

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036941**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.18**

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

**(21)** Номер заявки  
**201690018**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.06.12**

---

**(54) ТРАНСГЕННЫЙ ОБЪЕКТ СОИ MON87751 И СПОСОБЫ ЕГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 61/834,899

**(56)** US-A1-20110067141  
US-A1-20100313310

**(32)** 2013.06.14

Wu et al. "Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins," *Journal of Invertebrate Pathology*, 1 January 2009 (01.01.2009), Vol. 100, Iss. 1, Pgs. 29-34, entire document

**(33)** US

**(43)** 2016.05.31

**(86)** PCT/US2014/042100

**(87)** WO 2014/201235 2014.12.18

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

SIEBERT et al. "Evaluation of Com Hybrids Expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 Against Southern United States Insect Pests," *Journal of Economic Entomology*, 1 October 2012 (01.10.2012), Vol. 105, No. 5, Pfs. 1825-1834, entire document  
US-A1-20110321185

**(72)** Изобретатель:  
**Бизли Ким А., Бернс Уэн К., Коул  
Роберт Х., II, Макрае Тед С., Миклош  
Джон А., Рушке Лиза Г., Тянь Кайжун,  
Вэй Липин, Ву Куншенг (US)**

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

---

**(57)** В изобретении предложены трансгенный объект MON87751 Glycine max, растения, клетки растений, семена, части растений, растения-потомки и товарные продукты, содержащие объект MON87751. В изобретении также предложены полинуклеотиды, специфические для объекта MON87751, растений, клеток растений, семян, частей растений и товарных продуктов, содержащих полинуклеотиды для объекта MON87751. В изобретении также предложены способы, относящиеся к объекту MON87751.

**B1**

**036941**

**036941  
B1**

В настоящей заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/834899, поданной 14 июня 2013 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Включение перечня последовательностей**

Перечень последовательностей содержится в файле под названием

MONS357WO\_ST25.txt, размером 43 килобайта (размер измерен в Microsoft Windows®), созданном 12 июня 2014 подан в настоящем документе в электронном виде и включен в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к трансгенному объекту *Glycine max* (сои), упомянутому как MON87751. Объект предусматривает две различных формы действия по сопротивлению поражениям сои от чешуекрылых, предоставляя уникальное сочетание инсектицидных токсичных белков, ранее не доступных растениям сои. Сочетание этих инсектицидных токсичных белков является весьма эффективной для контроля поражения видами чешуекрылых, характерной для растений сои. Изобретение также относится к растениям сои, частям растений, семенам растений, растительным клеткам, потомству растений, сельскохозяйственной продукции, и способам, относящимся к объекту MON87751 и обеспечиваает нуклеотидные молекулы, которые являются уникальными для объекта, созданные в связи с включением трансгенной ДНК в геном клетки *Glycine max* (сои), и пригодные для обнаружения присутствия данного объекта в биологических образцах, содержащих нуклеиновые кислоты сои.

#### **Уровень техники**

Соя (*Glycine max*) представляет собой важнейшую сельскохозяйственную культуру во многих регионах мира, биотехнологические способы были применены к этой культуре с целью создания разновидностей сои с желательными признаками. Одним из таких желательных признаков является устойчивость к насекомым. Экспрессия трансгена устойчивости к насекомым в растении может наделять растение желательным признаком устойчивости к насекомым, но экспрессия трансгена может быть подвержена влиянию многих различных факторов, включая ориентацию и состав кассет управляющих экспрессией отдельных генов, перенесенных в растительную хромосому, хромосомным расположением и геномным результатом трансгенной вставки. Например, было замечено у растений, что существуют различия в уровне и характере экспрессии трансгена среди отдельных объектов, которые отличаются сайтами встраивания трансгена в хромосому, но в остальном идентичны. Существуют также нежелательные и/или желательные фенотипические или агрономические различия между объектами. Поэтому, часто возникает необходимость создавать и анализировать большое количество отдельных трансформированных растительных клеток для того, чтобы выбрать объект, имеющий как желательный признак, так и оптимальные фенотипические и сельскохозяйственные характеристики пригодный для коммерческого успеха. Выбор предпочтительного трансгенного объекта требует обширной молекулярной характеристики, а также тепличных и полевых испытаний с большим количеством объектов на протяжении нескольких лет, в нескольких местах, и при различных условиях. Собирается значительное количество информации об эффективности, фенотипические и молекулярные данные, собранные и полученные данные и наблюдения затем анализируются командами ученых и агрономов с целью выбора одного или более коммерчески пригодных объектов. Однажды выбранный объект затем используется для интрогрессии желательного трансгенного признака в другие генетические окружения с помощью селекционных методов растений, таким образом, производя целый ряд различных разновидностей сельскохозяйственных культур, которые содержат желательный признак и способны адаптироваться к конкретным местным агрономическим условиям.

Трансгенные сои, которые обеспечивают инсектицидный контроль поражения насекомыми путем экспрессии единственного токсина подвержены риску ограниченной долговечности из-за повышенной вероятности развития устойчивости к токсину у насекомых-вредителей. Аналогичным образом, трансгенные сои, содержащие токсичные вещества, которые не обеспечивают несколько уникальных форм воздействия могут также подвергаться риску ограниченной долговечности. Первый из сортов сои, который производит белок, токсичный для чешуекрылых, содержит единственный токсичный белок - Cry1Ac. Недавно были раскрыты трансгенные объекты сои, содержащие токсичные белки Cry1Ac и Cry1F. Если имеет место устойчивость к Cry1Ac, у трансгенного объекта Cry1Ac и Cry1F остался бы только токсин Cry1F в качестве эффективного источника. Поэтому необходимо предусмотреть растение сои, которое имеет два или более токсичных агента для контроля насекомых-вредителей, контролируемых Cry1Ac, в которых ни один из токсичных агентов не связывает те же или по сути те же рецепторы в средней кишке насекомого, которые связывает Cry1Ac. Изобретение, описанное в настоящем документе, предлагает трансгенный объект сои MON87751, который преодолевает описанную выше проблему устойчивости трансгенных объектов сои, описанных в известном уровне техники, путем предоставления двух или более токсичных для чешуекрылых вредителей агентов, среди которых ни один токсический агент был ранее включен в любое растение сои с целью таргетинга для контроля чешуекрылых вредителей сои.

Для создания трансгенного растения, содержащего одиночный трансформирующий объект, порция

рекомбинантного ДНК конструкта переносится в геном клетки сои, и клетка сои впоследствии вырастает в растение. Клетка сои, в которую изначально переносится объект регенерирует для получения поколения R0. Растение R0 и потомство от растения R0 может быть протестировано на любой желательный признак(и), но на эффективность объекта может влиять цис и/или транс-факторы, связанные с сайтом встраивания объекта трансформации. Фенотип предоставленный объектом может также определяться размером и дизайном ДНК-конструкта, который может варьировать в зависимости от комбинации генетических элементов в экспрессионной кассете, количества трансгенов, количества экспрессионных кассет, и конфигурации таких элементов и таких кассет. Идентификация объекта с желательными признаками может быть дополнительно осложнена факторами, такими как характеристики развития, а также суточные, временные или пространственные характеристики экспрессии трансгена; или внешними факторами, например, условия окружающей среды для роста растений, доступность воды, доступность азота, жара или стресс. Таким образом, возможность получить объект, предоставляющий желательный набор фенотипических признаков, не является легко предсказуемой.

#### **Сущность изобретения**

Изобретение предоставляет трансгенное растение сои, содержащее объект MON87751 демонстрирующее превосходящие свойства и производительность по сравнению с существующими трансгенными растениями сои и новыми объектами, сконструированными одновременно. Объект сои MON87751 содержит в одном локусе встраивания в геноме сои две связанных экспрессионных кассеты, которые по отдельности наделяют признаком устойчивости к чешуекрылым насекомым-вредителям.

Комбинация двух связанных экспрессионных кассет в объекте сои MON87751 обеспечивает две формы воздействия против насекомых-вредителей видов отряда Lepidoptera, в том числе *Chrysodeixis* spp., *Spodoptera* spp., *Helicoverpa* spp., *Crociosema* spp., *Rachiplusia* spp., *Anticarsia* spp., *Elasmopalpus* spp., и *Plathypena* spp. Двойная форма воздействия обеспечивает избыточность инсектицидного контроля против видов чешуекрылых насекомых-вредителей, а также значительно уменьшает вероятность развития резистентности к признакам борьбы с вредителями.

Объект MON87751 характеризуется специфическими уникальными сегментами ДНК, которые являются пригодными для выявления наличия объекта в образце. Образец предназначен для обозначения композиции, которая представляет собой либо по существу чистую ДНК сои, или композицию, содержащую ДНК сои. В любом случае, образец представляет собой биологический образец, т.е., он содержит биологические материалы, включая без ограничения ДНК, полученную или извлеченную, прямо или опосредованно, из генома сои, включающий объект MON87751. "Напрямую" относится к способности специалиста в данной области напрямую получить ДНК из генома сои путем разрушения клеток сои (или путем получения образцов сои, содержащих разрушенные клетки сои) и выделять геномную ДНК с целью обнаружения. "Опосредованно" относится к способности специалиста в данной области получить целевую или конкретную эталонную ДНК, т.е. новый и уникальный сегмент сплайсинга, описанный в настоящем документе как являющийся маркером наличия объекта MON87751 в данном образце, с помощью иных средств, чем путем разрушения клеток сои или путем получения образцов сои, содержащих разрушенные клетки сои. Такие косвенные средства включают без ограничения амплификацию сегмента ДНК, содержащего последовательность ДНК, к которой нацелен конкретный зонд, предназначенный для специфического связывания с последовательностью-мишенью, или амплификацию сегмента ДНК, который может быть измерен и охарактеризован, т.е. измеряется путем отделения от других сегментов ДНК с помощью некоторых эффективных матриц, такие как агароза или акриламидный гель или тому подобных, или характеризуется прямым анализом последовательности ампликонов или клонированием ампликонов в вектор и прямым секвенированием ампликонов вставленных в такой вектор. Кроме того, сегмент ДНК, соответствующий позиции в хромосоме сои, в которую была встроена трансгенная ДНК и который может быть использован для выявления объекта MON87751, может быть клонирован с помощью различных средств и затем идентифицирован и охарактеризован относительно его наличия в конкретном образце или в конкретном геноме сои. Такие участки ДНК известны под названием сегменты или последовательности сплайсинга, при этом встроенные участки ДНК могут достигать такой длины, а смежная (фланкирующая) хромосомная ДНК такой длины, чтобы точка стыковки между встроенной ДНК и геномом сои находилась внутри сегмента. SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 4, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 6, SEQ ID №: 7, SEQ ID №: 8 и SEQ ID №: 10, а также обратные комплементы каждой из них представляют собой такие участки.

Конкретные последовательности, указанные в настоящем документе, могут однозначно присутствовать в объекте MON87751, или конструкте, содержащемся в нем, а идентификация данных последовательностей, путем прямого анализа последовательности, путем обнаружения зондов, связанных с такими последовательностями, или путем наблюдения размера и, возможно, состава отдельных ампликонов, описанных в настоящем документе, если они присутствуют в конкретной зародышевой плазме или геноме сои и/или присутствующего в том или ином биологическом образце, содержащем ДНК сои, являются маркерами наличия объекта MON87751, или конструкта, содержащегося в нем, в такой образце. Известно, что фланкирующие геномные сегменты (т.е., сегменты генома сои последовательности ДНК, смежные со встроенной трансгенной ДНК) подвергаются незначительной изменчивости и, в связи с этим, ог-

раничение, по меньшей мере, 99% или больше идентичности связано с на такими аномалиями или полиморфизмом от генома сои к геному сои. Нуклеотидные сегменты, которые являются полностью комплементарными по всей их длине в сравнении с конкретными диагностическими последовательностями, упомянутыми в настоящем документе, предназначены, чтобы быть в пределах объема настоящего изобретения. Положение нуклеотидных сегментов настоящего изобретения относительно друг друга и внутри генома сои, приведено на фиг. 1, а нуклеотидная последовательность каждой иллюстрируется, в порядке, предусмотренном SEQ ID №:10. Нуклеотидные сегменты, которые характеризуют объект MON87751, и которые служат маркерами присутствия объекта MON87751, или конструкта, содержащегося в нем, в образце, включают SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 4, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 6, SEQ ID №: 7, SEQ ID №: 8, SEQ ID №: 9, SEQ ID №: 10, SEQ ID №: 17, SEQ ID №: 18, SEQ ID №: 19, SEQ ID №: 20, SEQ ID №: 21, SEQ ID №: 22, SEQ ID №: 23, SEQ ID №: 24, SEQ ID №: 25 или SEQ ID №: 26. Наличие одной, или двух, или более из этих нуклеотидных последовательностей в образце, когда такой образец содержит ткань сои и такую ДНК сои, свидетельствует о наличии события MON87751, или конструкта, содержащегося в нем.

Слово "полученный", в частности означает, что конкретная молекула ДНК находится в геноме растения сои, или может быть обнаружена в ДНК растения сои. "Способный к обнаружению" означает способность конкретного сегмента ДНК к амплификации, и его размер и/или последовательность характеризуется или выявляется путем анализа последовательностей ДНК, а также может обозначать способность зонда связываться конкретно с конкретным отрезком ДНК, т.е. сегментом-мишенью ДНК, и последующая способность детектировать связывание зонда с мишенью. Конкретный сегмент ДНК или сегмент-мишень ДНК по настоящему изобретению присутствует в растении сои, содержащем встроенный объект MON87751.

По отношению к сое предполагается, что клетки сои, семена сои, части растения соя и растений сои находятся в пределах объема настоящего изобретения до тех пор, пока в каждом варианте реализации содержится детектируемое количество ДНК, соответствующее любому одному, двум или более сегментам, описанным в настоящем документе, диагностированных на наличие ДНК объекта сои MON87751 ДНК. Части растения сои включают клетки; пыльцу; семяпочки; цветы; бобы; семя; ткань корня; ткань стебля и ткань листа. Товарные продукты, созданные из сои, в которой детектируемое количество сегментов ДНК, описанных в данном документе, является маркером наличия объекта MON87751, находятся в пределах объема изобретения. Такие товарные продукты могут включать цельное или обработанное семя сои, соевое масло, соевый белок, соевый шрот, соевая мука, соевые хлопья, соевые отруби, соевое молоко, соевый сыр, соевое вино, корм для животных, содержащий сою, бумагу содержащую сою, крем содержащий сою, соевую биомассу, горючесмазочные материалы, произведенные с использованием растения сои и частей растений сои.

ДНК объекта сои MON87751 может присутствовать в каждой клетке и в каждом из геноме в одной хромосоме растения сои, семени сои, и тканях сои, содержащих объект. Т.к. геном сои передается потомкам по закону Менделя, если растение сои было гомозиготным по включению объекта MON87751, каждое растение и клетка потомка сои будет содержать объект ДНК на каждой аллели родительской хромосомы, содержащей включение объекта MON87751 и наследовать потомством от родителя(ей). Однако, если геном сои, содержащий объект MON87751 ДНК, принадлежит гетерозиготному или гибриднему родителю, то около 50% пыльцы и около 50% семязачатков, участвующих в опылении от гибридных родителей, будет содержать ДНК объекта сои MON87751, в результате чего получается смешанная популяция потомства, содержащая ДНК объекта MON87751, и процент такого потомства, возникающего в результате таких скрещиваний гибридов может колебаться от около 50 до около 75%, имеющих ДНК объекта MON87751 в таком потомство.

Молекулы ДНК по настоящему изобретению могут быть уникальными для двух отдельных границ сплайсинга на каждом конце ДНК встроенного трансгенного объекта MON87751, а геномная ДНК сои, которая смежна, т.е. фланкирована, с каждым концом встроенной ДНК MON87751, или уникальна для встроенной ДНК объекта сои MON87751. Эти молекулы, когда они присутствуют в конкретном образце, исследованном с применением способов, описанных в настоящем документе при помощи зондов, праймеров и в некоторых случаях с использованием анализа последовательности ДНК могут быть маркерами присутствия количества объекта MON87751 сои в этом образце. Такие молекулы ДНК, уникальной для ДНК объекта сои MON87751, могут быть идентифицированы и охарактеризованы различными способами, включающими применение молекул-зондов нуклеиновых кислот, сконструированных для специфического связывания с уникальной молекулой ДНК с последующим выявлением связывания таких зондов с уникальной ДНК, и методами температурной амплификации, которые используют как минимум две разных молекулы ДНК, которые действуют как зонды, но последовательность таких молекул может быть несколько менее специфичной, чем у зондов, описанных выше. Специалистам в данной области понимает, что контактирование конкретной ДНК-мишени с зондом или праймером при соответствующих условиях гибридизации приведет к связыванию зонда или праймера с сегментом-мишенью ДНК.

Молекулами ДНК настоящего изобретения могут быть сегменты-мишени ДНК, которые могут быть способны к амплификации и, в случае обнаружения в виде одного или нескольких ампликонов представ-

ленной длины полученных путем способов амплификации конкретного образца, могут служить маркерами присутствия объекта MON87751, или конструкта, содержащегося в нем, в таком образце. Такие молекулы ДНК или полинуклеотидные сегменты могут иметь нуклеотидную последовательность в порядке, предусмотренном в каждой из SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 4, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 6, SEQ ID №: 7, SEQ ID №: 8, SEQ ID №: 9, SEQ ID №: 10, SEQ ID №: 17, SEQ ID №: 18, SEQ ID №: 19, SEQ ID №: 20, SEQ ID №: 21, SEQ ID №: 22, SEQ ID №: 23, SEQ ID №: 24, SEQ ID №: 25 и SEQ ID №: 26, и далее определены в настоящем документе и в примерах ниже. Молекулы праймеров и/или зондов могут быть предоставлены в виде комплекта вместе с необходимыми реагентами, включающими контрольные образцы, и упакованы вместе с инструкцией по применению.

Рекомбинантные молекулы ДНК настоящего изобретения могут присутствовать внутри или могут быть получены из микроорганизма. Микроорганизм предназначен для включения любых микроскопических клеток - прокариотических или эукариотических или иных, содержащих ДНК в геноме или хромосоме или экстрахромосомную структуру ДНК, более известную как плазида или вектор. В одном варианте реализации микроскопические организмы могут включать бактерии (прокариоты) и клетки, соответствующие высшим жизненным формам (эукариоты), которые находятся вне оптического диапазона, среднестатистического человека, как правило, менее пятидесяти кубических микрон и чаще менее десяти кубических микрон. Бактерии представляют собой микроскопические микроорганизмы, которые могут содержать вектор или плазмиду, содержащую один или более или все из новых сегментов ДНК по настоящему изобретению, включая каждую из соответствующих экспрессионных кассет, представленных в порядке, предусмотренном в SEQ ID №: 9. Клетки растений и в частности клетки растений сои по настоящему изобретению могут содержать любой один, два, или более или все из новых сегментов ДНК настоящего изобретения. Зонды для использования в настоящем документе, могут содержать молекулы ДНК или полинуклеотидные сегменты достаточной длины чтобы функционировать в жестких условиях гибридизации, определенных в настоящем документе, чтобы связываться с конкретным сегментом ДНК-мишени, т.е., уникальный сегмент ДНК являющийся маркером наличия ДНК объекта MON87751 в образце. Такой зонд может быть предназначен для связывания только одно соединение или другую новую последовательность присутствующую только в ДНК объекта сои MON87751, или два или более таких единичных сегментов сплайсинга. Обнаружение связывания такого зонда с молекулой ДНК в конкретном образце, предположительно содержащего ДНК является маркером наличия объекта сои MON87751 в образце.

