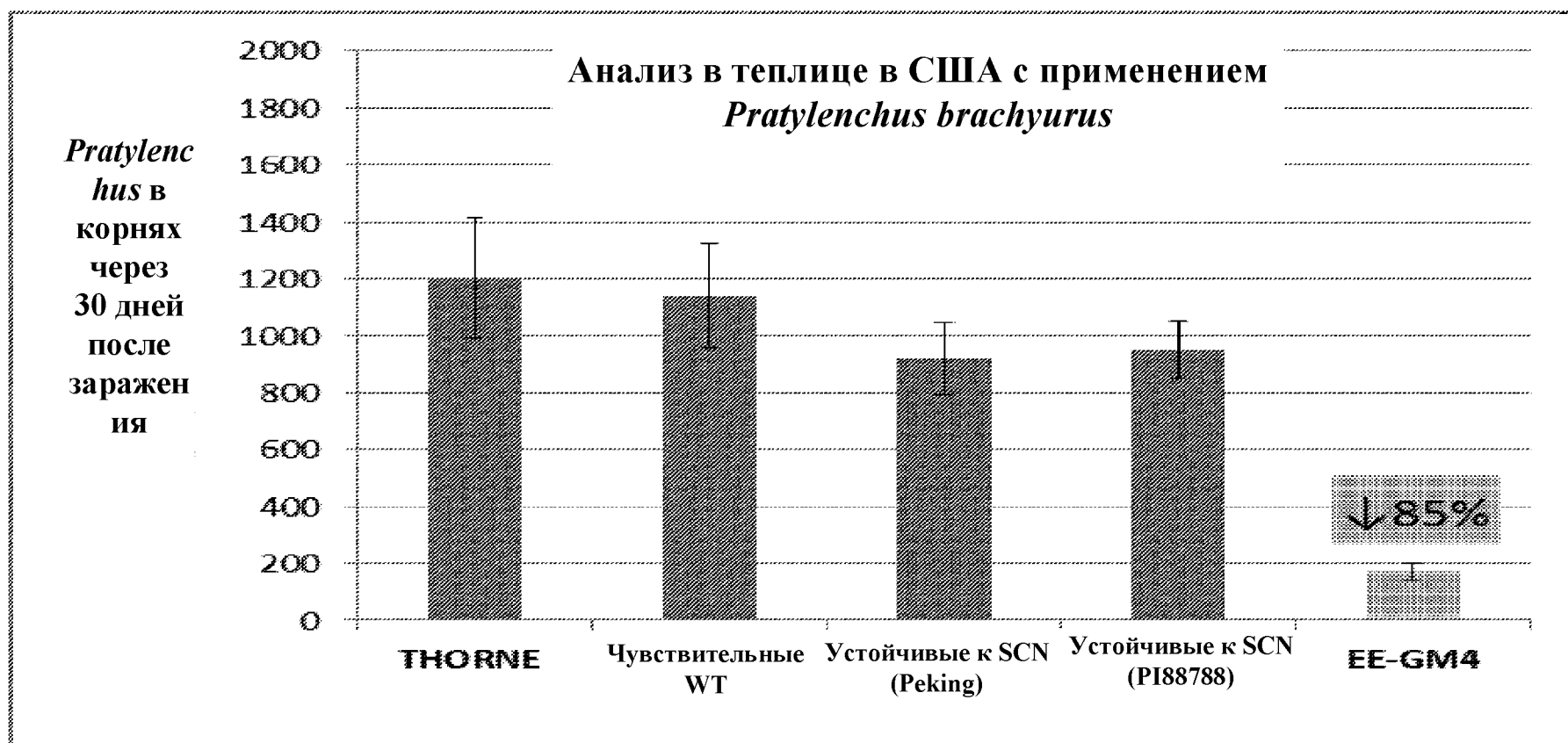


Фигура 6