Праймеры могут содержать пары различных олигонуклеотидов или полинуклеотидных сегментов для применения в реакции тепловой амплификации, которая амплифицирует определенный целевой сегмент ДНК. Каждый праймер в паре предназначен для связывания с довольно специфическим сегментом ДНК внутри или рядом с сегментом ДНК представляющим интерес для амплификации. Праймеры связываются таким образом, что это когда происходит в локализованных участках последовательности нуклеиновой кислоты в результате полимеризации приводит к производству одного или нескольких ампликонов (амплифицированных целевых сегментов ДНК). В настоящем изобретении применение праймеров, сконструированных для связывания с уникальными сегментами ДНК объекта сои MON87751 в конкретном биологическом образце и, амплификация конкретных ампликонов, содержащих один или более сегментов сплайсинга, описанных в данном документе, и обнаружение и/или характеристика таких ампликонов после завершения или прекращения реакции полимеризации, является маркером наличия ДНК объекта сои MON87751 в конкретном образце. Специалистам в данной области хорошо знаком с этим методом амплификации и перечисление особенностей амплификации не требуется в настоящем документе. Растения сои, клетки растения сои, ткани растения сои и семена сои по настоящему изобретению могут быть устойчивы к поражению чешуекрылыми насекомыми-вредителями, включающими без ограничения *Chrysodeixis* spp., *Spodoptera* spp., *Helicoverpa* spp., *Crociosema* spp., *Rachiplusia* spp., *Anticarsia* spp., *Elasmopalpus* spp. и *Plathypena* spp. Устойчивость к поражению видами отряда чешуекрылых возникает в связи с экспрессией двух различных сегментов ДНК, кодирующих два различных инсектицидных белка, которые функционально и ковалентно связаны в пределах встроенной трансгенной ДНК: экспрессии белка Cry2Ab из экспрессионной кассеты на 5' проксимальном конце встроенной трансгенной ДНК, в порядке, предусмотренном SEQ ID №:10 и проиллюстрирован на фиг. 2; и экспрессии белка Cry1A. 105 из экспрессионной кассеты на 3' конце встроенной трансгенной ДНК в порядке, предусмотренном SEQ ID №:10 и проиллюстрирован на фиг. 2. Cry2Ab белок экспрессируется AT.Акт2 промотором, а Cry1A. 105 экспрессируется At.RbcS4 промотором. Белки Cry2Ab и Cry1A. 105 представляют собой токсичные для видов чешуекрылых насекомых-вредителей агенты.

Конструкт, используемый для создания объекта сои MON87751 содержит промоторы, управляющие экспрессию Cry2Ab и Cry1A. 105 белков, расположенные относительно последовательно транскрипции так, что экспрессия от каждого промотора соответствующего Cry белка происходит в том же направлении, но у каждого отдельно с соответствующим промотором (см. фиг. 2). Других конструктов, которые были оценены отличались комбинациями использованных элементов экспрессии, т.е., энхансер (E), промотор (P), лидер (L), интроны (I), хлоропласт-нацеленный пептид (СТР) и 3'НТО (Т). Также конструкты содержат или векторный стек обоих Cry белков (Cry2Ab и Cry1A. 105), или содержат один Cry

белок, т.е., Cry2Ab или Cry1A. 105. Дальнейшее изменение в экспрессионных конструктах было относительной ориентацией двух кассет для Cry белков в векторном стеке конструктов. В частности, две кассеты были или в последовательной ориентации транскрипции, или две кассеты были в противоположной ориентации, так что экспрессия от каждого промотора двух Cry белков находится отдельно от точки по центру между двух промоторов, т.е., транскрипция каждой экспрессионной кассеты происходит в противоположном направлении и не сходит с другой. Последовательность ДНК кодирующая Cry1A. 105 варьировала в некоторых конструктах относительно последовательности трансгена встроенного в объект MON87751. Наконец, в двух конструктах с двумя экспрессионными кассетами Cry ориентированными в обратном направлении транскрипции, энхансеры транскрипции были расположены между расходящимися промоторами (см. фиг. 2).

Объект MON87751 был выбран на основании сравнения с тысячами различных независимых трансгенных объектов, каждый трансформированный одним из конструктов, содержащим сегмент Т-ДНК, как проиллюстрировано на фиг. 2, и каждого с объектом MON87701 и/или объектом GM\_A19478 (сконструированным одновременно с MON87701, оба экспрессируют Cry1Ac); с трансгенным объектом 40-3-2 (отвечающим за толерантность к гербициду глифосат); и нетрансгенными контрольными растениями сои (A3555 или A5547). Результаты как представленных ниже в примерах, показано, что объект MON87751 демонстрировал превосходные свойства благодаря экспрессии Cry2Ab и Cry1A. 105 белков. Множество трансгенных объектов созданных с использованием конструкта, который используется для создания объекта MON87751 были предпочтительнее других объектов, созданных с другими конструктами в демонстрации эффективного контроля чешуекрылых насекомых-вредителей.

Растения сои и их части, включая семена, каждый из которых содержит ДНК, соответствующее объекту MON87751, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Такие растения и их части, включая семена, устойчивы к поражению чешуекрылыми. В некоторых вариантах такие растения и семена включают гибриды и инбриды, и растения, и семена, которые содержат только одну аллель объекта MON87751, т.е., геном характеризующийся как гетерозиготный по отношению к локусу ДНК, соответствующему объекту MON87751. Такие гибриды могут быть получены путем скрещивания растений, содержащих объект MON87751 с желаемой зародышевой плазмой в рамках процесса развития коммерческого разнообразия и других сельскохозяйственно-желательных свойств сои. Гибриды могут быть получены любыми способами, но предпочтительный способ использует преимущественно первых инбридных (гомозиготных) родителей, содержащих конкретную аллель объекта MON87751 в обеих хромосомах в локусе, в котором встроено ДНК объекта MON87751, и скрещиванием первого инбрида со вторым инбридом, который не содержит ДНК MON87751. Обе родительские инбридные разновидности будут иметь одно или более выгодное свойство желательное в продуцируемом семени, т.е. гибридном семени, и это гибридное семя является гетерозиготным по аллелю объекта MON87751.

Трансгенное свойство или аллель обеспечивающий некоторые дополнительные качества растению, содержащему ДНК объекта MON87751, могут быть желательными. Другие такие трансгенные аллели, обеспечивающие желательные качества, могут включать устойчивость к гербицидам: GTS 40-3-2, MON87708, MON89788, A2704-12, A2704-21, A5547-35, A5547-127, BPS-CV127-9, DP356043, GU262, W62, W98, DAS-44406-6, DAS-68416-4, FG72, BPS-CV127-9, SYHT04R, SYHT0H2, 3560.4.3.5, EE-GM3, pDAB4472-1606, pDAB4468-0416, pDAB8291.45.36, 127, AAD-12; устойчивостью к насекомым-вредителям: MON87701, DAS-81419-2; улучшение масличных свойств: DP-305423, G94-1, G94-19, G168, OT96-15, MON87705, MON87769; увеличение урожайности: MON 87712, или черты фиксации азота, черты, регулирующие водный обмен, устойчивость к поражению грибами, устойчивость к поражению нематодами и тому подобные. Нетрансгенные свойства (т.е., ЛКП или группа спелости) может также обеспечивать желательную черту и специалист в данной области знает как скрестить сою для сочетания данного нетрансгенной черты и ДНК объекта MON87751. Вышеизложенные и другие аспекты изобретения станут более очевидными из последующего подробного описания.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение взаимного расположения, проиллюстрированное каждой горизонтальной линией, сегментов гетерологичных трансгенных ДНК, фланкирующей геномной ДНК, произвольно сконструированных 5' и 3' геномных/встроенных участков сплайсинга ДНК, и относительные положения последовательности, уникальной для объекта MON87751 внутри гетерологичных трансгенных ДНК, которые могут быть использованы в качестве маркера объекта сои MON87751; горизонтальные линии помеченные как [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25] и [26] соответствуют SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26, соответственно; горизонтальная линия с толстой полосой представляет комплекс гетерологичной трансгенной ДНК, встроенной в объект MON87751 (SEQ ID №:9) и обеих 5' и 3' фланкирующих геномных ДНК и представляет собой SEQ ID №:10 содержащую SEQ ID №:7, SEQ ID №:9, и SEQ ID №:8; толстые горизонтальные стрелки обозначают SQ26901, SQ20267, SQ25826 и SQ27115, соответствующие SEQ ID №:15, SEQ ID №:11, SEQ ID №:12 и SEQ ID №:14 соответственно; тонкие гори-

зонтальные стрелки представляют относительную организацию двух отдельных экспрессионных кассет встроенной гетеологической трансгенной ДНК объекта MON87751, Р представляет промотор, L представляет лидер, Р-L представляют промотор и лидер, I представляет интрон, СТР представляет транзитный белок хлоропласта, Cry2Ab представляет кодирующий участок белка Cry2Ab, T=3' элемент терминирования транскрипции и полиаденилирования (3' UTR) и Cry1A. 105 представляет кодирующий участок белка Cry1A.105.

Фиг. 2 демонстрирует сегмент Т-ДНК, кодирующий экспрессионную кассету(ы) Cry белка в одиннадцати трансформационных конструктах, используемых для создания трансгенных объектов сои апробированных при отборе объекта сои MON87751, и композицию каждой экспрессионной кассеты Cry белка с каждым конструктом.

Фиг. 3 представляет собой графическое изображение результатов ИФА экспрессии Cry белка в объектах, созданных с конструктом 1, конструктом 2 и конструктом 3, в сравнении с нетрансгенной линией сои (А3555). Панель А. демонстрирует уровни Cry2Ab белка в тканях листьев, собранных на этапах роста растения R1 и R3. Панель В. демонстрирует уровни Cry1A. 105 белка в тканях листьев, собранных на этапах роста растения R1 и R3.

Фиг. 4 представляет собой графическое изображение результатов ИФА экспрессии Cry белка в объектах, созданных с конструктом 1, конструктом 5, конструктом 6 и конструктом 4, в сравнении с нетрансгенной линией сои (А3555). Панель А. демонстрирует уровни Cry2Ab белка в тканях листьев, собранных на этапе роста растения R3 от растений, выращенных в условиях двух отдельных теплиц. Панель В. демонстрирует уровни Cry1A. 105 белка в тканях листьев, собранных на этапе роста растения R3 от растений, выращенных в условиях двух отдельных теплиц.

Фиг. 5 представляет собой графическое изображение результатов ИФА экспрессии Cry2Ab белка в объектах, созданных с конструктом 1, конструктом 2, конструктом 3, конструктом 4, конструктом 5, конструктом 6, конструктом 9, конструктом 7 и конструктом 11 в образцах листьев собранных на этапах роста растения R3 и R5.

Фиг. 6 представляет собой графическое изображение результатов ИФА экспрессии Cry21A.105 белка в объектах, созданных с конструктом 1, конструктом 2, конструктом 3, конструктом 4, конструктом 5, конструктом 6, конструктом 9, конструктом 7 и конструктом 11 в образцах листьев собранных на этапах роста растения R3 и R5. На панели А по оси Y представлена сухая масса 0-5000 м.д., а на панели В по оси Y представлена сухая масса 0-500 м.д. для лучшего представления на панели В данных для этапа R3.

#### **Краткое описание последовательностей**

SEQ ID №:1 представляет собой последовательность двадцати нуклеотидов, представляющую 5' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:1 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 1325-1344.

SEQ ID №:2 представляет собой последовательность двадцати нуклеотидов, представляющую 3' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:2 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 11444-11463.

SEQ ID №:3 представляет собой последовательность шестидесяти нуклеотидов, представляющую 5' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:3 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 1305-1364.

SEQ ID №:4 представляет собой последовательность шестидесяти нуклеотидов, представляющую 3' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:4 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 11424-11483.

SEQ ID №:5 представляет собой последовательность ста нуклеотидов, представляющую 5' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:5 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 1285-1384.

SEQ ID №:6 представляет собой последовательность ста нуклеотидов, представляющую 3' участок сплайсинга геномной ДНК сои и встроенную трансгенную экспрессионную кассету. SEQ ID №:6 расположен в SEQ ID №:10 в нуклеотидной позиции 11404-11503.

SEQ ID №:7 представляет собой последовательность 1626 нуклеотидов, представляющую 5' фланкирующую геномную последовательность ДНК сои включительно, и содержит соединение геномной ДНК и встроенной трансгенной ДНК, и включает (с 5' по 3') 1334 фланкирующей геномной ДНК и 292 нуклеотида произвольно сконструированного 5' конца встроенной трансгенной ДНК.

SEQ ID №:8 представляет собой последовательность 1452 нуклеотидов, представляющую фланкирующую геномную последовательность ДНК сои включительно и содержит соединение геномной ДНК и встроенной трансгенной ДНК, и включает (с 5' по 3') 265 нуклеотидов произвольно сконструированного 3' конца встроенной трансгенной ДНК и 1187 нуклеотидов 3' фланкирующей геномной ДНК.

SEQ ID №:9 представляет собой последовательность 10119 нуклеотидов, соответствующую трансгенной ДНК встроенной в геном объекта сои MON87751.

SEQ ID №:10 представляет собой последовательность 12640 нуклеотидов, соответствующую составной нуклеотидной последовательности трансгенной ДНК встроенной в геном объекта MON87751 и 5' фланкирующей последовательности нуклеотидов геномной ДНК и 3' фланкирующей последовательности

сти нуклеотидов геномной ДНК и содержащей SEQ ID №:7 и SEQ ID №:9, и SEQ ID №:8.

SEQ ID №:11 представляет собой последовательность 27 нуклеотидов, соответствующую термальному праймеру амплификации под названием SQ20267, используемому для определения ДНК объекта MON87751 в образце, и является идентичным последовательности нуклеотидов соответствующей позициям 11400-11426 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:12 представляет собой последовательность 26 нуклеотидов, соответствующую термальному праймеру амплификации под названием SQ25826, используемому для определения ДНК объекта MON87751 в образце, и является идентичным обратному комплементу последовательности нуклеотидов, соответствующей позициям 11454-11479 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:13 представляет собой последовательность 19 нуклеотидов, соответствующую зонду под названием PB10263, используемому для определения ДНК объекта MON87751 в образце, и является идентичным последовательности нуклеотидов соответствующей позициям 11428-11446 в SEQ ID №: 10.

SEQ ID №:14 представляет собой последовательность 24 нуклеотидов, соответствующую термальному праймеру амплификации под названием SQ27115, используемому для определения присутствия аллели ДНК сои дикого типа и/или ДНК объекта сои MON87751 в образце, и является идентичным обратному комплементу последовательности нуклеотидов, соответствующей позициям 11458-11481 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:15 представляет собой последовательность 30 нуклеотидов, соответствующую термальному праймеру амплификации под названием SQ26901 используемому в анализе зиготности для определения присутствия аллели ДНК сои дикого типа в образце, полученном из сои, и является идентичным последовательности нуклеотидов, соответствующей позициям 1288 - 1317 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:16 представляет собой последовательность 18 нуклеотидов, соответствующую зонду под названием PB11254, и используется в анализе зиготности для определения присутствия аллели ДНК сои дикого типа в образце, полученном из сои.

SEQ ID №:17 представляет собой последовательность 112 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и является идентичной позициям 36-147 в SEQ ID №:9, и позициям 1370-1481 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:18 представляет собой последовательность 52 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и является идентичной позициям 1305-1356 в SEQ ID №:9, и позициям 1639-1690 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:19 представляет собой последовательность 283 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и является идентичной позициям 1561-1843 в SEQ ID №:9, и позициям 2895-3177 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:20 представляет собой последовательность 486 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и является идентичной позициям 2340-2825 в SEQ ID №:9, и позициям 3674-4159 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:21 представляет собой последовательность 179 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и является идентичной позициям 3326-3504 в SEQ ID №:9, и позициям 4660-4838 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:22 представляет собой последовательность 106 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ №:9), встроенной в объект сои MON87751, и применяется для определения объекта MON87751 в образце, и является идентичной позициям 3749-3854 в SEQ ID №:9, позициям 5083-5188 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:23 представляет собой последовательность 60 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и применяется для определения объекта MON87751 в образце, и является идентичной позициям 9320-9379 в SEQ ID №:9 и позициям 10654-10713 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:24 представляет собой последовательность 66 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и применяется для определения объекта MON87751 в образце, и является идентичной позициям 9620-9685 в SEQ ID №:9, и позициям 10954-11019 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:25 представляет собой последовательность 156 нуклеотидов, соответствующую уникальной последовательности нуклеотидов в трансгенной ДНК (SEQ ID №:9), встроенной в объект сои MON87751, и применяется для определения объекта MON87751 в образце, и является идентичной позициям 9720-9875 в SEQ ID №:9, и позициям 11054-11209 в SEQ ID №:10.

SEQ ID №:26 представляет собой последовательность 1905 нуклеотидов, соответствующую открытой рамке считывания кодирующей белок Cту2Ab, экспрессируемый в объекте сои MON87751.

### Подробное описание

Изобретатели определили трансгенный объект сои MON87751 который проявляет коммерчески приемлемую устойчивость к важным для сельского хозяйства насекомым-вредителям отряда Чешуекрылые, таким как *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка, FAW), *Spodoptera eridania* (южная совка, SAW), *Spodoptera exigua* (совка малая, BAW), *Spodoptera ornithogalli* (желтополосатая совка, YSAW), *Crociosema arorema* (моль побеговая фосолиевая, BSM), *Rachiplusia* пи (пяденица подсолнечниковая, SFL), *Anticarsia gemmatalis* (гусеница бархатных бобов, VBC), *Chrysodeixis includens* (металловидка соевая, SBL), *Helicoverpa zea* (гусеница совки хлопковой, SPW), *Helicoverpa gelotopon* (южноамериканская хлопковая моль), *Elasmopalpus lignosellus*, (огневка кукурузная стеблевая малая), *Estigmene acrea*, и *Plathypena scabra*, среди других. Объект обеспечивает две различных функционально связанных экспрессионных кассеты, одна кодирует Cry2Ab, а другая - Cry1A. 105 инсектицидные белки, и обеспечивает две различных формы устойчивости сои к поражению чешуекрылыми. Другие трансгенные объекты сои известные в данной области техники, т.е. MON 88701, который экспрессирует токсический белок Cry1Ac Bacillus thuringiensis (Bt) (MacRae et al. 2005, Fischhoff & Perlak 1995). MON 88701 обеспечивает одну форму устойчивости к большинству чешуекрылых насекомым-вредителей сои, хотя эффективность в отношении *Spodoptera* spp. не существенна. Было бы желательно обеспечить трансгенную сою экспрессирующую два или более различных инсектицидных белка, проявляющих эффективность к большинству вредителей сои и в том числе контролирующих *Spodoptera* spp. Изобретатели представили по меньшей мере одно решение данной проблемы в виде объекта сои MON87751, который объединяет две ковалентно связанные экспрессионные кассеты в одном локусе в геноме сои, эти кассеты обеспечивают признаки расширенного сопротивления к видам чешуекрылых, и дополнительно, обеспечивают клетки сои, ткани сои, листья сои, бобы сои, семена сои и растения сои более чем одной формой действия для предотвращения или отсрочки развития резистентности среди видов отряда Чешуекрылые.

Объект сои MON87751 был создан путем *Agrobacterium* опосредованной трансформации меристематической ткани сои плазмидным конструктом 1. Данный плазмидный конструкт содержит два участка, каждый ограничен пограничным сегментом *Agrobacterium* (Т-ДНК сегмент). Первый сегмент Т-ДНК содержит две связанных растительных экспрессионных кассеты, одна экспрессионная кассета кодирует селективируемый маркер, а другая экспрессионная кассета кодирует маркер подсчета трансформантов. Второй сегмент содержит две связанных растительных экспрессионных кассеты с регуляторными генетическими элементами необходимыми для экспрессии двух инсектицидных белков Cry2Ab и Cry1A. 105 в клетках растений сои. Благодаря двум сегментам Т-ДНК в плазмидном конструкте 1, т-сегмент ДНК, содержащий селективируемый/оценочный маркерные гены вставленные случайным образом в геном сои в сайт, отдельный от сайта интеграции сегмента Т-ДНК, содержащий экспрессионные кассеты Cry2Ab и Cry1A. 105, таким образом позволяя разделить два сегмента Т-ДНК в геноме трансформированных растений сои в процессе самоопыления и/или обратного скрещивания, например скрининга R1 и дальнейших поколений трансгенных растений. Трансформированные клетки сои регенерировали в интактное растение сои и отдельные растения были отобраны из популяции растений, которые протестировали целостность второго сегмента Т-ДНК, кодирующего белки Cry2Ab и Cry1A. 105. В R1 и последующих поколениях, объекты были отобраны на основании целостности второго сегмента Т-ДНК, кодирующего белки Cry2Ab и Cry1A. 105, и отсутствии (т.е. сегрегации) первого сегмента Т-ДНК, кодирующего селективируемый/оценочный маркерные кассеты, и растений, не содержащих любую плазмидную последовательность. Экспрессия инсектицидных токсичных белков Cry2Ab и Cry1A. 105 в клетках объекта сои MON87751 обеспечивает устойчивость к чешуекрылым насекомым-вредителям когда клетки объекта сои MON87751 попадают в рацион насекомых.

Плазмидная ДНК, встроенная в геном объекта сои MON87751, была охарактеризована с помощью детальных молекулярных анализов. Эти анализы включали: количество встраиваний (количество сайтов интеграции в геном сои), геномная позиция встраивания (конкретное место в геноме сои, где произошло встраивание), количество копий (количество копий Т-ДНК в пределах одного локуса), и целостность встроенной трансгенной ДНК. Плазмидный конструкт содержащий две связанные экспрессионные кассеты встроенные в геном сои, дающий начало объекту MON87751, содержит множество сегментов (последовательности сращивания между элементами используемые для создания или конструирования нескольких экспрессионных кассет) которые не встречаются ни в естественных условиях в геноме сои, ни в других векторах или трансгенных объектах сои или при других обстоятельствах (например, последовательности в порядке, предусмотренном в SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26). Кроме того, трансформационный объект, дающий начало встроенной трансгенной ДНК в объекте MON87751 характеризуется в настоящем документе как инсерция в единственный локус в геноме сои, что приводит к двум новым локусам или связующим последовательностям между встроенной ДНК и геномной ДНК сои. Также в настоящем документе характеризуются дополнительные уникальные последовательности в пределах гетерологичной ДНК встроенной в геном сои объекта MON87751 и которые имеют достаточную длину, чтобы быть уникальным только для генома сои, содержащего ДНК объ-

екта MON87751. Эти связующие последовательности используются для обнаружения наличия ДНК объекта MON87751 в клетках сои, тканях сои, семенах сои, растениях сои или продуктах из растений сои (товарные продукты из сои). Молекулярные ДНК зонды и пары праймеров описанные в настоящем документе, были разработаны для использования при выявлении присутствия этих различных связующих сегментов в биологических образцах, содержащих или предположительно содержащих клетки сои, семена сои, части растений сои или растительные ткани сои, которые содержат ДНК объекта MON87751. Данные демонстрируют, что объект MON87751 содержит одну вставку Т-ДНК с одной копией встроенной трансгенной ДНК. Никаких дополнительных элементов от трансформационного конструкта 1 отличные от частей левого и правого пограничных участков *Agrobacterium tumefaciens* использованных для трансгенного переноса ДНК от трансформирующей растения плазмиды в геном сои не было выявлено в ДНК объекта MON87751. Наконец, была проведена диагностика при помощи тепловой амплификации, создающей специфические ампликоны на наличие такой ДНК объекта MON87751 в образце, и был проведен анализ последовательности ДНК, для определения произвольно заданных 5' и 3' вставок в растительном геноме, подтверждения организации элементов внутри вставки, и определения полной последовательности ДНК встроенной трансгенной ДНК (SEQ ID №:9) в объекте сои MON87751.

Десятки трансгенных объектов были получены с использованием трансформационного конструкта 1, использованным для получения трансгенного объекта сои MON87751, и десять дополнительных трансформационных конструктов были созданы и использованы для производства многих десятков других трансгенных объектов сои, которые были сравнены с объектом сои MON87751 и подобными объектами сои. Эти объекты были протестированы методом ИФА на экспрессию в ткани листа двух инсектицидных белков Cry2Ab и Cry1A. 105. Подмножество объектов созданных для каждой трансформации, и большинство конструктов, были протестированы на эффективность контроля чешуекрылых насекомых-вредителей в условиях мелкоделяночных теплиц. Было установлено, что растительные экспрессионные элементы и относительная ориентация экспрессионных кассет Cry2Ab и Cry1A. 105 в трансформационном конструкте 1 обеспечивало объект с наилучшей эффективностью против протестированного широкого спектра чешуекрылых насекомых-вредителей. Если не указано иное в настоящем документе, термины следует понимать в соответствии с традиционным использованием, которое подразумевается обычным специалистом в данной области техники. Значения общих терминов в молекулярной биологии могут также быть найдены в Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; and Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994. Используемый в настоящем документе термин "соя" означает *Glycine max* и включает все разновидности растения, которые могут быть скрещены с растениями сои, содержащими ДНК объекта MON87751, включая дикие виды сои, а также те растения относящиеся к роду *Glycine* и способные к межвидовому скрещиванию. Используемый в настоящем документе термин "содержит" означает "включает без ограничения".

Настоящее изобретение обеспечивает трансгенные растения, которые были трансформированы при помощи ДНК конструкта, содержащего по крайней мере две экспрессионные кассеты; первая экспрессионная кассета экспрессирует токсичные количества инсектицидного белка Cry2Ab, а вторая экспрессионная кассета экспрессирует токсичные количества инсектицидного белка Cry1A. 105. Под токсичным количеством подразумевается эффективное количество, инсектицидное количество, эффективное инсектицидное количество, инсектицидно эффективное количество, подавляющее количество в отношении целевого насекомого, эффективное пестицидное количество, количество в рационе насекомых отряда Чешуекрылые, которое является инсектицидным, и другие подобные термины, которые подразумеваются обычным специалистом в данной области техники. Растения сои трансформированные в соответствии со способами, и с помощью ДНК конструктов, описанных в настоящем документе, являются устойчивыми к чешуекрылым насекомым-вредителям. Связанные хозяйственно-ценные признаки обеспечивают легкость в поддержании эти признаков в скрещиваемой популяции, и проявляют устойчивость к более широкому спектру чешуекрылых насекомых-вредителей, чем растения, содержащие только один ген обеспечивающий устойчивость к чешуекрылым насекомым-вредителям ( т.е. Cry1Ac).

Трансгенное "растение" получают путем трансформации клеток растения гетерологичной ДНК, т.е., полинуклеиновым конструктом, который включает ряд эффективных интересующих функций; регенерацию растения в результате вставки трансгена в геном растительной клетки, и выбор конкретного растения характеризующегося инсерцией в конкретное место генома и числом эффективных функций регенерированного трансгенного растения. Термин "объект" относится к ДНК из исходного трансформанта, содержащую встроенную ДНК и фланкирующую геномную последовательность, непосредственно граничащую со встроенной ДНК. Такая ДНК является уникальной и, как ожидается, будет передана потомству, которое получит встроенную ДНК, содержащую интересующий трансген как результат полового скрещивания одной родительской линии, что содержит встроенную ДНК ( например, исходного трансформанта и потомства в результате самоопыления) и родительской линии, которая не содержит встроенную ДНК. Настоящее изобретение также обеспечивает оригинальное растение-трансформант и потомство трансформанта, которое содержит гетерологичную ДНК. Такое потомство может быть произведено с помощью полового ауткрасса между растениями, содержащими объект и другими растениями у которых потомство содержит гетерологичную ДНК. Даже после повторного обратного скрещивания для рекур-

рентных родителей, объект присутствует в потомстве скрещивания в той же хромосомной позиции. Настоящее изобретение относится к трансгенному объекту, растению сои, содержащему MON87751, их потомству, и композициям ДНК содержащимся в них.

"Зонд" представляет собой изолированную нуклеиновую кислоту, к которой может быть прикреплена обычная обнаруживаемая метка или репортерная молекула, например радиоактивный изотоп, лиганд, хемиллюминесцентный агент или фермент. Такой зонд является комплементарным нити нуклеиновой кислоты мишени, в случае настоящего изобретения, к нити ДНК из MON87751 или MON87751 содержащихся в растении или из образца, который содержит ДНК MON87751. Зонды согласно настоящему изобретению включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, а также полиамиды и другие материалы зонда, которые связываются конкретно с последовательностью-мишенью ДНК, и могут быть использованы для обнаружения присутствия последовательности-мишени ДНК.

ДНК праймеры представляют собой изолированные полинуклеиновые кислоты, которые крепятся на комплементарную нить-мишень ДНК путем гибридизации нуклеиновых кислот образуя гибрид между праймерной и целевой ДНК, затем удлиняясь по ДНК-мишени с помощью полимеразы, например ДНК-полимеразы. Пара ДНК-праймеров или набор ДНК-праймеров по настоящему изобретению относятся к двум ДНК-праймерам используемым для амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты, например путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) или другими обычными методами амплификации полинуклеиновых кислот. ДНК-зонды и ДНК-праймеры могут быть 11 или больше полинуклеотидов в длину, или могут быть 18 полинуклеотидов или больше, 24 полинуклеотида или больше, или 30 полинуклеотидов или больше. Такие зонды и праймеры выбираются так, чтобы быть достаточной длины, чтобы гибридизоваться специфически с последовательностью-мишенью в особо жестких условиях гибридизации. Предпочтительно зонды и праймеры по настоящему изобретению имеют полное подобие с последовательностью-мишенью, хотя зонды, отличающиеся от последовательности-мишени, которые сохраняют способность к гибридизации с последовательностью-мишенью могут быть сконструированы обычными методами.

Праймеры и зонды на основе фланкирующей геномной ДНК и встроенные последовательности, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для подтверждения (и, при необходимости, исправления) представленных последовательностей ДНК обычными способами, например путем повторного клонирования и секвенирования таких молекул ДНК.

Нуклеиновые кислоты-зонды и праймеры по настоящему изобретению гибридизуются в жестких условиях с молекулой-мишенью ДНК. Любые обычные способы гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот могут быть использованы для определения присутствия ДНК трансгенного растения в образце. Молекулы полинуклеиновых кислот также относятся к сегментам нуклеиновой кислоты или ее фрагментам способным специфически гибридизоваться с другими молекулами нуклеиновых кислот при определенных обстоятельствах. Используемые в настоящем документе, две молекулы полинуклеиновой кислоты называются, способные специфически гибридизоваться друг с другом, если две молекулы способны образовывать антипараллельную, двухцепочечную структуру нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты является "комплементарной" другой молекуле нуклеиновой кислоты, если они проявляют полную комплементарность. Используемые в настоящем документе молекулы, проявляющие "полную комплементарность", таковы, когда каждый нуклеотид одной из молекул комплементарен нуклеотиду другой. Две молекулы являются "минимально комплементарными" если они гибридизуются друг с другом с достаточной стабильностью, что позволяет им оставаться сцепленными друг с другом, при по меньшей мере, обычных условиях "пониженной жесткости". Аналогично, молекулы, называются "комплементарными", если они гибридизуются друг с другом с достаточной стабильностью, что позволяет им оставаться сцепленными друг с другом, при по меньшей мере, обычных условиях "повышенной жесткости". Обычные условия повышенной жесткости описаны Sambrook et al., 1989, и Haymes et al., в *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Вашингтон, Колумбия (1985). Отклонения от полной комплементарности допустимо, до тех пор, пока такие отклонения не исключают полностью способность молекул образовывать двухцепочечные структуры. Для того, чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила в качестве праймера или зонда, ей необходимо быть достаточно комплементарной последовательности, чтобы быть в состоянии сформировать стабильную двухцепочечную структуру в условиях конкретного растворителя и концентрации соли.

Используемая в настоящем документе, по существу, гомологичная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизуются с комплементом последовательности нуклеиновой кислоты с которым она сравнивается при условиях высокой жесткости. Соответствующие жесткие условия, обеспечивающие гибридизацию ДНК, например,  $6,0 \times$  хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при температуре около  $45^{\circ}\text{C}$ , с последующим промыванием  $2,0 \times$  SSC при  $50^{\circ}\text{C}$ , известны специалистам в данной области или могут быть найдены в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Например, концентрация соли при промывании может быть выбрана из от пониженной жесткости около  $2,0 \times$  SSC при  $50^{\circ}\text{C}$  до повышенной жесткости около  $0,2 \times$  SSC при  $50^{\circ}\text{C}$ . Кроме того температура при промывании может быть увеличена от условий

пониженной жесткости при комнатной температуре, примерно 22°C, до условий повышенной жесткости при около 65°C. Могут меняться как температура, так и концентрация соли, или концентрация соли, или температура остаются константными при изменении другой переменной. В предпочтительном варианте реализации полинуклеиновая кислота по настоящему изобретению будет конкретно гибридизировать с одной или более молекулами нуклеиновой кислоты, изложенными в SEQ ID №: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, или их комплементарными, или фрагментами в умеренно жестких условиях, например при около 2,0 × SS и около 65°C. В особенно предпочтительном варианте реализации нуклеиновая кислота по настоящему изобретению будет конкретно гибридизировать с одной или более молекулами нуклеиновой кислоты, изложенными в SEQ ID №: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24, или их комплементарными, или фрагментами в особо жестких условиях. В одном аспекте настоящего изобретения, предпочтительная маркерная молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения имеет последовательность нуклеиновых кислот, изложенную в SEQ ID №:1 или SEQ ID №:2, или SEQ ID №:3, или SEQ ID №:4, или SEQ ID №:5, или SEQ ID №:6, или SEQ ID №:7, или SEQ ID №:8, или SEQ ID №:9, или SEQ ID №:10; или SEQ ID №:17, или SEQ ID №:18, или SEQ ID №:19, или SEQ ID №:20, или SEQ ID №:21, или SEQ ID №:22, или SEQ ID №: 23, или их комплементарными, или их фрагменты. Гибридизация зонда к молекуле-мишени ДНК может быть обнаружена с помощью множества методов, известных специалистам в данной области техники, они могут включать, но не ограничиваются, флуоресцентные метки, радиоактивные метки, метки на основе антител и хемилюминесцентные метки.

Что касается амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты (например с помощью ПНР) с использованием определенной пары праймеров амплификации, "жесткие условия" представляют собой условия, которые позволяют паре праймеров гибридизировать только с последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты, с которой праймер, имеющий соответствующую последовательность дикого типа (или ее комплементарный) свяжется и желательным образом произведет уникальный продукт амплификации, ампликон в термической реакции амплификации ДНК. Термин "специфический для (последовательности-мишени)" указывает на то, что зонд или праймер гибридизуются в жестких условиях гибридизации только с последовательностью-мишенью в образце, содержащем последовательность-мишень. Используемые в настоящем документе, "амплифицированная ДНК" или "ампликон" относятся к продукту метода амплификации полинуклеиновой кислоты направленного на молекулу-мишень полинуклеиновой кислоты, которая является частью матрицы полинуклеиновой кислоты. Например, чтобы определить, содержит ли растение сои в результате полового скрещивания трансгенную растительную геномную ДНК из растения сои, содержащего объект MON87751 по настоящему изобретению, ДНК, извлеченная из образца растительных тканей сои может быть подвергнута методу амплификации полинуклеиновой кислоты с использованием пары праймеров, включающих первый праймер, полученный от последовательности геномной ДНК в области, примыкающей к гетерологичной встроенной ДНК объекта MON87751 и удлиненной полимеразой в 5' к 3' направлении встроенной ДНК. Второй праймер получен из гетерологичной встроенной молекулы ДНК и удлиненной полимеразой в 5' к 3' направлении фланкирующей геномной ДНК, из которой получен первый праймер. Ампликон может различаться в длину от суммарной длины пары праймеров плюс одна пара азотистых оснований, или плюс примерно пятьдесят пар азотистых оснований, или плюс около двухсот пятидесяти пар азотистых оснований, или плюс около четырехсот пятидесяти пар азотистых оснований или больше. Кроме того, пары праймеров могут быть получены из геномной последовательности по обе стороны встроенной гетерологичной ДНК, так как для производства ампликона, содержащего всю встроенную полинуклеотидную последовательность (например прямого праймера изолированного из геномного участка на 5' SEQ ID №:10 и обратного праймера изолированного из геномного участка на 3' конце SEQ ID №:10, что амплифицирует молекулу ДНК содержащую встроенную гетерологичную последовательность ДНК (SEQ ID №:9), определенную в настоящем документе, в геноме, содержащем MON87751). Член пары праймеров, полученный из растительной геномной последовательности смежной со встроенной трансгенной ДНК находится на расстоянии от встроенной последовательности ДНК, это расстояние может составлять от одной пары азотистых оснований до около двадцати тысяч пар азотистых оснований. Использование термина "ампликон" специфически исключает димеры праймеров, которые могут быть образованы в термальной реакции амплификации ДНК.

Для практических целей следует конструировать праймеры, которые производят ампликоны в ограниченном диапазоне размеров, например от 100 до 1000 оснований. Ампликоны меньшего (короче полинуклеотидной длины) размера в целом более надежно производятся в термальных реакциях амплификации, что позволяет сократить время цикла, и могут быть легко разделены и визуализированы на агарозном геле или адаптированы для использования в конечных TAQMAN®-подобных анализах. Меньшие ампликоны могут быть произведены и обнаружены с помощью способов, известных в области обнаружения ДНК ампликонов. Кроме того, ампликоны, полученные с использованием пар праймеров могут быть клонированы в векторы, размножены, изолированы и секвенированы или могут быть секвенированы непосредственно с использованием методов хорошо известных в данной области техники. Любая пара праймеров получена от комбинации SEQ ID №:7 и SEQ ID №:9 или комбинации SEQ ID №:8 и

SEQ ID №:9, которая пригодна в способе амплификации ДНК для получения диагностического ампликона для растений, содержащих MON87751 или их потомства, является одним из аспектов изобретения. Любая единичная изолированная полинуклеотидная молекула ДНК праймера содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID №:7, или ее комплемент, который пригоден в способе амплификации ДНК для получения диагностического ампликона для растений, содержащих MON87751 или их потомства, является одним из аспектов изобретения. Любая единичная изолированная полинуклеотидная молекула ДНК праймера содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID №:8, или ее комплемент, который пригоден в способе амплификации ДНК для получения диагностического ампликона для растений, содержащих MON87751 или их потомства, является одним из аспектов изобретения. Любая единичная изолированная полинуклеотидная молекула ДНК праймера содержащая по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов SEQ ID №:9, или ее комплемент, который пригоден в способе амплификации ДНК для получения диагностического ампликона для растений, содержащих MON87751 или их потомства, является одним из аспектов изобретения.

Амплификацию полинуклеиновых кислот можно проводить любыми способами амплификации полинуклеиновых кислот, известными в данной области техники, включая полимеразную цепную реакцию (ПНР). Способы амплификации известные в данной области техники описаны в частности, в патентах США № 4683195 и 4683202, и в протоколах ПЦР: *A Guide to Methods and Applications*, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Способы ПЦР амплификации, разработанные для амплификации до 22 т.о. (тысяч оснований) геномной ДНК и до 42 т.о. ДНК бактериофага (Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5695-5699, 1994). Эти методы, а также другие методы, известные в области амплификации ДНК могут быть использованы в практике настоящего изобретения. Последовательность гетерологичной ДНК вставки или фланкирующей геномной последовательности ДНК объекта сои MON87751 можно проверить (и исправить, если необходимо) путем амплификации таких молекул ДНК из семян сои, содержащих ДНК объекта MON87751 сои или растений сои, выращенные из семян сои, содержащих ДНК объекта MON87751 хранящихся в АТСС, имеющих номер образца РТА-120166, с использованием праймеров, полученных из последовательности, представленной в настоящем документе, стандартным ДНК секвенированием ПЦР ампликонов или клонированием фрагментов ДНК.

Диагностические ампликоны, полученные этими способами, могут выявляться с помощью множества методов. Одним из таких способов является анализ генетической информации (Nikiforov, et al. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994), в котором олигонуклеотид сконструирован, чтобы перекрыть как последовательность смежной фланкирующей геномной ДНК, так и последовательность встроенной ДНК.

Олигонуклеотид иммобилизован в лунках микротитрационного планшета. После ПЦР интересующего участка (используя один праймер во встроенной последовательности и один в смежной фланкирующей геномной последовательности), одноцепочечный продукт ПЦР может быть гибридизован с иммобилизованным олигонуклеотидом и служить в качестве матрицы для реакции удлинения цепи на одно основание с использованием ДНК-полимеразы и помечен дидезоксинуклеотид трифосфатом (ddNTP), характерным для ожидаемого следующего основания. Индикация может быть флуоресцентной или на основании ИФА. Сигнал указывает на наличие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации, и удлинения на одно основание. Другой способ представляет собой метод пиросеквенирования, описанный Winge (*Innov. Pharma. Tech.* 00:18-24, 2000). В этом способе олигонуклеотид сконструирован, чтобы перекрыть как смежную геномную ДНК, так и встроенную связку ДНК. Олигонуклеотид гибридизируется с одноцепочечным продуктом ПЦР из интересующего участка (один праймер во встроенной последовательности, а другой во фланкирующей геномной последовательности) и инкубируется в присутствии ДНК-полимеразы, АТФ, сульфурилазы, люциферазы, апиразы, аденозин 5' фосфосульфата и люциферина. DNTP добавляются индивидуально и результатом включения является световой сигнал, который измеряется. Световой сигнал указывает на наличие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации, и удлинения на одно или несколько оснований.