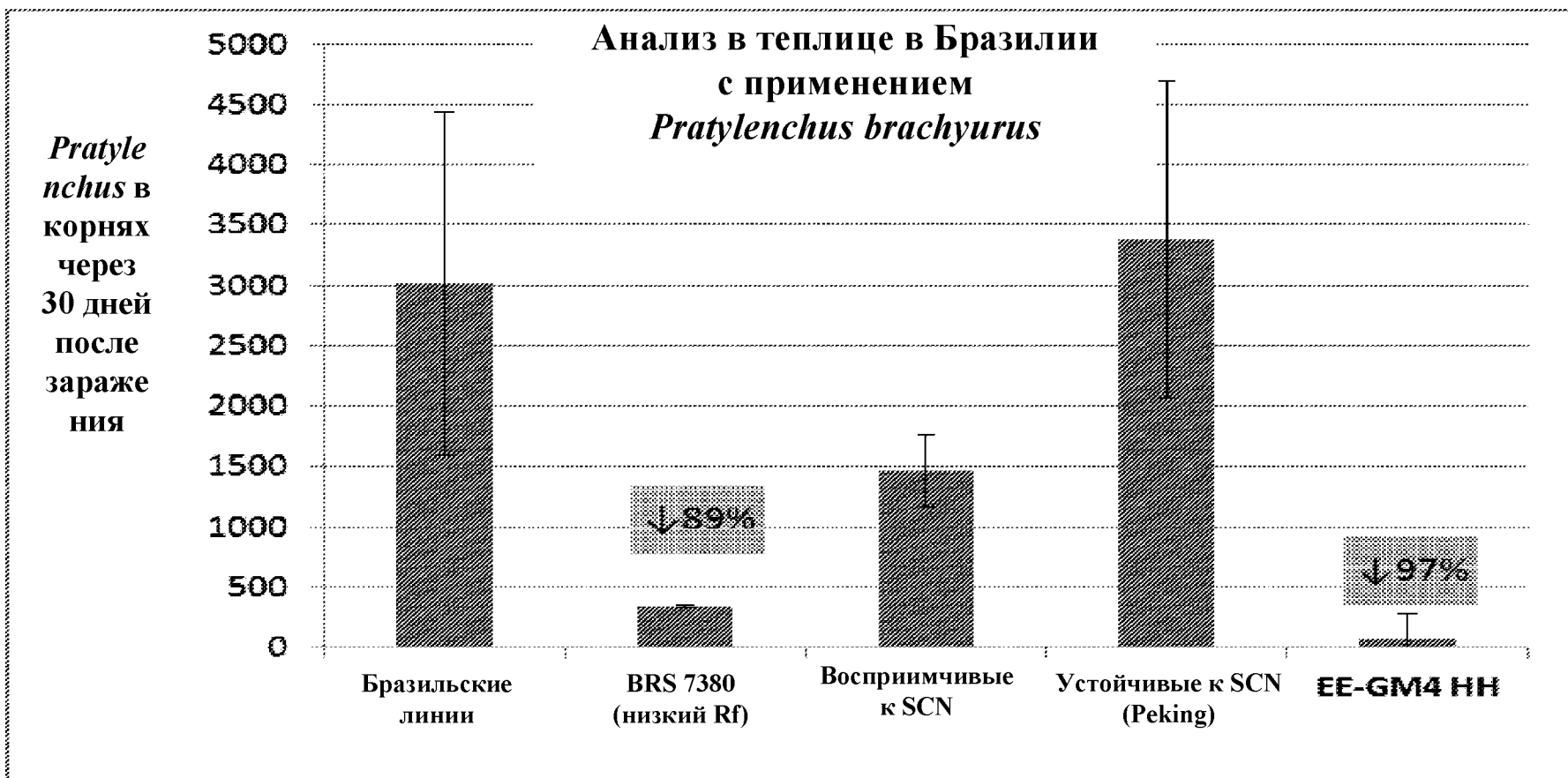
Урожайность с ЕЕ-GM4