Флуоресцентная поляризация описанная Chen et al., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) представляет собой способ, который может быть использован для обнаружения ампликонов по настоящему изобретению. В этом способе используется олигонуклеотид, сконструированный, чтобы перекрыть как геномную фланкирующую ДНК, так и встроенную связку ДНК. Олигонуклеотид гибридизируется с одноцепочечным продуктом ПЦР из интересующего участка (один праймер во встроенной последовательности, а другой во фланкирующей геномной последовательности) и инкубируется в присутствии ДНК-полимеразы и флуоресцентно-меченного ddNTP. Удлинение на одно основание влечет за собой включение ddNTP. Включение может быть измерено с использованием флуориметра как изменение поляризации. Изменение поляризации указывает на наличие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации, гибридизации, и удлинения на одно основание.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния) описывается как способ обнаружения и количественного определения присутствия последовательности ДНК и полностью понятен в инструкции, предоставленной производителем. Вкратце, FRET олигонуклеотидный зонд сконструирован, чтобы перекрыть как геномную фланкирующую ДНК, так и встроенную связку ДНК. FRET зонд и праймеры

ПНР (один праймер во встроенной последовательности ДНК, а другой во фланкирующей геномной последовательности) проходят циклы в присутствии термостабильной полимеразы и dNTP. Гибридизация FRET зонда приводит к расщеплению и высвобождению флуоресцентного фрагмента от фрагмента гашения FRET зонда. Флуоресцентный сигнал, указывающий на наличие трансгенной/геномной последовательности вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Молекулярные маяки были описаны для обнаружения последовательностей Tuangi, et al. (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Вкратце, FRET олигонуклеотидный зонд сконструирован, чтобы перекрыть как геномную фланкирующую ДНК, так и встроенную связку ДНК. Уникальная структура FRET зонда приводит к тому, что он содержит вторичную структуру которая поддерживает флуоресцентный фрагмент и фрагмент гашения в непосредственной близости. FRET зонд и праймеры ПЦР-мостабильной полимеразы и dNTP. После успешной ПЦР амплификации, гибридизация FRET зонда с последовательно-мишенью приводит к удалению вторичной структуры зонда и пространственного разделения флуоресцентного фрагмента и фрагмента гашения. В результате возникает флуоресцентный сигнал. Флуоресцентный сигнал свидетельствует о наличии фланкирующей/трансгенной встроенной последовательности вследствие успешной амплификации и гибридизации.

Наборы обнаружения ДНК, основанные на способах амплификации ДНК, содержат молекулы ДНК праймеров, которые специфично гибридизуются с целевой ДНК и амплифицируют диагностический ампликон при соответствующих реакционных условиях. Комплект может предоставлять способ обнаружения на основе агарозного геля или любые другие способы обнаружения диагностического ампликона, которые известны в данной области техники. Наборы обнаружения ДНК могут быть разработаны с использованием композиций, раскрытых в настоящем документе и используемых для идентификации ДНК объекта сои MON87751 в образце и могут быть применены к способам скрещивания растений сои, содержащих ДНК объекта MON87751. Комплект, который содержит ДНК-праймеры, которые являются гомологичными или комплементарными любой части участка генома сои, в порядке, предусмотренном SEQ ID №:10 и любой части встроенной трансгенной ДНК, в порядке, предусмотренном SEQ ID №:10 является объектом изобретения. Молекулы ДНК могут использоваться в методах амплификации ДНК (ПЦР) или в качестве зондов в методах гибридизации полинуклеиновых кислот, т.е. Саузерн-блот и нозерн-блот.

Последовательности сращивания могут быть представлены в виде последовательности из группы, состоящей из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Например, последовательность сращивания может быть произвольно представлена нуклеотидными последовательностями, представленными как SEQ ID №:1 и SEQ ID №:2. Кроме того, последовательность сращивания может быть произвольно представлена нуклеотидными последовательностями представленными как SEQ ID №:3 и SEQ ID №:4. Кроме того, последовательность сращивания может быть произвольно представлена нуклеотидными последовательностями, представленными как SEQ ID №:5 и SEQ ID №:6. Эти нуклеотиды соединены фосфодиэфирной связью и в объекте сои MON87751 присутствуют как часть рекомбинантного генома растительной клетки. Идентификация одной или более из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26 в образце, полученном из растения сои, семени сои или части растения сои является определяющей, что ДНК была получена из объекта сои MON87751 и является маркером присутствия в образце, содержащем ДНК объекта сои MON87751. Таким образом изобретение предоставляет молекулы ДНК, которые содержат по меньшей мере одну из последовательностей ДНК, представленных как SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Любые сегменты ДНК, полученные от трансгенного объекта сои MON87751, которые достаточны, чтобы содержать по меньшей мере одну из последовательностей представленных как SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 или SEQ ID №:26 находятся в пределах объема изобретения. Кроме того, любой полинуклеотид, содержащий последовательность, комплементарную любой из последовательностей, приведенных в настоящем пункте, находятся в пределах объема изобретения.

Изобретение обеспечивает образцовые молекулы ДНК, которые могут быть использованы в качестве праймеров или зондов для детекции наличия ДНК, полученной из растений сои, содержащих ДНК объекта MON87751 ДНК в образце. Такие праймеры или зонды являются специфическими для последовательности-мишени нуклеиновой кислоты и могут быть использованы для идентификации последовательности нуклеиновой кислоты объекта сои MON87751 способами изобретения, описанных в настоящем документе.

"Праймер" может быть высокоочищенным, изолированный полинуклеотидом, сконструированным

для использования в способах связывания или гибридизации, предполагающим термическую амплификацию. Пара праймеров может быть использована с матрицей ДНК, такой как образец геномной ДНК сои, в тепловой амплификации, такой как полимеразная цепная реакция (ПЦР), для получения ампликона, где ампликон, полученный при такой бы реакции, будет иметь последовательность ДНК, соответствующую последовательности матрицы ДНК, расположенной между двумя сайтами, где праймеры гибридизуются с матрицей. Используемый в настоящем документе "ампликон" представляет собой копию куска или фрагмента ДНК, который был синтезирован с использованием методов амплификации. Ампликон по изобретению может содержать по меньшей мере одну из последовательностей, предоставленных как SEQ ID №:11 и SEQ ID №:12. Праймер, как правило, сконструирован для гибридизации нити-мишени комплементарной ДНК в виде гибрида между праймером и нитью-мишенью ДНК, и наличие праймера является точкой распознавания для полимеразы, чтобы начать достройку праймера (т.е., полимеризацию дополнительных нуклеотидов в удлиненную молекулу нуклеотидов), используя в качестве матрицы ДНК-мишень. Пары праймеров, используемые в изобретении, предназначены для обозначения использования двух праймеров, связывающихся на противоположных нитях двухцепочечного нуклеотидного сегмента с целью линейной амплификации полинуклеотидного сегмента между позициями, предназначенными для связывания отдельных членов пары праймеров, как правило, в реакции термической амплификации или другими обычными способами амплификации нуклеиновой кислоты. Образцовые молекулы ДНК, используемые в качестве праймеров, приведены в виде SEQ ID №:11, SEQ ID №:12, SEQ ID №:14 или SEQ ID №:15. Пара праймеров, представленных как SEQ ID №:11 и SEQ ID №:12, используется как первая молекула ДНК, и вторая молекула ДНК, которая отличается от первой молекулы ДНК, и обе имеют достаточную длину последовательных нуклеотидов SEQ ID №:10 для функционирования в качестве ДНК-праймеров, которые, совместно используются в реакции тепловой амплификации с матрицей ДНК, полученной из объекта сои MON87751, для получения диагностического ампликона для ДНК объекта сои MON87751 в образце.

"Зонд" представляет собой изолированную нуклеиновую кислоту, которая комплементарна цепи нуклеиновой кислоты-мишени. Зонды согласно изобретению включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, а также полиамиды и другие материалы зонда, которые связываются конкретно с последовательностью-мишенью ДНК, и обнаружение таких связываний может быть использована в распознавании, отделении, выявлении или подтверждении присутствия последовательности-мишени ДНК в конкретном образце. К зонду может быть прикреплена обычная обнаруживаемая метка или репортная молекула, например, радиоактивный изотоп, лиганд, хемиллюминесцентный агент или фермент. Образцовая молекула ДНК используемая в качестве зонда приведена в SEQ ID №: 13 и SEQ ID №: 16. Зонды и праймеры согласно изобретению могут иметь полное подобие с последовательностью-мишенью, хотя зонды, отличающиеся от последовательности-мишени, которые сохраняют способность к гибридизации с последовательностью-мишенью, могут быть сконструированы обычными методами. Для того, чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила в качестве праймера или зонда, ей необходимо быть достаточно комплементарной последовательности, чтобы быть в состоянии сформировать стабильную двухцепочечную структуру в условиях конкретного растворителя и концентрации соли. Любые обычные способы гибридизации или амплификации могут быть использованы для определения присутствия трансгенного ДНК объекта сои MON87751 в образце. Зонды и праймеры, как правило, имеют по меньшей мере приблизительно 11 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 18 нуклеотидов, по меньшей мере примерно 24 нуклеотида или по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или более в длину. Такие зонды и праймеры гибридизуются специфически с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Обычные условия повышенной жесткости описаны Sambrook et al, 1989, и Naumes et al., в: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Вашингтон, Колумбия (1985). Любые способы, раскрытые в изобретении, хорошо известные специалистам в данной области, могут использоваться для изоляции и манипуляции молекулой ДНК, или ее фрагментом, включая способ термальной амплификации. Молекулы ДНК, или их фрагменты, также могут быть получены другими способами, например, путем прямого синтеза фрагмента химическим путем, как это обычно практикуется с использованием автоматизированного синтезатора олигонуклеотидов.

Молекулы ДНК и соответствующие нуклеотидные последовательности, представленные в настоящем документе, являются поэтому пригодными для, среди прочего, выявления объекта сои MON87751, выбора разновидностей или гибридов сои, содержащих объект MON87751, обнаружения присутствия ДНК, полученной из трансгенного объекта сои MON87751 в образце, и контроля присутствия и/или отсутствия в образце объекта сои MON87751 или частей растений, полученных из растений сои, содержащих объект MON87751.

Изобретение обеспечивает растения сои, клетки растения сои, семена сои, части растений сои (такие как пыльца, семяпочка, боб, ткань цветка, ткань корня, ткань стебля и ткань листа), потомство растений сои, соевое масло, соевое вино, соевое молоко, соевый белок и товарную продукцию из сои. Такие растения сои, клетки растения сои, семена сои, части растений сои, потомство растений сои, соевое масло, соевое вино, соевое молоко, соевый белок и товарную продукцию из сои содержат детектируемое количество полинуклеотида по изобретению т.е., такое, чтобы полинуклеотид имел по меньшей мере

одну из последовательностей представленных как SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 или SEQ ID №:26. Растения сои, растительные клетки, семена, части растений, и потомство растения по изобретению могут также содержать один или более дополнительных трансгенов. Таким дополнительным трансгеном может быть любая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или молекулу РНК, обеспечивающая желаемый признак, включающий без ограничения повышенную устойчивость к насекомым-вредителям, повышение эффективности использования воды, повышение урожайности, повышенную засухоустойчивость, повышение качества семян, улучшение пищевых качеств и/или повышение толерантности к гербицидам, в которых желаемый признак измеряется по отношению к растению сои, у которого отсутствуют такие дополнительные трансгены. Изобретение обеспечивает растения сои, клетки растения сои, семена сои, части растений сои (такие как пыльца, семяпочка, боб, ткань цветка, ткань корня, ткань стебля и ткань листа), потомство растений сои, полученные от трансгенного растения сои, содержащего ДНК объекта MON87751. Репрезентативная выборка семян сои, содержащих ДНК объекта MON87751 были помещена в соответствии с будапештским договором в американскую коллекцию культур (ATCC®). Хранилище ATCC присвоило патентное обозначение РТА-120166 семени, содержащему ДНК объекта MON87751.

Изобретение предоставляет микроорганизм, содержащий молекулу ДНК, имеющей по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26, представленную в ее геноме. Примером такого микроорганизма является трансгенная растительная клетка. Микроорганизмы, такие как растительная клетка по изобретению, применяются во многих промышленных областях, включая без ограничения: (i) использование в качестве исследовательского инструмента для научных исследований и промышленных исследований; (ii) использование в культуре для производства эндогенных или рекомбинантных углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, или белковых продуктов или малых молекул, которые могут быть использованы для последующих научных исследований или в качестве промышленной продукции; и (iii) использование с современными методами культурой ткани растений, для получения трансгенных растений или растительных культур ткани, которые могут затем быть использованы для сельскохозяйственных исследований или производства. Получение и применение микроорганизмов, таких как трансгенные растительные клетки использует современные микробиологические методы и участие человека для создания рукотворного, уникального микроорганизма. В этом процессе рекомбинантная ДНК встраивается в геном растительной клетки для создания трансгенной растительной клетки, что является отдельной и уникальной по отношению к естественным растительным клеткам. Эта трансгенная растительная клетка может затем быть культивирована наподобие бактерий и дрожжевых клеток с использованием современных методов микробиологии и может существовать в недифференцированном, одноклеточном состоянии. Новая генетическая композиция и фенотип трансгенной растительной клетки представляют собой технический эффект, созданный путем интеграции гетерологичной ДНК в геном клетки. Другим аспектом изобретения является способ применения микроорганизма по изобретению. Способы использования микроорганизмов по изобретению, таких как трансгенные растительные клетки, включают: (i) способы получения трансгенных клеток путем интеграции рекомбинантной ДНК в геном клетки и затем использование этой клетки для получения дополнительных клеток, обладающих той же гетерологичной ДНК; (ii) способы культивирования клеток, содержащих рекомбинантные ДНК с использованием современных микробиологических методов; (iii) способы получения и очистки эндогенных или рекомбинантных углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, или белковых продуктов из культивируемых клеток и (iv) способы применения современных методов культивирования растительных тканей с трансгенными растительными клетками для получения трансгенных растений или культур тканей трансгенных растений. Растения по изобретению могут передавать ДНК объекта MON87751, в том числе трансген, встроенный в объект сои MON87751 потомству. Используемое в настоящем документе "потомство" включает любое растения, семя, клетку растения, и/или регенерируемую часть растения содержащую ДНК объекта MON87751, полученную из растения-предка и/или содержащую молекулу ДНК имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Растения, потомство и семена могут быть гомозиготной или гетерозиготной по отношению к трансгену. Потомство может быть выращено из семян, полученных от растения сои, содержащего объект MON87751 и/или из семян, производимых растением оплодотворенным пыльцой растения сои, содержащего объект MON87751.

Растения-потомки могут быть самоопыляющимися (также известный как "самовоспроизводящиеся") для создания истинной линии скрещивания растений, т.е. растений, гомозиготных по отношению к трансгену. Самоопыление соответствующего потомства позволяет получать растения, которые являются

гомозиготными по обоим добавленным экзогенным генам.

Кроме того, растения-потомки могут быть подвержены ауткроссингу, например скрещены с другим неродственным растением, для получения разновидностей или гибридных семян или растений. Другие неродственные растения могут быть трансгенными или нетрансгенными. Сортовые или гибридные семена или растение по изобретению могут таким образом быть получены путем полового скрещивания первого родителя, у которого отсутствует конкретная и уникальная ДНК объекта сои MON87751 со вторым родителем, содержащим объект сои MON87751, в результате чего получается гибрид, включающий специфическую и уникальную ДНК объекта сои MON87751. Каждый родитель может быть гибридным или инбридным/сортовым, до тех пор, пока как результаты скрещивания или опыления приводят к появлению растения или семени по изобретению, т.е. семя, имеющее хотя бы один аллель, содержащий ДНК объекта сои MON87751 и/или молекулу ДНК, имеющая по крайней мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Два различных трансгенных растения могут таким образом быть скрещены для получения гибридного потомства, которое содержит два независимо разделенных, добавленных, экзогенных гена. Например, MON87751 содержащий Cry2Ab и Cry1A. 105, обеспечивающие двойную форму устойчивости к насекомым у сои, могут быть скрещены с другими трансгенными растениями сои, чтобы произвести растение, имеющее характеристики обоих трансгенных родителей. Одним примером этого является скрещивание MON87751, содержащего Cry2Ab и Cry1A. 105, обеспечивающие двойную форму устойчивости к насекомым у сои с растением, имеющим один или более дополнительных признаков, таких как устойчивость к гербицидам (например объект сои MON89788 или объект сои MON 87708) и/или борьбы с насекомыми (например объект сои MON 88701), в результате чего получается потомство растений или семян, который имеет двойную форму действия устойчивости к чешуекрылым насекомым-вредителям и имеют по меньшей мере один или более дополнительный признак. Возвратное скрещивание с родительским растением и скрещивания с нетрансгенным растением, также рассматриваются, как и вегетативное размножение. Описание других способов скрещивания, которые широко применяются для различных признаков и культур могут быть найдены в одной из нескольких ссылок например, Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987). Изобретение обеспечивает часть растения, полученную из растений сои, содержащих объект MON87751. Используемая в настоящем документе "часть растения" означает любую часть растения, которая состоит из материала, полученного из растения сои содержащего объект MON87751. Части растения сои включают без ограничения пыльцу, семяпочку, боб, цветок, ткань корня или стебля, волокна и листья. Части растений могут быть жизнеспособными, нежизнеспособными, регенерируемыми, и/или нерегенерируемыми.

Изобретение обеспечивает товарный продукт, полученный из растений сои, включающих объект MON87751 и содержащих обнаруживаемое количество нуклеиновой кислоты, специфичной для объекта MON87751. Используемый в настоящем документе "сырьевой продукт" относится к любой композиции или продукту, который состоит из материала, полученного из растения сои, цельного или обработанного семени сои, одной или более клеток растения и/или частей растения, содержащих ДНК объекта сои MON87751. Товарная продукция может быть реализована потребителям и может быть жизнеспособной или нежизнеспособной. Нежизнеспособные товарные продукты включают без ограничения нежизнеспособные семена; цельные или обработанные семена; части семян и части растений; соевое масло, соевый белок, соевый шрот, соевая мука, соевые хлопья, соевые отруби, соевое молоко, соевый сыр, соевое вино, корм для животных, содержащий сою, бумагу содержащую сою, крем содержащий сою, соевую биомассу, горючесмазочные материалы, произведенные с использованием растения сои и частей растений сои. </gl> товарные продукты включают без ограничения семена, растения и растительные клетки. Растения сои, содержащие объект MON87751 могут таким образом использоваться для производства любой товарной продукции, как правило, получаемую из сои. Любой такой товарный продукт, полученный из растений сои, содержащий объект MON87751 может содержать по меньшей мере обнаруживаемое количество специфической и уникальной ДНК, соответствующей объекту сои MON87751, и в частности, может содержать определяемое количество полинуклеотида, включающего молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Любой стандартный способ обнаружения нуклеотидных молекул может быть использован, в том числе способы обнаружения раскрытые в настоящем документе. Товарный продукт входит в объем изобретения, если есть какие-либо обнаруживаемое количество молекулы ДНК, имеющей по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26 в товарном продукте.

Растения, потомство, семена, клетки растений, части растений (такие как пыльца, семяпочка, боб,

цветок, ткани корня или стебля и листья), и товарные продукты по изобретению, используются для, среди прочего, выращивания растений для получения семян и/или частей растений, содержащих объект сои MON87751 для сельскохозяйственных нужд, производство потомства, содержащего объект сои MON87751 в селекционных и исследовательских целях, использования микробиологических методов для промышленных и исследовательских применений, и продажи потребителям.

Также обеспечиваются способы получения растений сои, устойчивых к насекомым, содержащих последовательности ДНК специфические и уникальные для объекта MON87751 по изобретению. Трансгенные растения, используемые в этих способах, могут быть гомозиготными или гетерозиготными по отношению к трансгену. Растения-потомки произведенные этими способами, могут быть сортовыми или гибридными растениями; могут быть выращены из семян, произведенных растением, содержащим объект сои MON87751 и/или семян, производимых растением оплодотворенным пыльцой растения, содержащего объект сои MON87751; могут быть гомозиготными или гетерозиготными по отношению к трансгену. Растения-потомки могут быть самоопыляющимися для создания истинной линии разведения растений, т.е. растений, гомозиготных по отношению к трансгену, или альтернативно могут быть подвержены ауткроссингу, например, скрещенными с другим неродственным растением, для производства сортовых или гибридных семян или растений.

Представлены способы выявления наличия ДНК, полученной из клеток сои, ткани сои, семени сои или растения сои, содержащих объект сои MON87751 в образце. Один способ состоит из (i) выделения образца ДНК из по меньшей мере одной клетки сои, ткани сои, семени сои, или растения сои, (ii) контактирование образца ДНК с по меньшей мере одним праймером, который способен производить последовательности ДНК, специфичные для ДНК объекта MON87751 в условиях, подходящих для секвенирования ДНК, (iii) проведение реакции секвенирования ДНК, а затем (iv) подтверждение, что нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, специфичную для объекта MON87751, или конструкт, содержащийся в ней, например, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Другой способ состоит из (i) выделения образца ДНК, из по меньшей мере одной клетки сои, ткани сои, семени сои, или растения сои, (ii) контактирование образца ДНК с парой праймеров, способных произвести ампликон из ДНК объекта MON87751 в условиях, подходящих для амплификации ДНК, (iii) проведение реакции амплификации ДНК, а затем (iv) обнаружение молекулы ампликона и/или подтверждение, что нуклеотидная последовательность ампликона содержит нуклеотидную последовательность, специфичную для объекта сои MON87751, например, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5 и SEQ ID №:6. Ампликон должен быть специфичным для объекта MON87751, таким как ампликон, который содержит SEQ ID №:1, или SEQ ID №:2, или SEQ ID №:3, или SEQ ID №:4, или SEQ ID №:5, или SEQ ID №:6. Обнаружение в ампликоне нуклеотидной последовательности специфичной для объекта MON87751 является определяющим и/или маркером наличия специфичной ДНК объекта сои MON87751 в образце. Пример пары праймеров, способных произвести ампликон из ДНК объекта MON87751 при условиях, подходящих для амплификации ДНК, представлена как SEQ ID №:11 и SEQ ID №:12. Другие пары праймеров могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники и использованы для получения ампликона, представленного как SEQ ID №:1 или SEQ ID №:2, или SEQ ID №:3, или SEQ ID №:4, или SEQ ID №:5, или SEQ ID №:6, причем каждая пара праймеров содержит по меньшей мере один праймер внутри геномного участка, фланкирующего вставку и второй праймер внутри вставки. Другой способ обнаружения присутствия ДНК, полученной из клеток сои, тканей сои, семени сои, или растения сои, содержащая объект сои MON87751 в образце состоит из (i) выделения образца ДНК, из по меньшей мере, одной клетки сои, ткани сои, семени сои, или растения сои, (ii) контактирование образца ДНК с ДНК зондом специфическим для ДНК объекта MON87751, (iii) проведение гибридизации зонда и образца в жестких условиях гибридизации, а затем (iv) обнаружение гибридизации между зондом и образцом-мишенью ДНК. Пример последовательности ДНК-зонда, специфичного для ДНК объекта MON87751 представлен в SEQ ID №:13 или SEQ ID №:16. Другие зонды могут быть легко разработаны специалистами в данной области техники и содержать по меньшей мере один фрагмент геномной ДНК фланкирующей вставку и по меньшей мере один фрагмент встроенной ДНК, такой как последовательности представленные без ограничения в SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8 и SEQ ID №:10. Обнаружение гибридизации зонда с ДНК образца является маркером наличия специфичной ДНК объекта сои MON87751 в образце. Отсутствие гибридизации является наоборот свидетельством отсутствия специфичной ДНК объекта сои MON87751 в образце.

Представлены наборы обнаружения ДНК, используемые для идентификации ДНК объекта сои MON87751 в образце, и могут быть применены к способам размножения растений сои, содержащих присвоенную ДНК объекта. Такие наборы содержат ДНК-праймеры и/или зонды, содержащие фрагменты по SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10; SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ

ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Одним из примеров такого набора содержит, по меньшей мере одну молекулу ДНК достаточной длины последовательных нуклеотидов из SEQ ID №:10 используемую в качестве ДНК-зонда для выявления наличия и/или отсутствия ДНК в образце, полученном из трансгенных растений сои, содержащих объект MON87751. ДНК, полученная из трансгенных растений сои, содержащих объект MON87751 будет содержать молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26. Молекула ДНК, достаточная для использования в качестве ДНК-зонда при условии, если пригодна для определения, обнаружения или диагностики наличия и/или отсутствия ДНК объекта сои MON87751 в образце представлена как SEQ ID №:13. Другие зонды могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники и должны содержать по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39 или по меньшей мере 40 последовательных нуклеотидов по SEQ ID №:10 и быть достаточно уникальными для ДНК объекта сои MON87751 в целях выявления ДНК, полученной из объекта. Другой тип комплекта содержит пару праймеров пригодных для производства ампликона, пригодного для выявления наличия и/или отсутствия ДНК, полученной из трансгенного объекта сои MON87751 в образце. Такой комплект будет использовать способ, включающий контактирование ДНК-мишени с парой праймеров, как это описано выше, после чего выполнение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, достаточной для получения ампликона, содержащего молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26, и затем определение присутствия и/или отсутствия. Такой способ может также включать секвенирование ампликона или его фрагмента, который будет определяющим, т.е. маркером наличия специфичной ДНК объекта сои MON87751 в образце ДНК-мишени. Другие пары праймеров могут быть легко разработаны специалистами в данной области техники и должны содержать по меньшей мере 15, меньшей мере 16, меньшей мере 17, меньшей мере 18, меньшей мере 19, меньшей мере 20, меньшей мере 21, меньшей мере 22, меньшей мере 23, меньшей мере 24, меньшей мере 25, меньшей мере 26, меньшей мере 27, меньшей мере 28, меньшей мере 29 или меньшей мере 30 последовательных нуклеотидов последовательностей, представленных без ограничения в SEQ ID №:1, SEQ ID №:2, SEQ ID №:3, SEQ ID №:4, SEQ ID №:5, SEQ ID №:6, SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, SEQ ID №:9, SEQ ID №:10, SEQ ID №:17, SEQ ID №:18, SEQ ID №:19, SEQ ID №:20, SEQ ID №:21, SEQ ID №:22, SEQ ID №:23, SEQ ID №:24, SEQ ID №:25 и SEQ ID №:26 и быть достаточно уникальными для ДНК объекта сои MON87751 в целях выявления ДНК, полученной из объекта. Наборы и способы детекции по настоящему изобретению являются пригодными для, среди прочего, выявления объекта сои MON87751, отбора разновидностей или гибридов сои, содержащих объект MON87751, обнаружение присутствия ДНК, полученной из трансгенного объекта сои MON87751 в образце, и контроля присутствия и/или отсутствия в образце объекта сои MON87751 или частей растений, полученных из растений сои, содержащих объект MON87751. Последовательность гетерологичной ДНК вставки, связывающей последовательности, или фланкирующей последовательности объекта сои MON87751 можно проверить (и исправить, если необходимо) путем амплификации таких последовательностей из объекта с использованием праймеров, полученных из последовательностей, предусмотренных настоящим документом, за которым следуют стандартное секвенирование ДНК ампликона или клонированной ДНК. Следующие примеры включены, чтобы продемонстрировать примеры некоторых предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалист в данной области техники должен понять методы, раскрытые в примерах, которые представляют подходы, которые, по опыту изобретателей, функционируют в практике изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как примеры предпочтительных вариантов для его занятий. В прочем, специалисты в данной области техники должны, в свете настоящего описания, понять, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных вариантах реализации, и при этом получить подобный или аналогичный результат без отхода от духа и объема изобретения.

#### **Информация о хранении**

Депонирование репрезентативного образца семян Glucine max содержащего ДНК объекта MON87751 было осуществлено 28 февраля 2013 г. в соответствии с будапештским договором в американскую коллекцию культур (ATCC) по адресу 10801 University Boulevard, Manassas, Вирджиния США, Zip Code 20110, и получило номер доступа ATCC PTA-120166. Доступ к депозиту доступен на время рассмотрения заявления Комиссаром патентного ведомства и товарных знаков и лицами, определенными комиссаром, имеющим иметь доступ к нему по запросу. После выдачи патента все ограничения по дос-

тупности для общественности будут безвозвратно удалены. Депозит будет храниться в депозитории в течение 30 или 5 лет после последнего запроса, или в течение эффективной жизни патента, в зависимости от того, что дольше, и будет заменен по мере необходимости в течение этого периода.

Пример 1.

В этом примере описываются трансформации и селекции объекта сои MON87751. Экспрессия чужеродных генов в растениях, как известно, подвержена влиянию их хромосомной позиции, возможно из-за структуры хроматина (например, гетерохроматина) или близости регулирующих транскрипцию элементов (например, энхансеров) вблизи сайта встраивания (Weising, 1988). По этой причине часто возникает необходимость проверки большого количества объектов в целях выявления объекта характеризующегося оптимальной экспрессией введенного интересующего гена. Например, у растений и других организмов наблюдались большие различия в уровнях экспрессии введенного гена среди объектов. Также могут быть различия в пространственных или временных характерах экспрессии, например, различия в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растений, что может не соответствовать ожидаемым характеристам от транскрипционных регуляторных элементов, присутствующих во встроеном генетическом конструкте. По этим причинам, одиннадцать различных экспрессионных векторов были получены и испытаны в трансформированных растениях сои во время селекции объекта MON87751. Одиннадцать различных экспрессионных конструктов были трансформированы и испытаны на растениях. Отдельные экспрессионные конструкты различались комбинациями использованных элементов экспрессии, т.е., энхансер (E), промотор (P), лидер (L), интроны (I), хлоропласт-нацеленный пептид (СТР) и 3' сигнал терминации транскрипции и полиаденилирования (Т). Также сегменты Т-ДНК, содержащие две экспрессионных кассеты, кодирующие оба Сгу белка (Сгу2Аб и Сгу1А. 105), или содержащие один Сгу белок, т.е., Сгу2Аб или Сгу1А. 105. Дальнейшим изменением в экспрессионных конструктах с сегментами Т-ДНК, содержащими две экспрессионных кассеты Сгу2Аб и Сгу1А. 105 была относительная ориентация двух кассет, кодирующих Сгу белки. В частности, две экспрессионных кассеты Сгу белка были или в относительно последовательной ориентации транскрипции, так что экспрессия каждого промотора соответствующего Сгу белка протекает в одинаковом направлении, но каждый от своего отдельного соответствующего промотора (см. фиг. 2), или две кассеты были в противоположной ориентации, так что экспрессия от каждого промотора двух Сгу белков находится отдельно от точки по центру между двух промоторов, т.е., транскрипция каждой экспрессионной кассеты происходит в противоположном направлении и не сходится с другой (см. фиг. 2). Последовательность ДНК, кодирующая Сгу1А. 105, была диверсифицирована в конструктах 4, 6, 7, 8 и 9, по сравнению с конструктами 1 и 3. В ещё одном варианте, в двух конструктах с двумя экспрессионными кассетами Сгу ориентированными в обратном направлении транскрипции, энхансеры транскрипции были расположены между расходящимися промоторами (см. фиг. 2).

Одиннадцать экспрессионных конструктов были трансформированы три отдельных раза, при помощи *Agrobacterium*-опосредованной трансформации меристематической ткани сои. Способ, который позволяет создавать трансформированные растения без использования каллуса был описан в патенте США № 8030544. Кратко, меристематические ткани были вырезаны из зародышей проросших семян сои А3555 (Asgrow, Сент-Луис, Миссури). Конструкт 1 содержит два отдельных сегмента Т-ДНК, каждый ограничен пограничным сегментом *Agrobacterium* (Т-ДНК сегмент). Первый сегмент Т-ДНК трансформационного конструкта содержит две экспрессионных кассеты, первая экспрессионная кассета, кодирующая участок гена аденилилтрансферазы Tn7 от *Escherichia coli* (который обеспечивает устойчивость к спектиномицину и стрептомицину; aadA-SPR) и используется для селекции; и вторая экспрессионная кассета, кодирующая участок гена фосфорилазы сахарозы от *Agrobacterium tumefaciens* штамм C58 (которая катализирует превращение сахарозы в фруктозу и глюкозо-1-фосфат; STR+OriRi) и используется в качестве маркера подсчета трансформантов. Второй сегмент Т-ДНК различных трансформационных конструктов содержит или одну экспрессионную кассету, кодирующую только Сгу2Аб (конструкты 2, 5, 10 или 11), или экспрессионную кассету кодирующую только Сгу1А. 105 (конструкты 3 или 6); или второй сегмент Т-ДНК различных трансформационных конструктов содержит одну экспрессионную кассету, кодирующую Сгу2Аб кодирования и одну экспрессионную кассету, кодирующую Сгу1А. 105 (конструкты 1, 4, 7, 8 или 9) (см. Фиг. 2). Из-за того, что каждый сегмент Т-ДНК трансформационного конструкта ограничен отдельной пограничной последовательностью *Agrobacterium*, сегмент Т-ДНК, содержащий кассеты маркера отбора и маркера подсчета трансформантов, может интегрироваться в геном клеток сои на сайт, отличный от сайта интеграции сегмента Т-ДНК, кодирующего экспрессионных кассеты Сгу2Аб и/или Сгу1А. 105. Таким образом, объекты могут быть проверены на наличие сегрегации и потери последовательностей маркера отбора и маркера подсчета трансформантов. Все объекты были отображены на основании отсутствия остова и отсутствия последовательностей кассет маркера отбора и маркера подсчета трансформантов. После ко-культивирования с *Agrobacterium* содержащей трансформационный конструкт, меристемы были размещены на селективной среде, содержащей спектиномицин, карбенициллина динатриевую соль, цефотаксима натрия соль, и тикарциллина динатриевую соль/калия клавикуланата смесь для ингибирования роста нетрансформированных растительных клеток и избытка *Agrobacterium*. Меристемы были после размещены на средах, способствующих развитию побегов и корней. Уко-

ренившиеся растения (R0) с нормальными фенотипическими характеристиками были отобраны и перемещены в почву для роста и дальнейшей оценки.

Экспрессионный конструктор 1, используемый, чтобы генерировать объект MON87751, содержащий сегмент Т-ДНК, кодирующий два различных Cry белка в 5' к 3' относительном порядке экспрессионных элементов растения (с или без промежуточных последовательностей): промотор, лидер и первый интрон, полученный от гена Actin 2 *Arabidopsis thaliana* (P-At.Act2), химерная кодирующая последовательность, состоящей из N-концевой кодирующей последовательности транзитного белка хлоропласта полученного от производных от гена 5-енолпирувиллицимат-3-фосфате синтазы Арабидопсиса (EPSPS) слитого в рамке с геном, кодирующим Cry2Ab (который кодирует белок, который наделяет устойчивостью к насекомым-вредителям) от *Bacillus thuringiensis* (Bt) с нуклеотидами модифицированными для растительной экспрессии (СТР2-Cry2Ab), в 3' элемент терминации транскрипции и полиаденилирования (3' НТО) полученным от гена металлотионен-подобного белка *Oryza sativa* (T.OsMth), промежуточные последовательности между первой экспрессионной кассетой Cry белка и второй экспрессионной кассетой Cry белка; промотор и лидер, полученные гена малой субъединицы 1A 1,5-бисфосфат карбоксилазы арабидопсиса (P-At.RbcS4), этот промотор-лидер связан с химерной кодирующей последовательностью, состоящей из кодирующей последовательности транзитного белка хлоропластов полученной из полученные гена малой субъединицы 1A 1,5-бисфосфат карбоксилазы арабидопсиса (СТР1), которая также содержит кодирующую последовательность кодирующую повтор сайта расщепления транзитного белка и 3 аминокислоты от зрелого белка слитые в рамке с геном, кодирующим Cry1A. 105 (который кодирует белок, который наделяет устойчивостью к насекомым-вредителям), состоящий из сегментов генов, кодирующих Cry1Ab1 (домены I и II), Cry1Fa1 (домен III), и Cry1Ac1 (домен протоксина) от *Bacillus thuringiensis* (Bt) с нуклеотидами модифицированными для растительной экспрессии, 3' НТО (T-Mt.Pt1), полученную от гена фосфат-транспортера 1 *Medicago truncatula*. В экспрессионной кассете конструктора 1 кассета Т-ДНК, содержащая две отдельные Cry2Ab и Cry1A.105 экспрессионные кассеты имеет правую границу с произвольно назначенным 5' концом от *Agrobacterium*, который находится в 5' к кассете Cry2Ab; и левую границу с произвольно 42, назначенным 3' концом от *Agrobacterium*, который находится в 3' к кассете Cry1A. 105. Cry2Ab кассета (промотор через терминатор) находится в позиции 123-3785 в SEQ ID №:9, и Cry1A. 105 кассета (промотор через терминатор) находится в позиции 3831-9754 в SEQ ID №:9.

Кассета Т-ДНК для конструктора 2 (Cry2Ab) и для конструктора 3-(Cry1A. 105) содержит единичные кодирующие Cry белок кассеты с теми же элементами для соответствующих Cry белок кодирующих генов, используемых в конструкторе 1, см. фиг. 2.

Конструкторы 4, 5 и 6 были подобны в ориентации элементов конструкторам 1, 2 и 3, соответственно, но с разными промоторами-лидерами-интронами и транзитный белок хлоропласта для кассет Cry2Ab и Cry1A. 105. Терминаторы для соответствующих кассет Cry белка (Cry2Ab с T-Os.Mth, или Cry1A. 105 с T-Mt.Pt1) были одинаковы во всех экспрессионных конструкторах с 1 по 11 (см. фиг. 2).

Промотор-лидер-интрон и транзитный белок хлоропласта, кодирующая последовательность Cry белка и терминатор используемые для обеих кассет Cry2Ab и Cry1A. 105 в каждом из конструкторов 7-11 были идентичны использованным в конструкторах 4, 5 и 6. Впрочем для конструкторов 7, 8 и 9 ориентация кассеты Cry2Ab и кассеты Cry1A.105 была инвертированной или обратной относительно друг друга и ориентация транскрипции была в противоположных направлениях, каждая от своих соответствующих промоторов, см. фиг. 2. Конструкторы 7, 8 и 9 отличались отсутствием (конструктор 7) энхансера между двумя кассетами, или наличием энхансера; конструктор 8 с энхансером 1 (E1), или конструктор 9 с энхансером 2 (E2), см. фиг. 2. Конструктор 10 и конструктор 11 имели единственную кассету Cry2Ab с E1 (конструктор 10) или E2 (конструктор 11).

После преобразования и перемещения объектов (R0) в почву обширные молекулярные, агрономические и фенотипические анализы был проведены, чтобы выбрать объекты для дальнейшего тестирования. Кроме того, объекты были самоопылены и полученные семена от выбранного объекта были использованы для полевых и дополнительных молекулярных испытаний.

Молекулярные исследования включают следующие: анализы для определения количества копий, анализы для определения целостности обеих экспрессионных кассет, содержащих Cry белок (конструкторы 1, 4, 7, 8 и 9), присутствие Т-ДНК кассеты кодирующей Cry белок (единичная экспрессионная кассета Cry белка (конструкторы 2, 3, 6, 10 или 11) или двух экспрессионных кассет Cry белка (конструкторы 1, 4, 7, 8 или 9)); анализы для определения экспрессии белка, измеряемого ИФА, и анализы, чтобы определить коэффициент сегрегации Т-ДНК экспрессионной кассеты (1:2:1 или 1:3). Агрономические анализы включают (для объектов R0 созданных из конструкторов 1, 2 и 3, эффективность насекомых на опыте на листовом диске для двух видов насекомых-вредителей (*Anticarsia gemmatalis* (гусеница бархатных бобов, VBC) и *Chrysodeixis includens* (металловидка соевая, SBL)). R0 растения выращивали до зрелости, объекта были самоопылены, и был определен набор семян стартового набора для каждого объекта. Количество объектов R0, возникших при трансформации с 11 отдельными конструкторами и перенесенных в почву варьировало в пределах от 420 объектов до более, чем 5000 объектов (см. табл. 1). Для трансформации с помощью конструктора 1, из которого был сгенерирован объект MON87751, насчитывалось в общей сложности 1102 R0 растений, укорененных в почве, из которых только 281 прошли первичный молекулярный

анализ. Дополнительные молекулярные, агрономические и фенотипические анализы этих 281 объектов, которые были созданы путем трансформации с конструктом 1 обеспечили лишь 29 R1 объектов оцененных для дополнительных тепличных опытов.