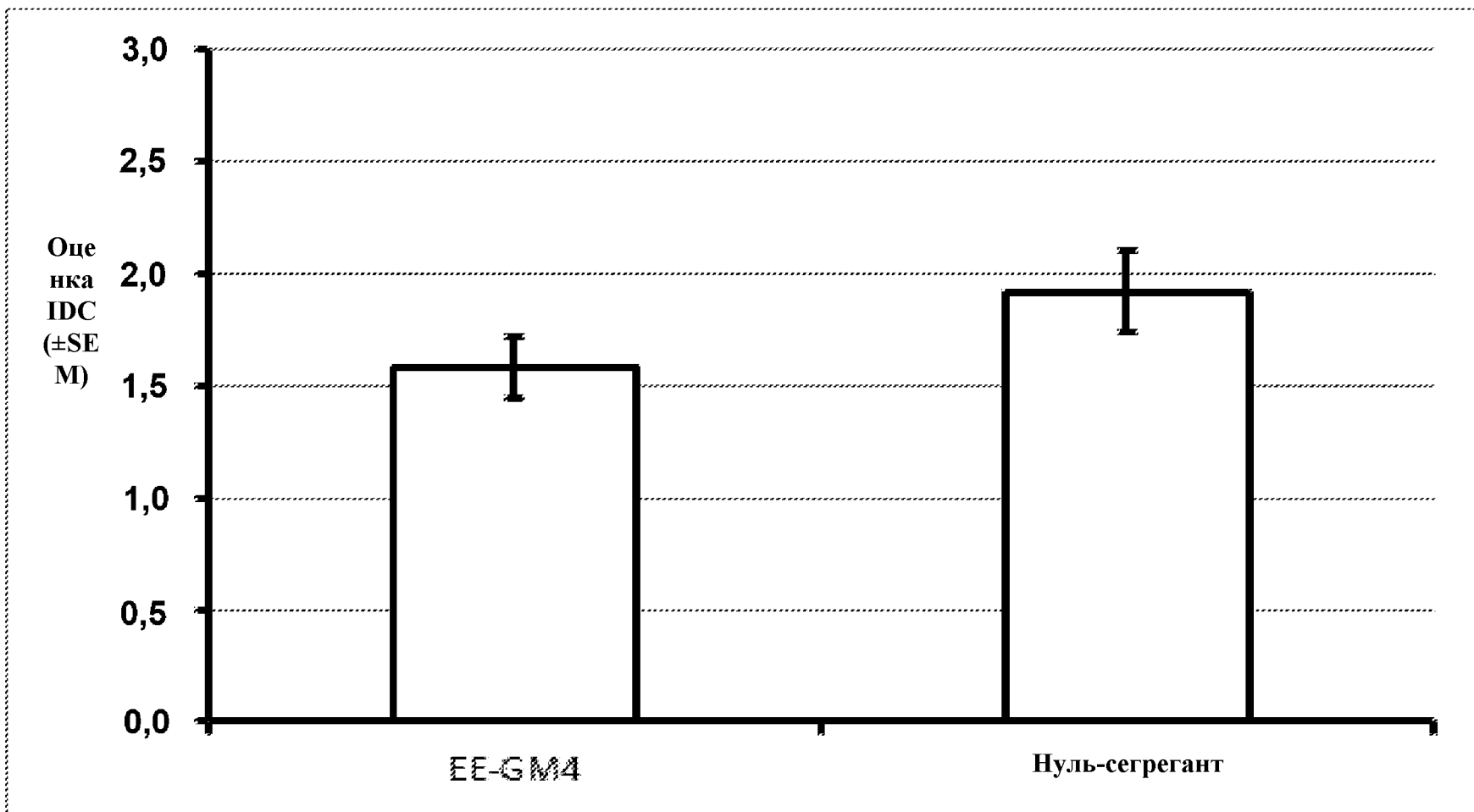
Фигура 7



Фигура 8



Фигура 9



Фигура 10