Таблица 1. R0 объекты, полученные из одиннадцати трансформированных конструктов с указанием количества объектов, перенесенных в почву и количества объектов прошедших анализ

на количество копий		
Конструкт	# объектов, перенесенных в почву	# объектов прошедших анализ на количество копий
Конструкт 1	1102	281
Конструкт 2	420	150
Конструкт 3	420	107
Конструкт 4	5544	209
Конструкт 5	579	24
Конструкт 6	588	32
Конструкт 7	630	33
Конструкт 8	1260	47
Конструкт 9	1260	51
Конструкт 10	504	12
Конструкт 11	504	18

Для 29 объектов R1, созданных в результате трансформации с помощью конструкта 1 и оцененных для последующего анализа, R1 семя было посажено в теплице для анализа объекта R1 анализы, включающими: (а) всхожесть R1 (100% всхожесть); (б) идентификацию гомозиготных растений; (с) подтверждение при помощи анализа ПЦР, что гомозиготные растения содержат последовательность маркера отбора и маркера подсчета трансформантов (она сегрегируется независимо); (d) эффективность насекомых определяемая биотестированием при помощи листовых дисков для *C. includens* (SBL); и (е) эффективность насекомых определяемая биотестированием при помощи листовых дисков для *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка, FAW), (f) анализ экспрессии белка в тканях листа при помощи ИФА на этапе V7, улучшение объектов с уровнем белков Cry2Ab и Cry1A. 105 свыше > 4 м.д. В дополнение к результатам молекулярного анализа и биотестированию при помощи листовых дисков, были проведены агрономические фенотипические наблюдения и набор семян из четырех отборов/объектов были собраны. Исходя из совокупности этих данных, R2 семя от 21 объекта R1, созданные путем трансформации с конструктом 1 оценивались в агрономических полевых испытаниях и тепличных испытаниях.

#### Пример 2.

Агрономические полевые испытания были разработаны для оценки фенотипических характеристик и урожайности объектов сои экспрессирующих Cry2Ab и Cry1A. 105 по сравнению с контролем, A3555 (родительские фоновый контроль). В этих агрономических полевых испытаниях контроли и объекты были сортом сои A3555, с относительной группой зрелости 3 (RM3). Для исследования использовали рандомизированный блочный дизайн (RCBD) в течение 4 сезонов и в двух географических локациях. В одной географической локации агрономические полевые испытания были проведены в 25 местах в каждом сезоне, а во второй географической локации агрономические полевые испытания были проведены в 14 местах в каждом сезоне. Стандартные агрономические методы использовались в посадке и сборе данных для всех испытаний. Собранные данные включали рейтинг прорастания, энергичность проростков, дату цветения, наблюдения окраски цветка, наблюдения фенотип, цвет опушения, зрелость, полегание, высоту растений, подсчет осыпания семян, дату урожая, вес семян/участок, влажность семян/участок, и урожай в бушлях на акр (бушель/акр). Для анализа данных, некоторые локации были отброшены из-за предуборочных проблем качества (т.е. стоячей воды, недостаточной влажности почвы, слабой всхожести, в конце сезона растрескиванию стручков из-за града), или некоторые локации были отброшены из-за коэффициента вариации (CV) выше 15% и/или высокого индекса качества локации (LQI).

Во всех протестированных местах проведенные измерения фенотипа свидетельствовали, что агрономические рейтинги для объектов были в пределах нормального диапазона контроля, A3555. Не все обследования были взяты на всех сайтах и некоторые данные, например прорастание, возможно, были собраны, но урожай был не определен, потому что место было оставлено за проблем, которые возникли после сбора ранних фенотипических данных.

Для агрономических полевых испытаний, число объектов, созданных конструктами 1, 2, 3, 4, 5 или 6 и протестированных в каждом полевом испытании в двух географических местах, и тесты поколений объекта сои (т.е. P3, P4, P5, P6 или P7) представлены в табл. 2.

Таблица 2. Количество объектов (и поколение объекта сои) испытанных на конструктор в течение двух сезонов и в двух географических местах агрономических полевых испытаний (н.п. означает не проверялась)

	Сезон 1/место 2	Сезон 1/место 1	Сезон 2/место 2	Сезон 2/место 1
Конструктор 1	12 (R3)	10 (R3)	3 (R6)	3 (R7)
Конструктор 2	2 (R3)	2 (R3)	1 (R4)	1 (R5)
Конструктор 3	3 (R3)	3 (R3)	1 (R4)	1 (R5)
Конструктор 4	н.п.	9 (R3)	н.п.	н.п.
Конструктор 5	н.п.	3 (R3)	н.п.	н.п.
Конструктор 6	н.п.	3 (R3)	н.п.	н.п.

Мета-анализ агрономических полевых испытаний для объектов испытанных на протяжении каждого сезона, в каждом географическом месте, и анализ средней урожайности по каждому полю (бушель/акр) показали, что существует статистически значимое увеличение урожая для объекта MON87751 по сравнению с контролем A3555 (табл. 2). Объекты, экспрессирующие только Cry2Ab не имели статистически значимых различий в урожайности по сравнению с контролем A3555, см. табл. 3. Объекты, экспрессирующие только Cry1A. 105, имели статистически достоверное снижение урожайности по сравнению с контролем A3555, см. табл. 3.

Таблица 3. Мета-анализ агрономических полевых испытаний для объектов испытанных на протяжении каждого сезона, в каждом географическом месте, и анализ средней урожайности по каждому полю по сравнению с нетрансгенной линией сои A3555

Конструктор	ИГ	Объект	Средний урожай (бушель/акр)	Delta	PERC	Значение P	LSD05	LSD10
Конструктор 1	Cry2Ab+ Cry1A.105	MON87751	68,16	1,83	2,76	0,00	1,17	0,98
		8	64,88	-1,45	-2,19	0,02	1,17	0,98
		10	66,59	0,26	0,39	0,66	1,17	0,98
Конструктор 2	Cry2Ab	20	67,39	1,06	1,60	0,08	1,17	0,98
Конструктор 3	Cry1A.105	29	64,06	-2,27	-3,42	0,00	1,17	0,98
		A3555	66,33					

### Пример 3.

Тепличные испытания эффективности были проведены, чтобы оценить эффективность экспериментальных объектов сои, экспрессирующих оба Cry белка из встроенного сегмента Т-ДНК из одного конструктора с двумя экспрессионными кассетами (т.е., как Cry2Ab, так и Cry1A. 105), или одиночный Cry белок (т.е., только Cry2Ab, или только Cry1A. 105) против искусственной вспышки численности популяции чешуекрылых насекомых-вредителей, содержащихся в вольерах теплиц. Сравнение одно - к двух-генных объектов было использовано для определения относительного вклада каждого отдельного Cry белка по отношению к эффективности наблюдаемой в конструкторе объекта с экспрессией двух генов. Тепличные испытания проводились в течение нескольких сезонов в двух географических местах. В одном географическом месте были испытаны 5 целевых видов вредителей: *Anticarsia gemmatalis* (гусеница бархатных бобов, VBC), *Chrysodeixis includens* (металловидка соевая, SBL), *Spodoptera eridania* (южная совка, SAW), *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка, FAW) и *Helicoverpa zea* (гусеница совки хлопковой, SPW). Во втором географическом месте были испытаны 3 целевых вида вредителей: *Crociosema aporema* (моль побеговая фосолиевая, BSM), *Rachiplusia nu* (пяденица подсолнечниковая, SFL) и *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка, FAW).

Трансформационные объекты, полученные от конструкторов 1, 2 или 3, были оценены в поколении R2 в тепличных опытах и включали двадцать объектов экспрессирующих оба белка (объекты, полученные в результате трансформации с помощью конструктора 1), шесть объектов экспрессирующих только Cry2Ab (объекты, созданные в результате трансформации с помощью конструктора 2), и шесть объектов, экспрессирующих только Cry1A. 105 (объекты, созданные в результате трансформации с помощью конструктора 3). Из них 12 объектов с обоими Cry2Ab и Cry1A. 105 (конструктор 1), два объекта только с Cry2Ab (конструктор 2), и три объекта только с Cry1A. 105 (конструктор 3) были оценены в R3 поколении в тепличных опытах. Одиннадцать объектов с обоими Cry2Ab и Cry1A. 105 (конструктор 1) были в дальнейшем оценены в R4 поколении в тепличном опыте. Три объекта с обоими Cry2Ab и Cry1A. 105 (конструктор 1), один объект только с Cry2Ab (конструктор 2), и один объект только с Cry1A. 105 (конструктор 3) были оценены в R5, R6 и R7 в тепличных опытах. Десять объектов экспрессирующих Cry2Ab и Cry1A. 105 (объекты созданы в результате трансформаций с помощью конструктора 4), три объекта только с Cry2Ab (объекты созданы в результате трансформаций с помощью конструктора 5), и три объекта только с Cry1A.105 (объекты созданы в результате трансформаций с помощью конструктора 6) были оценены в R3 поколении в тепличных опытах. Два объекта с обоими Cry2Ab и Cry1A. 105, один объект только с Cry2Ab, и один объект только с Cry1A. 105 были оценены в R4 в тепличных опытах, и один объект каждого оценивался в R5 в тепличных опытах. Три объекта экспрессирующих оба Cry2Ab и Cry1A. 105 в противоположной 5' к 3' ориентации с энхансером (объекты, сконструированы в результате трансформации с помощью конструктора 8), 3 совместных объекта экспрессирующих оба Cry2Ab и Cry1A. 105 в противоположной 5' к 3'

ориентации без энхансера (объекты, сконструированы в результате трансформации с помощью конструктора 7), и 2 объекта только с Cry2Ab (объекты, сконструированы в результате трансформации с помощью конструктора 10) были оценены в R2 поколении в тепличных опытах. Положительный трансгенный контроль сои включал MON87701 или объект GM\_A19478 (созданные одновременно MON87701), и оба экспрессируют Cry1Ac. Нетрансгенные линии сои A3555 (родительский фон для объектов MON87751, относительная зрелость 3 (RM3)) и A5547 (родительский фон для MON87701 и GMA19478, RM5) были включены во все тепличные и полевые опыты в качестве отрицательного контроля. Нетрансгенная линия сои AG3705 была включена в виде проверки на белый цветок в ряде опытов.

При создании и проведении тепличных опытов использовались стандартные методы. Участки оценивались один раз после каждого заражения в момент максимального повреждения по сравнению с контролем (обычно через 3-4 недели после помещения куколок в теплицу). При каждой оценке, фиксировались следующие агрономические наблюдения: дата и стадия роста растения. Кроме того, для дефолирующих насекомых записывался расчетный процент дефолиации на каждом участке. Для *S. arageta* случайным образом были выбраны десять растений на каждом участке и было записано число растений с повреждением. В некоторых случаях число живых личинок были также записано.

Данные дефолиации были подвергнуты дисперсионному анализу для определения значимых источников вариабельности среди линии и повторности для каждого насекомого в каждом месте при 0,05 уровне вероятности (P). Существенные различия между средними значениями определялась с использованием теста Тьюки-Крамера (Kramer 1956) при  $P = 0,05$ .

Три мелкоделяночных тепличных опыты были проведены во втором географическом местоположении в течение одного сезона с использованием R. nu и *S. arageta* для поражения. Дизайн исследования включал рандомизированный блочный дизайн (RCBD) испытательных блоков с трех повторностями на объект или контроль, с протестированными объектами приведенными в табл. 4. В одном опыте заражение осуществлялось *S. arageta* в середине вегетативной стадии роста сои и снова в ранний репродуктивный период роста сои. В двух опытах заражение осуществлялось R. nu в середине вегетативной стадии роста сои.

Для опыты с *S. arageta* было достигнуто очень сильное воздействие.

Повторение не являлось значимым источником изменчивости в поражении ( $F=0,8794$ ;  $df=2, 69$ ;  $P=0,4196$ ), но объект было весьма значительным ( $F=11,9398$ ;  $df=23, 48$ ;  $P<0,0001$ ). Максимальный процент поврежденных растений (табл. 4) насчитал 83-100% в отрицательном контроле, но отсутствовал в положительном контроле Cry1Ac. Объекты, созданные в результате трансформации конструктором 1 и экспрессирующие Cry2Ab и Cry1A. 105 демонстрировали 0-13% поврежденных растений, а у тех, которые экспрессируют только Cry2Ab или только Cry1A. 105 демонстрировали 10-17% и 10-13% соответственно. Небольшое, но значительное число растений отмеченных как поврежденные в этом опыте могут встречаться из-за критериев, используемых физическими лицами при записи в степени повреждения.

Для опытов с R. nu, в одном тепличном опыте было достигнуто сильное воздействие. Повторение не являлось значимым источником изменчивости при дефолиации ( $F=0,203$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,8167$ ), но объект был весьма значительным ( $F=20,461$ ;  $df=23, 48$ ;  $p<0,0001$ ). Максимальная дефолиация (табл. 4) в среднем 60-63% наблюдалась в отрицательном контроле, но отсутствовала в Cry1Ac положительного контроле и у объектов, созданных в результате трансформации конструктором 1, экспрессирующих Cry2Ab+Cry1A. 105 или объектов, созданных в результате трансформации конструктором 2, экспрессирующих только Cry2Ab. Объекты, созданные в результате трансформации конструктором 3 экспрессирующие только Cry1A. 105 демонстрировали чуть большую дефолиацию (4-10%). Умеренно сильное давление было достигнуто во втором тепличном опыте с R.nu. Повторение не являлось значимым источником изменчивости при дефолиации в каждом опыте ( $F=0,2542$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,7763$ ), но объект был весьма значительным ( $F=16,1793$ ;  $df=23, 48$ ;  $p<0,0001$ ). Максимальная степень дефолиации (табл. 4) в среднем 38-40% наблюдалась в отрицательном контроле, но была незначительной в Cry1Ac положительном контроле (4%), но отсутствовала в объектах созданных с конструктором 1 и экспрессирующих Cry2Ab+Cry1A. 105 или объектов, созданных с конструктором 2 и экспрессирующих только Cry2Ab. Объекты, созданные с при помощи конструктора 3 и экспрессирующие только Cry1A.105 демонстрировали чуть большую дефолиацию (2-7%).

В этих тепличных опытах объект сои MON87751 демонстрировали неповрежденные растения при инвазии насекомых-вредителей, *S. arageta* или R. nu, которое было значительным по сравнению с ущербом и/или дефолиацией в контрольной группе в этом же опыте (табл. 4).

Таблица 4. Повреждение от *S. arorema* и дефолиации от личинки *R. ni* для объектов, созданных с помощью конструктора 1, 2 или 3 и оцененных в искусственно зараженных теплицах

Конструктор	ИГ	Объект	% Поврежденных растений (сезонный максимум)		% Дефолиации (сезонный максимум)				
			<i>Crocidosema arorema</i>		<i>Rachiplusia ni</i>				
					Тепличный опыт 1		Тепличный опыт 2		
			0 ± 0	b	0 ± 0	d	3,7 ± 0,0	bc	
Конструктор 1	Cry1Ac	GM_A19459	0 ± 0	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
		Cry2Ab+ Cry1A.105	2	6,7 ± 6,7	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			3	0 ± 0	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			4	13,3 ± 3,3	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			MON87751	0 ± 0	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			7	6,7 ± 6,7	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			8	13,3 ± 8,8	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
			9	3,3 ± 3,3	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c
		10	13,3 ± 6,7	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
		11	3,3 ± 3,3	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
		14	6,7 ± 6,7	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
		18	13,3 ± 8,8	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
		19	13,3 ± 8,8	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
Конструктор 2	Cry2Ab	20	10,0 ± 10,0	b	0 ± 0	d	0,3 ± 0,0	c	
		22	16,7 ± 3,3	b	0 ± 0	d	0 ± 0	c	
Конструктор 3	Cry1A.105	29	10,0 ± 10,0	b	10,0 ± 0,1	cd	5,3 ± 0,0	bc	
		30	13,3 ± 8,8	b	6,7 ± 0,0	cd	2,0 ± 0,0	c	
		31	10,0 ± 5,8	b	3,7 ± 0,0	d	7,0 ± 0,0	bc	
	Отрицательный	A3555	83,3 ± 16,7	a	63,3 ± 0,0	a	38,3 ± 0,1	a	
		A5547	100 ± 0	a	60,0 ± 0,0	a	40,0 ± 0,1	a	

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В последующем сезоне в мелкоделяночных тепличных опытах, проведенных во втором географическом месте, для поражения были использованы местные лабораторные популяции *R. ni*, *S. arorema* и *S. frugiperda*. Протоколы для проведения исследований были преимущественно подобны описанным выше, и с тестируемыми объектами и контролем представленными в табл. 5. В опыте с поражением *S. arorema* было достигнуто сильное воздействие.

Повторение не являлось значимым источником изменчивости в поражении ( $F=0,2742$ ;  $df=2,33$ ;  $P=0,7619$ ), но объект был весьма значительным ( $F=,2313$ ;  $df=11, 24$ ;  $P<0,0001$ ). Максимальное поражение составляло 4,2-5,5 очков повреждения на растение в отрицательном контроле, 80-100% растений демонстрировали повреждения, но был незначительным в положительном контроле и во всех тестовых объектах (табл. 5). В опыте с поражением *R. ni*, было достигнуто умеренно сильное воздействие. Повторение не являлось значимым источником изменчивости в поражении ( $F=0,041$ ;  $df=2, 33$ ;  $P=0,9599$ ), но объект был весьма значительным ( $F=143,5526$ ;  $df=11, 24$ ;  $P<0,0001$ ). Максимальное поражение составляло 33,3-40,0% дефолиации в отрицательном контроле (значительно выше экономического порога вредоносности), но отсутствовало или пренебрежимо мало в положительном контроле и во все тестовые объекты, за исключением объектов, созданных в результате трансформации с конструктором 6, экспрессирующих только TIC 105 (табл. 5).

В опыте с поражением *S. frugiperda*, была достигнуто легкое воздействие.

Повторение не являлось значимым источником изменчивости в поражении ( $F=0,1187$ ;  $df=2, 33$ ;  $P=0,8884$ ), но объект был весьма значительным ( $F=12,8602$ ;  $df=11, 24$ ;  $P<0,0001$ ). Максимальное поражение составляло 7,5-15,0% дефолиации в отрицательном контроле - только достигнув экономического порога вредоносности. Некоторый ущерб был также отмечен в объектах, экспрессирующих только Cry2Ab, созданных путем трансформации или конструктором 2 или конструктором 5, но ущерб был незначительным или отсутствовал в положительном контроле и во всех других тестовых объектах (табл. 5). В этих тепличных опытах объект сои MON87751 демонстрировали неповрежденные растения при поражении насекомыми-вредителями, *S. arorema* *R. ni*, *S. frugiperda* которое было значительным по сравнению с повреждением отрицательного контроля в том же опыте (табл. 5). Объект сои MON87751 получил значительно меньше ущерба от *R. ni* по сравнению с трансгенными объектами сои, созданными в результате трансформации при помощи конструктора 6 экспрессирующие только Cry1A.105 (табл. 5), хотя следует отметить, что существует снижение экспрессии белка Cry1A.105 в объектах, созданных трансформацией при помощи конструктора 6. Эти результаты также свидетельствуют о впервые расширенном спектре контроля насекомого-вредителя *S. frugiperda*.

Таблица 5. Максимальное повреждение *S. arogeta* означает процент дефолиации от личинок *R. ni* и *S. frugiperda* при оценке объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2, 3, 4, 5 или 6 в сравнении с положительным и отрицательным контролем в искусственно зараженных теплицах.

	ИГ	Объект	Максимум поражения <sup>1,2</sup> (среднее ± S.E.)					
			<i>C. arogeta</i> <sup>1</sup>		<i>R. ni</i> <sup>2</sup>		<i>S. frugiperda</i> <sup>2</sup>	
ПОЗ	Cry1Ac	GM_A19459	0 ± 0	B	0 ± 0	D	0,8 ± 0,8	BC
Конструктор 1	Cry2Ab+Cry1A.105	MON87751	0 ± 0	B	0 ± 0	D	0 ± 0	C
		8	0 ± 0	B	0 ± 0	D	0 ± 0	C
		10	0 ± 0	B	0 ± 0	D	0 ± 0	C
Конструктор 2	Cry2Ab	20	0,3 ± 0,3	B	0 ± 0	D	1,7 ± 0,8	BC
Конструктор 3	Cry1A.105	29	0 ± 0	B	0,8 ± 0,8	D	0 ± 0	C
Конструктор 4	Cry2Ab+Cry1A.105	32	0 ± 0	B	0 ± 0	D	0 ± 0	C
		40	0,1 ± 0,1	B	0 ± 0	D	0 ± 0	C
Конструктор 5	Cry2Ab	46	0 ± 0	B	2,0 ± 1,5	D	6,5 ± 2,2	BC
Конструктор 6	Cry1A.105	42	0 ± 0	B	13,3 ± 1,7	C	0 ± 0	C
НЕГ	Отрицательный	A3555	5,5 ± 2,2	A	33,3 ± 3,3	B	15,0 ± 2,9	A
		A5547	4,2 ± 0,3	A	40,0 ± 0,0	A	7,5 ± 2,5	B

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>Среднее количество очков повреждений/растение. <sup>2</sup>Средний процент дефолиации

Один мелкоделяночный тепличный опыт был проведен в первом географическом месте, с использованием лабораторной популяции *H. zea* для поражения. Дизайн исследования включал рандомизированный блочный дизайн (RCBD) испытательных блоков с трех повторностями на объекты и контроли, с протестированными объектами приведенными в табл.6. Проводилось два поражения *H. zea* и дефолиация оценивалась через 19-27 дней после поражения (R2-R3 стадии роста сои) для первого поражения, и через 25-28 дней после поражения (R5 стадия роста сои) для второго поражения. Результаты тепличных опытов насекомого- вредителя, *H. zea* были следующими: было достигнуто умеренно сильное воздействие. Повторение не являлось значимым источником изменчивости при дефолиации ( $F = 0,326$ ;  $df = 2, 105$ ;  $P = 0,7225$ ), но объект был весьма значительным ( $F=13,8864$ ;  $df=35, 72$ ;  $P<0,0001$ ). Максимальная степень дефолиации (табл. 6) в среднем 32-33% наблюдалась в отрицательном контроле, но была незначительным в Cry1Ac положительном контроле (1%) и у объектов, созданных при помощи конструктора 1 и экспрессирующих Cry2Ab+Cry1A.105 (2-4%). Несколько более высокая дефолиация наблюдалась у объектов, созданных при помощи конструктора 4 экспрессирующих Cry2Ab+Cry1A. 105 (5-12%), объектов, созданных при помощи конструктора 5 экспрессирующих только Cry2Ab (13-17%) или объектов, созданных при помощи конструктора 6 экспрессирующих только Cry1A. 105 (8-12%).

Объект сои MON87751 демонстрировал значительно меньше повреждений от *H.zea* в тепличном опыте по сравнению с повреждениями в отрицательном контроле в этом же опыте. Данный уровень контроля от *H. zea* находится в пределах приемлемого коммерческого уровня контроля для этих видов вредителей сои. Кроме того, в этом тепличном опыте, объект сои MON87751 получил значительно меньший урон по сравнению с трансгенными объектами сои, созданными при помощи конструктора 5, экспрессирующими только Cry2Ab (табл. 6), демонстрируя расширенный уровень контроля. Однако, экспрессия Cry2Ab в объектах созданных при помощи конструктора 5 ниже, чем в объектах, созданных при помощи конструктора 2, и значительная дефолиация объектов, созданных при помощи конструктора 5 экспрессирующих только Cry2Ab может означать, что может существовать сниженная эффективность в отношении *H. zea* по Cry2Ab у созданных при помощи конструктора 5

Таблица 6. Максимум сезонной дефолиации для объектов, созданных с помощью конструктора 1, 4, 5 или 6 от личинок *H. zea* в тепличном опыте с искусственным заражением при сравнении с положительным и отрицательным контролем.

Конструктор	ИГ	Объект	% Дефолиации (сезонный максимум)		
			<i>H. zea</i>		
Конструктор 1	Cry1Ac	GM_A19478	1,0 ± 0,0	e	
		Cry2Ab+Cry1A.105	2	3,0 ± 0,0	cde
	3		2,3 ± 0,7	de	
	4		2,7 ± 0,3	cde	
	MON87751		4,3 ± 0,7	cde	
			8	2,3 ± 0,3	de
			9	2,0 ± 0,0	de
			10	2,3 ± 0,3	de
			11	4,3 ± 1,9	cde
			14	3,3 ± 0,9	cde
	Конструктор 4		Cry2Ab+Cry1A.105	18	3,7 ± 0,7
19		2,3 ± 0,3		de	
32		9,3 ± 0,7		bcde	
33		5,0 ± 0,0		cde	
34		7,0 ± 1,0		bcde	
35		7,7 ± 1,5		bcde	
36		8,7 ± 0,7		bcde	
37		11,7 ± 1,7		bcde	
38		8,7 ± 0,7		bcde	
39		9,3 ± 0,7		bcde	
Конструктор 5	Cry1A.105	40	7,7 ± 1,5	bcde	
		41	9,3 ± 0,7	bcde	
		42	11,0 ± 2,1	bcde	
		43	11,7 ± 1,7	bcde	
Конструктор 6	Cry2Ab	44	7,7 ± 1,5	bcde	
		45	13,3 ± 1,7	bc	
		46	16,7 ± 3,3	b	
		47	12,7 ± 3,7	bcd	
		Отрицательный	A3555	33,3 ± 6,7	a
A5547	31,7 ± 1,7		a		

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом сезоне в мелкоделяночных тепличных опытах, проведенных в первом географическом месте, была испытана устойчивость к поражению местными лабораторными популяциями *S. eridania* (1-ая стадия или 3-я стадия), *A. gemmatalis* (1-ая стадия) и *C. includens* (1-ая стадия). Результатами этих опытов являются следующее: было достигнуто экстремальное воздействие при 1-ой стадии *S. eridania* и умеренное воздействие было достигнуто от *A. gemmatalis*. Максимальный процент дефолиации (среднее ± S.E.) от личинок *A. gemmatalis* (1-ая стадия) и *S. eridania* (1-ая стадия) представлен в табл. 7.

Таблица 7. Максимальный процент дефолиации объектов созданных с помощью конструктора 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, и 10 от личинок *A. gemmatalis* (1-ая стадия) и *S. eridania* (1-ая-стадия) и от личинок *H. zea* в тепличном опыте с искусственным заражением в сравнении положительным и отрицательным контролем

	Объект	ИГ	Максимальный % дефолиации (среднее ± S.E.)				
			<i>A. gemmatalis</i>		<i>S. eridania</i>		
ПОЗ	GM_A19478	Cry1Ac	0 ± 0	B	65,0 ± 6,5	A	
Конструктор 1	MON87751	Cry2Ab+ Cry1A.105	0,5 ± 0,3	B	3,8 ± 2,1	BC	
			10	0,3 ± 0,3	B	1,8 ± 0,3	C
Конструктор 2	20	Cry2Ab	0,3 ± 0,3	B	3,3 ± 1,0	BC	
Конструктор 3	29	Cry1A.105	0,5 ± 0,3	B	52,5 ± 6,3	A	
Конструктор 4	40	Cry2Ab+ Cry1A.105	0 ± 0	B	16,3 ± 1,3	BC	
Конструктор 5	46	Cry2Ab	1,5 ± 1,2	B	15,0 ± 2,9	BC	
Конструктор 6	42	Cry1A.105	0,5 ± 0,3	B	50,0 ± 0,0	A	
Конструктор 8	48	eCry2Ab+ Cry1A.105	1,8 ± 0,3	B	2,8 ± 0,8	BC	
			49	0 ± 0	B	1,8 ± 0,3	C
			50	1,0 ± 0,4	B	2,3 ± 0,9	BC
Конструктор 7	51	Cry2Ab+ Cry1A.105	0,5 ± 0,5	B	52,5 ± 11,8	A	
			52	1,0 ± 0,4	B	22,5 ± 2,5	B
			53	0 ± 0	B	13,8 ± 2,4	BC
Конструктор 10	54	eCry2Ab	0,5 ± 0,5	B	2,5 ± 0,9	BC	
			55	0 ± 0	B	3,5 ± 0,9	BC
НЕГ	A3555	Отрицательный	35,8 ± 8,0	A	58,8 ± 3,0	A	
			A5547	35,5 ± 11,4	A	45,0 ± 6,5	A

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В опытах с *C. includens* (1-ая стадия) и *S. Eridania* (3% стадия), было достигнуто экстремальное воздействие для обоих насекомых-вредителей. Максимальный процент дефолиации (среднее  $\pm$  S.E.) от личинок *C. includens* (1-ая-стадия) и личинок *S. eridania* (3я стадия) в тепличном опыте с искусственным заражением представлен в табл.8.

Таблица 8. Максимальный процент дефолиации (среднее  $\pm$  S.E.) от личинок *C. includens* (1-ая стадия) и личинок *S. eridania* (3-я стадия) в тепличном опыте с искусственным заражением объектов созданных при помощи конструкторов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 10 в сравнении с положительным и отрицательным контролем

Трансформационный конструктор	Объект	ИГ	Максимальный % дефолиации (среднее $\pm$ S.E.)			
			<i>C. includens</i>		<i>S. eridania</i>	
ПОЗ	GM_A19478	Cry1Ac	1,0 $\pm$ 0,7	C	78,8 $\pm$ 1,3	A
Конструктор 1	MON87751	Cry2Ab+ Cry1A.105	0,5 $\pm$ 0,3	C	13,8 $\pm$ 1,3	D
	10		0 $\pm$ 0	C	11,3 $\pm$ 1,3	D
Конструктор 2	20	Cry2Ab	0,8 $\pm$ 0,5	C	13,8 $\pm$ 2,4	D
Конструктор 3	29	Cry1A.105	3,5 $\pm$ 1,6	C	82,5 $\pm$ 4,8	A
Конструктор 4	40	Cry2Ab+ Cry1A.105	3,3 $\pm$ 1,0	C	36,3 $\pm$ 5,5	B
Конструктор 5	46	Cry2Ab	4,8 $\pm$ 1,0	C	30,0 $\pm$ 4,6	BC
Конструктор 6	42	Cry1A.105	9,8 $\pm$ 1,0	C	80,0 $\pm$ 4,6	A
Конструктор 8	48	eCry2Ab+ Cry1A.105	0,3 $\pm$ 0,3	C	12,5 $\pm$ 2,5	D
	49		0,3 $\pm$ 0,3	C	13,8 $\pm$ 1,3	D
	50		2,0 $\pm$ 1,1	C	14,3 $\pm$ 0,8	D
Конструктор 7	51	Cry2Ab+Cry1A.105	40,0 $\pm$ 6,8	B	73,3 $\pm$ 3,3	A
	52		4,0 $\pm$ 1,2	C	35,0 $\pm$ 2,9	B
	53		4,8 $\pm$ 1,0	C	38,8 $\pm$ 4,3	B
Конструктор 10	54	eCry2Ab	0,8 $\pm$ 0,5	C	15,0 $\pm$ 2,0	CD
	55		0,5 $\pm$ 0,3	C	12,5 $\pm$ 1,4	D
НЕГ	A3555	Отрицательный	76,9 $\pm$ 5,3	A	79,4 $\pm$ 2,0	A
	A5547		65,0 $\pm$ 10,4	A	82,5 $\pm$ 2,5	A

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

Результаты этих тепличных опытов показывают, что объект сои MON87751 демонстрировали значительно меньше повреждений от *S. eridania* (1-ая стадия или 3-я стадия), *A. gemmatalis* (1-ая стадия), или *C. includens* (1-ая стадия) при сравнении с повреждениями в отрицательном контроле в том же опыте (табл. 7 и 8). Кроме того, в этих тепличных опытах, объект сои MON87751 получил значительно меньше повреждений от личинки *C. Eridania* (1-ая стадия и 3-я стадия) по сравнению с трансгенными объектами сои, экспрессирующими Cry1Ac (табл. 7 и 8), демонстрируя расширенную активность объекта MON87751 по сравнению с трансгенным объектом сои доступным в настоящее время для контроля чешуекрылых вредителей.

Далее в этих тепличных опытах объект сои MON87751 получил значительно меньше повреждений от личинки *C. eridania* по сравнению с [1] любым из объектов, созданных при помощи конструкторов 4, 5 или 6 (3-я стадия развития личинки), или объектов, созданных при помощи конструктора 6 экспрессирующих только Cry1A. 105 объект 1-ая стадия развития личинки), или объектов, созданных при помощи конструктора 3 экспрессирующих только Cry1A. 105 объект (1ая стадия развития личинки и 3я-стадия развития личинок) и [2] при сравнении объектов, созданных при помощи конструктора 7 экспрессирующих Cry2Ab и Cry1A. 105 без энхансера (1-ая стадия и 3-ая стадия развития личинки), демонстрирующие превосходную производительность объекта MON87751 по сравнению с объектами, созданными при помощи конструкторов 4, 5, 6 или 7 (табл. 7 и 8).

#### Пример 4.

Открытые полевые опыты эффективности проводились для оценки эффективности экспериментального объекта сои MON87751 и объектов, созданных при помощи различных трансформационных конструкторов 1, 2, 3, 4, 5 и 6, против естественной полевой вспышки численности чешуекрылых вредителей. Сравнение объектов, созданных при помощи конструкторов 2 или 5 (экспрессия только Cry2Ab), и объектов, созданных при помощи конструкторов 3 или 6 (экспрессия только Cry1A. 105), с объектами, созданными при помощи конструкторов 1 или 4 (экспрессия и Cry1Ab, и Cry1A. 105) было использовано для определения относительного вклада каждого отдельного Cry белка (т.е. только Cry2Ab, или только Cry1A. 105) к эффективности отмеченной в объектах, экспрессирующих оба Cry белка (т.е., Cry2Ab и Cry1A. 105) из одного конструктора. Полевые опыты эффективности аборигенных популяций эндемичных вредителей сои проводились на протяжении нескольких сезонов, в нескольких местах проведения полевых опытов, и в трех географических местах.

В первоначальных полевых опытах эффективности проведенных в одном географическом месте, оцениваемые объекты (т.е., исходные) включали двенадцать объектов, созданных при помощи конструктора 1 и экспрессирующих оба Cry белка, Cry2Ab и Cry1A. 105 (в том числе и объект MON87751), два объекта, созданных при помощи конструктора 2 и экспрессирующих только Cry2Ab, и три объекта, созданных

при помощи конструктора 3 экспрессирующих только Cry1A. 105. В первоначальных полевых опытах эффективности проведенных во втором географическом месте, объекты, созданные при помощи конструкторов 1, 2 и 3 были оценены и включали 11 объектов, экспрессирующих оба Cry белка, Cry2Ab и Cry1A. 105 (созданных путем трансформации при помощи конструктора 1, включая объект MON87751), два объекта, экспрессирующие только Cry2Ab (объекты, созданные путем трансформации при помощи конструктора 2), и три объекта, экспрессирующие только Cry1A. 105 (объекты, созданные путем трансформации при помощи конструктора 3). Во втором сезоне полевые опыты эффективности проводились в 3-х географических местах, оцениваемые объекты (т.е., исходные) включали три объекта экспрессирующих оба Cry белка, Cry2Ab и Cry1A. 105 (объекты, созданные путем трансформации при помощи конструктора 1 включая объект MON87751), один объект, экспрессирующий только Cry2Ab (объекты, созданные путем трансформации при помощи конструктора 2), и один объект, экспрессирующий только Cry1A. 105 (объекты, созданные путем трансформации при помощи конструктора 3). Объекты оцениваемые в открытых полевых опытах эффективности включали, поколения с R3 по R7.

На каждом участке открытого полевого опыта были помещены тестовые блоки и проводилось естественное поражение аборигенными популяциями целевых чешуекрылых насекомых-вредителей. Тестовый блок оставался непораженным целевыми насекомыми (Чешуекрылые). Однако, испытательные блоки были опрысканы, чтобы предотвратить значительный ущерб от нецелевых насекомых-вредителей. Все экспериментальные объекты были на основании зародышевой плазмы сои A3555, относительная группа зрелости 3 (RM3). Другие исходные объекты в опытах включали положительный контроль MON87701 (экспрессирующий Cry1Ac) или GM\_A19459 (RM5); негативный родительский контроль A3555 (фиолетовый цветок, RM3); и негативный промышленный контроль A5547 (белый цветок, MG5) или CMA5805 (белый цветок, RM5).

При создании и проведении тепличных опытов использовались стандартные методы. Заболеваемость от личинок чешуекрылых вредителей, дефолиация и стадия роста растений регистрировались периодически (т.е., каждые 5-14 дней), начиная с начала активности целевых чешуекрылых и заканчивая, когда активность целевых чешуекрылых прекращалась или растения достигли стадии роста R7. Данные по поражению насекомыми были собраны со строк 1 и 4 только для того, чтобы избежать повреждения растений в строках 2 и 3, которые были собраны для доходности данных. Контроль и учет вредителей по данным заболеваемости проводился следующим образом: дефолирующие чешуекрылые (т.е., *A. gemmatalis*, *C. includens*, *R. ni*, *Spodoptera* spp.) отслеживались с использованием кулисы или вертикального ударного листа, с использованием как минимум двух кулис или вертикальных ударных листов на участок. Общее количество личинок для каждого целевого вида, было учтено и число выборок в пределах каждого участка были записаны как среднее количество личинок на м рядов (общее число личинок ÷ число выборок ÷ длина ткани/листа в метрах) для каждого целевого вида было учтено. Последующие отборы проб были сделаны так, чтобы избежать повторных выборок в том же районе каждого участка. В полевых опытах эффективности проводившихся в одном географическом месте, данные также были записаны в опытных позициях для рационализации для повреждений от *H. zea* путем случайного выбора 20 или 33 растения/место, и запись количества повреждений от личинок. На втором географическом месте, один опыт был рационализирован *H. zea* путем случайного выбора 10 растений на участке и записи общего количества бобов и число поврежденных бобов на одном растении.

Данные по зараженности *Elasmopalpus lignosellus* были зафиксированы путем подсчета общего числа растений в каждой делянке с повреждением (понижение, умирающие или умершие) вследствие питания личинок. Данные по повреждению для этого насекомого был взяты в одной временной точке, когда отмечалось максимальное повреждение.

Помимо целевых вредителей нецелевые вредители, в первую очередь, с потенциалом для опережения экономических порогов вредоносности (например, щитники), контролировались периодически сачком, модифицированным сачком, или наземной тканью в произвольно выбранных местах в испытательном блоке, и оценивались, если достигли или приближались к уровню экономического ущерба. В ходе опыта зрелости, все ряды 2 и 3 с каждого участка были собраны, и оба, общий вес и процент влажности, для каждого участка был записан. Во время сбора урожая, значительные пробелы (растения не касались друг друга) в убираемых рядах были отмечены и общая протяженность этих пробелов была записана. Урожай был рассчитан после коррекции веса семени по 13% влажности. Заболеваемость от личинок, дефолиация и данные по урожаю были подвергнуты дисперсионному анализу для определения значимых источников вариабельности среди линии и повторности для каждого насекомого в каждом месте при 0,05 уровне вероятности (P). Существенные различия между средними значениями определялась с использованием теста Тьюки-Крамера (Kramer 1956) при P = 0,05.

В опытах на открытом поле, проведенных в полевом опытно участке 1, дефолирующие гусеницы были впервые обнаружены на стадии роста R3 и увеличились до умеренно повреждающих уровней на стадии роста R6. Обнаруженные виды включают *A. gemmatalis* (98%), *R. ni* (2%) и *Spodoptera* spp. (1%). Повторение не являлось значимым источником изменчивости в заболеваемости от личинок (F=0,0435; df=2, 57; P=0,9575), дефолиации (F=0,0807; df=2,57; P=,9226) или урожае (F=0,0213; df=2, 57; P=0,979),

но объект был очень значимым для всех трех (заболеваемости от личинок:  $F=69,6956$ ;  $df=19, 38$ ;  $p<0,0001$ ; дефолиации:  $F=25,9918$ ;  $df=19, 40$ ;  $p<0,0001$ ; урожайность:  $F=3,357$ ;  $df=19, 38$ ;  $p=0,0007$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок (табл. 9) достигала 139-189 личинок на м рядов в отрицательном контроле, в то время как личинки практически не были обнаружены в любом из трансгенных образцов. Максимальная степень дефолиации (табл. 9) составляла 21-27% в отрицательном контроле и отсутствовала во всех трансгенных образцах. Урожайность (табл. 9) была снижена в обоих отрицательных контролях относительно всех трансгенных образцов, хотя изменчивость урожайности снижается значение этих сокращений.

Объект MON87751 проявлял значительно меньшую заболеваемость от дефолирующих личинок чешуекрылых (сезон кумулятивно) и значительно меньший процент дефолиации (сезонный максимум) по сравнению с нетрансгенным контролем.

Таблица 9. Заболеваемость дефолирующими личинками чешуекрылых (сезон кумулятивно) и дефолиация (сезонный максимум) объектов, созданных при помощи конструкций 1, 2 или 3 в опытах эффективности в открытом поле, проведенные в полевых опытах участка 1

Трансформационный конструкт	ИГ	Объект	Личинок/ на м рядов (сезон кумулятивно)		% Дефолиации (сезонный максимум)		Урожайность (кг/га)
	Cry1Ac	GM_A19459	2,2 ± 0,3	с	0 ± 0	В	2194 ± 89
Конструкт 1	Cry2Ab+ Cry1A.105	2	0,8 ± 0,2	с	0 ± 0	В	2130 ± 28
		3	0,8 ± 0,2	с	0 ± 0	В	1855 ± 240
		4	0,3 ± 0,0	с	0 ± 0	В	1643 ± 105
		MON87751	0,3 ± 0,3	с	0 ± 0	В	1970 ± 126
		7	0,8 ± 0,2	с	0 ± 0	В	1552 ± 218
		8	2,0 ± 0,3	с	0 ± 0	В	2039 ± 138
		9	1,7 ± 0,8	с	0 ± 0	В	1628 ± 155
		10	0,5 ± 0,4	с	0 ± 0	В	1653 ± 247
		11	0,1 ± 0,1	с	0 ± 0	В	1957 ± 44
		14	1,6 ± 0,9	с	0 ± 0	В	1990 ± 65
		18	0,5 ± 0,3	с	0 ± 0	В	1885 ± 91
		19	1,5 ± 0,9	с	0 ± 0	В	1839 ± 55
Конструкт 2	Cry2Ab	20	2,0 ± 0,6	с	0 ± 0	В	1993 ± 64
		22	1,3 ± 0,7	с	0 ± 0	В	1957 ± 31
Конструкт 3	Cry1A.105	29	0,8 ± 0,5	с	0 ± 0	В	1841 ± 124
		30	0,8 ± 0,4	с	0 ± 0	В	1833 ± 69
		31	0,4 ± 0,2	с	0 ± 0	В	1439 ± 357
	Отрицательный	A3555	138,6 ± 10,2	б	27,2 ± 1,7	А	1288 ± 31
A5547		188,9 ± 25,1	а	21,0 ± 6,3	А	731 ± н/д	

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом опыте на открытом поле, проведенном в полевом опыте на участке 2, дефолирующие гусеницы были впервые обнаружены в конце вегетативной стадии роста, и увеличились до очень разрушительного уровня на стадии роста R3. Обнаруженные виды включают *A. gemmatalis* (53%), "пяденицы" (предположительно *C. includens*, но возможно *R. nu*) (44%) и *Spodoptera* spp. (3%). Повторение не являлось значимым источником изменчивости при личиночной заболеваемости ( $F=0,0085$ ;  $df=2,57$ ;  $P=0,9915$ ) или дефолиация ( $F=0,0027$ ;  $df=2,57$ ;  $P=0,9973$ ), хотя объект был очень значимым для обоих (заболеваемость от личинок:  $F=19,644$ ;  $df=19,40$ ;  $P<0,0001$ ; дефолиация:  $F=671,3147$ ;  $df=19, 40$ ;  $P<0,0001$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок (табл. 10) составила 43-50 личинок на м рядов в отрицательном контроле, в то время как незначительное число встретилось у трансгенных образцов. Максимальная степень

дефолиации (табл. 10) насчитывала 87-90% в отрицательном контроле, в то время как следовые уровни наблюдались для всех трансгенных образцов.

Объект MON87751 проявлял значительно меньшую заболеваемость от дефолирующих личинок чешуекрылых (сезон кумулятивно) и значительно меньший процент дефолиации (сезонный максимум) по сравнению с нетрансгенным контролем.

Таблица 10. Заболеваемость дефолирующими личинками чешуекрылых (сезон кумулятивно) и дефолиация (сезонный максимум) объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2 или 3 в опытах эффективности в открытом поле, проведенные в полевых опытах участка 2

Трансформационный конструктор	ИГ	Объект	Личинок/ на м рядов (сезон кумулятивное)		% Дефолиации(сезон максимум)	
	Cry1Ac	GM_A19459	1,9 ± 0,4	b	0 ± 0	b
Конструктор 1	Cry2Ab+Cry1A.105	2	1,3 ± 0,2	b	0 ± 0	b
		3	2,3 ± 0,6	b	0 ± 0	b
		4	3,1 ± 0,4	b	0 ± 0	b
		MON87751	1,6 ± 0,3	b	0 ± 0	b
		7	1,7 ± 0,5	b	0 ± 0	b
		8	2,3 ± 1,6	b	0 ± 0	b
		9	2,0 ± 0,7	b	1,7 ± 1,7	b
		10	2,1 ± 1,0	b	0 ± 0	b
		11	3,3 ± 1,0	b	0 ± 0	b
		14	1,1 ± 0,2	b	0 ± 0	b
		18	2,8 ± 0,6	b	0 ± 0	b
		19	3,1 ± 0,8	b	0 ± 0	b
Конструктор 1	Cry2Ab	20	2,9 ± 1,3	b	0 ± 0	b
		22	2,4 ± 0,9	b	0 ± 0	b
Конструктор 3	Cry1A.105	29	1,5 ± 0,1	b	2,0 ± 2,0	b
		30	2,4 ± 0,9	b	2,0 ± 2,0	b
		31	1,8 ± 0,7	b	0 ± 0	b
	Отрицательный	A3555	42,9 ± 10,4	a	86,7 ± 3,3	a
		A5547	49,9 ± 8,4	a	90,0 ± 0,0	a

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних

Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом опыте на открытом поле, проведенном в полевом опыте на участке 3, повторность не являлась важным источником изменчивости в общих бобах ( $F=0,312$ ;  $df=2,24$ ;  $P=0,7349$ ) или поврежденных бобах ( $F=0,0438$ ;  $df=2,24$ ;  $P=0,9572$ ) на растение или урожай ( $F=0,2221$ ;  $df=2,24$ ;  $P=0,8025$ ). Объект, однако, был существенным источником изменчивости в общих бобах ( $F=4,3643$ ;  $df=8,18$ ;  $P=0,0045$ ) и поврежденных бобах ( $F=34,5288$ ;  $df=8,18$ ;  $P<0,0001$ ) на растение или урожай, но не урожай ( $F=0,6237$ ,  $df=8,18$ ,  $P=0,7475$ ). Отрицательный контроль насчитал 25,0-26,0 бобов на растение с 30,8-31,0% поврежденных бобов, хотя тестовые объекты, включая объект MON87751, насчитал 28,9-38,9 бобов на растение с <2% поврежденных бобов (табл. 11). Снижение количества бобов на растение в отрицательном контроле, скорее всего, результат преждевременного опадения бобов вызванного повреждениями гусеницей хлопковой сойки, как многочисленные поврежденные бобы были замечены лежащими на земле под растениями и в негативном контроле (но не в тестовых объектах) (табл. 11).

Таблица 11. Общее количество и поврежденные бобы на одном растении в опытах в открытом поле при заражении хлопковой сойкой, проведенного в полевых опытах участка 3, оцениваемых объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2 или 3

Трансформационный конструктор	Объект	ИГ	Всего бобов/растение		Поврежденных бобов/растение	
Конструктор 1	MON87751	Cry2Ab + Cry1A.105	38,9 ± 2,9	A	1,0 ± 0,4	B
		8	37,4 ± 4,1	AB	1,4 ± 0,4	B
		10	37,2 ± 1,9	AB	0,9 ± 0,5	B
Конструктор 2	20	Cry2Ab	38,6 ± 1,0	A	0,8 ± 0,5	B
Конструктор 3	29	Cry1A.105	35,1 ± 2,7	AB	0,6 ± 0,2	B
НЕГ	40-3-2		25,0 ± 4,0	AB	30,8 ± 1,3	A
		A3555	26,0 ± 0,1	B	31,0 ± 6,5	A

Средние значения ( $\pm$  S.E.) в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В опытах на открытом поле, проведенных в полевом опытном участке 4, дефолирующие гусеницы были впервые обнаружены на стадии роста R3, и увеличился до высоко повреждающих уровней на стадии роста R6-R7. Обнаруженные виды включают *A. gemmatilis* (11%), *Plathypena scabra* (17%) и *C. includens* (6%). Повторение не являлось значимым источником изменчивости при заболеваемости от личи-

нок ( $F=0,0219$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,9783$ ), дефолиации ( $F=0,0007$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,9993$ ), или урожае ( $F=1,1477$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,3233$ ). Объект был от значительного до весьма значительного, для всех трех (заболеваемость от личинок:  $F=96,9673$ ;  $df=23,48$ ;  $P<0,0001$ ; дефолиации:  $F=363,8854$ ;  $df=23,48$ ;  $P < 0,0001$ ; урожайности:  $F=1,7814$ ;  $df=23,48$ ;  $P=0,046$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок (табл. 12) достигала 117-123 личинок на м рядов в отрицательном контроле, в то время как личинки практически не были обнаружены в любом из трансгенных образцов. Максимальная степень дефолиации (табл. 12) составляла 68-83% в отрицательном контроле и отсутствовала во всех трансгенных образцах.

Таблица 12. Заболеваемость дефолирующими личинками чешуекрылых (сезон кумулятивно) и % дефолиации (сезонный максимум) объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2 или 3 в опытах эффективности в открытом поле, проведенные в полевых опытах участка 4

Трансформационный конструктор	ИГ	Объект	Личинок/ на м рядов (сезон кумулятивное)		% Дефолиации(сезон максимум)	
	Сгу1Ac	GM_A19478	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
Конструктор 1	Сгу2Ab+Сгу1A.105	2	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
		3	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		4	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
		MON87751	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		8	1,7 ± 0,9	b	0 ± 0	c
		9	1,3 ± 1,3	b	0 ± 0	c
		10	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		11	1,0 ± 0,0	b	0 ± 0	c
		14	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
		18	0 ± 0	b	0 ± 0	c
		19	1,3 ± 1,3	b	0 ± 0	c
Конструктор 2	Сгу2Ab	20	2,0 ± 2,0	b	0 ± 0	c
		22	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
Конструктор 3	Сгу1A.105	31	1,0 ± 0,6	b	0 ± 0	c
		29	0,7 ± 0,7	b	0 ± 0	c
	Отрицательный		122,7 ± 16,2	a	83,3 ± 3,3	a
		A5547	117,0 ± 2,1	a	68,3 ± 4,4	b

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом опыте на открытом поле, проведенном в полевом опыте на участке 5, дефолирующие гусеницы были впервые обнаружены на этапе роста R2, и увеличились до очень разрушительного уровня на стадиях роста R5-R6. Обнаруженные виды включают *A. gemmatalis* (93%), *C. includens* (5%) и *Spodoptera ornithogalli* (2%). Повторение не являлось значимым источником изменчивости при заболеваемости от личинок ( $F=0,0206$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,9796$ ), дефолиации ( $F=0,0054$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,9946$ ), или урожайности ( $F=0,2379$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,7889$ ). Объект был весьма знаменательным для всех трех (заболеваемость от личинок:  $F=122,46$ ;  $df=23,48$ ;  $p<0,0001$ ; дефолиации:  $F=623,0217$ ;  $df=23,48$ ;  $p < 0,0001$ ; урожайности:  $F=2,9366$ ;  $df=23,48$ ;  $p=0,0008$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок (табл. 13) достигала 76-137 личинок на м рядов в отрицательном контроле, в то время как личинки практически не были обнаружены в любом из трансгенных образцов. Максимальная степень дефолиации (табл. 13) составляла 82-88% в отрицательном контроле и отсутствовала во всех трансгенных образцах.

Таблица 13. Заболеваемость дефолирующими личинками чешуекрылых (сезон кумулятивно) и дефолиация (сезонный максимум) объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2 или 3 в опытах эффективности в открытом поле, проведенных в полевых опытах участка 5

Трансформационный конструктор	ИГ	Объект	Личинок/ на м рядов (сезон кумулятивное)		% Дефолиации(сезон максимум)	
	Сгу1Ac	GM_A19478	1,0 ± 0,6	c	0 ± 0	c
Конструктор 1	Сгу2Ab+Сгу1A.105	2	1,0 ± 1,0	c	0 ± 0	c
		3	1,7 ± 0,3	c	0 ± 0	c
		4	1,0 ± 0,6	c	0 ± 0	c
		MON87751	1,0 ± 0,6	c	0 ± 0	c
		8	1,0 ± 0,6	c	0 ± 0	c
		9	1,7 ± 0,3	c	0 ± 0	c
		10	0,7 ± 0,7	c	0 ± 0	c
		11	1,3 ± 0,9	c	0 ± 0	c
		14	2,0 ± 1,2	c	0 ± 0	c
		18	1,0 ± 1,0	c	0 ± 0	c
		19	0,3 ± 0,3	c	0 ± 0	c
Конструктор 2	Сгу2Ab	20	2,3 ± 1,3	c	0 ± 0	c
		22	0,3 ± 0,3	c	0 ± 0	c
Конструктор 3	Сгу1A.105	31	1,3 ± 0,3	c	0 ± 0	c
		29	1,3 ± 0,3	c	0 ± 0	c
	Отрицательный		76,0 ± 7,0	b	81,7 ± 4,4	b
		A5547	137,0 ± 10,6	a	88,3 ± 1,7	a

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом открытом полевом опыте, проведенном в полевом опыте на участке 5, дефолирующие гусеницы (в первую очередь *H. zea* и *C. includens*) были обнаружены на этапе роста R6, но никогда не достигали значительного количества. Однако существенный ущерб растениям от *E. lignosellus* в границах, буферах и отрицательном контроле произошел в начале сезона, приведя к поникшим, умирающим или умершим растениям на этапах роста R5-R6 во время которых были собраны данные по повреждению. Повторение не являлось значительным источником повреждения растений *E. lignosellus* ( $F=0,3431$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,71$ ). Объект был весьма знаменательным для повреждения растений *E. Lignosellus*:  $F=16,7555$ ;  $df=23, 48$ ;  $p<0,0001$ ). Процент растений, поврежденных *E. lignosellus* (табл. 14) насчитал 10-28% в отрицательном контроле, в то время как растения трансгенных образцов не продемонстрировали повреждений, в том числе объект MON87751.

Таблица 14. Распространенность поражения дефолиацией *E. lignosellus* LCSB в опытах в открытом поле при заражении хлопковой сойкой, проведенного в полевых опытах участка 3, оцениваемых объектов, созданных при помощи конструкций 1, 2 или 3

Трансформационный конструкт	ИГ	Объект	# Поврежденных растений <i>E. lignosellus</i>	
	Cry1Ac	GM_A19478	0 ± 0	c
Конструкт 1	Cry2Ab+Cry1A.105	2	0 ± 0	c
		3	0 ± 0	c
		4	0 ± 0	c
		MON87751	0 ± 0	c
		8	0 ± 0	c
		9	0 ± 0	c
		10	0 ± 0	c
		11	0 ± 0	c
		14	0 ± 0	c
		18	0 ± 0	c
Конструкт 2	Cry2Ab	19	0 ± 0	c
		20	0 ± 0	c
		22	0 ± 0	c
Конструкт 3	Cry1A.105	29	0 ± 0	c
		31	0 ± 0	c
		Отрицательный	A3555	10,3 ± 5,9
		A5547	28 ± 4	a

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом опыте на открытом поле, проведенном в полевом опыте на участке 7, дефолирующие гусеницы были впервые обнаружены на этапах роста R1-R2 и увеличились до очень разрушительного уровня на стадиях роста R4-R6. Обнаруженные виды включают *C. includens* (54%), *Spodoptera exigua* (43%), и *Estigmene acraea* (2%). Повторение не являлось значимым источником изменчивости при заболеваемости от личинок ( $F=0,0866$ ;  $df= 2,69$ ;  $P=0,9172$ ), или дефолиации ( $F=0,1129$ ;  $df=2,69$ ;  $P=0,8934$ ). Объект был весьма знаменательным для обоих (при заболеваемости от личинок:  $F=69,918$ ;  $df=23, 48$ ;  $p < 0,0001$ ; дефолиации:  $F=21,6603$ ;  $df=23, 48$ ;  $p < 0,0001$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок (табл. 15) достигала 152-166 личинок на м рядов в отрицательном контроле, в то время как личинки практически не были обнаружены в Cry1Ac позитивном контроле или объектах, созданных при помощи конструкций 1, 2 или 3 экспрессирующим Cry2Ab и/или Cry1A. 105. Максимальная степень дефолиации (табл. 15) в среднем 24% наблюдалась в отрицательном контроле, но не превышала следовые уровни в объектах, созданных при помощи конструкций с 1, 2 или 3, экспрессирующих Cry2Ab и/или Cry1A. 105, в том числе у объекта MON87751 или у положительного Cry1Ac контроля.

Таблица 15. Заболеваемость дефолирующими личинками чешуекрылых (сезон кумулятивно) и дефолиация (сезонный максимум) объектов, созданных при помощи конструкторов 1, 2 или 3 в опытах заражения в открытом поле, проведенные в полевых опытах участка 7

Трансформационный конструктор	ИГ	Объект	Личинок/ на м рядов (сезон кумулятивное)	% Дефолиации(сезон максимум)	
	Cry1Ac	GM_A19478	6,0 ± 1,5 d	0,7 ± 0,7 c	
Конструктор 1	Cry2Ab+Cry1A.105	2	2,5 ± 1,2 d	0 ± 0 c	
		3	3,6 ± 1,3 d	0 ± 0 c	
		4	3,2 ± 1,3 d	0,3 ± 0,3 c	
		MON87751	3,5 ± 1,5 d	0 ± 0 c	
		8	3,9 ± 0,8 d	0 ± 0 c	
		9	3,0 ± 0,6 d	0 ± 0 c	
		10	2,3 ± 0,5 d	0 ± 0 c	
		11	3,0 ± 0,4 d	0 ± 0 c	
		14	2,7 ± 0,9 d	0 ± 0 c	
		18	4,3 ± 0,8 d	0,3 ± 0,3 c	
Конструктор 2	Cry2Ab	20	7,0 ± 1,4 d	0 ± 0 c	
		22	4,5 ± 0,7 d	0,3 ± 0,3 c	
Конструктор 3	Cry1A.105	31	3,3 ± 0,9 d	0 ± 0 c	
		29	5,0 ± 1,9 d	0 ± 0 c	
	Отрицательный	A3555	152,0 ± 14,6 a	24,0 ± 1,0 a	
			A5547	165,8 ± 11,6 a	24,0 ± 1,0 a

Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В другом опыте на открытом поле, проведенном в полевом опыте 8, наблюдалось умеренное давление дефолирующими гусеницами *C. includens* (41%), *A. gemmatalis* (38%), *C. Frugiperda* (13%) и *C. ornithogalli* (8%) в течение R4-R6 стадий роста. Повторение не являлось значимым источником изменчивости при поражении личинками ( $F=0,0924$ ;  $df=3,52$ ;  $P=0,9639$ ), или дефолиации ( $F=0,372$ ;  $df=3,52$ ;  $P=0,7735$ ). Объект стал важным источником изменчивости при поражении личинками ( $F=40,008$ ,  $df=13,42$ ,  $P<0,0001$ ) и дефолиации ( $F=11,9356$ ,  $df=13,42$ ,  $P<0,0001$ ). Кумулятивная заболеваемость от личинок и максимальная дефолиация в среднем 9,1-13,9 личинок на м рядов и 31-35% (последнее умеренно выше экономического порога вредоносности), соответственно, в отрицательном контроле, но не превышало следовые количества в положительном контроле и во всех тестовых объектах, включая объект MON87751 (табл. 16). В опыте не было отмечено появления нецелевых насекомых-вредителей.

Таблица 16. Кумулятивная распространенность дефолирующих личинок чешуекрылых, максимальный процент дефолиации и урожай в опытах с естественным поражением в открытом поле, проведенные в полевых опытах участка 8.

Трансформационный конструктор	Объект	ИГ	Кумулятивная распрот. личинок/м рядов	Максимальный % дефолиации
ПОЗ	GM_A19478	Cry1Ac	0,5 ± 0,2 C	0 ± 0 B
Конструктор 1	MON87751	Cry2Ab+Cry1A.105	0,3 ± 0,2 C	0 ± 0 B
		8	0,3 ± 0,2 C	0 ± 0 B
	10		0,7 ± 0,4 C	0,5 ± 0,5 B
Конструктор 2	20	Cry2Ab	0,7 ± 0,5 C	5,0 ± 5,0 B
Конструктор 3	29	Cry1A.105	1,3 ± 0,8 C	5,0 ± 5,0 B
Конструктор 4	32	Cry2Ab+Cry1A.105	1,4 ± 0,7 C	0,3 ± 0,3 B
			40	0,6 ± 0,1 C
Конструктор 5	46	Cry2Ab	0,5 ± 0,1 C	0,3 ± 0,3 B
Конструктор 6	42	Cry1A.105	1,0 ± 0,4 C	0,3 ± 0,3 B
НЕГ	A3555	Отрицательный	9,1 ± 0,5 B	35,0 ± 9,6 A
			A5547	13,9 ± 1,0 A

Средние значения (± S.E.) в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера,  $p < 0,05$ ).

В опытах на открытом поле во втором сезоне, проведенных на полевом опытном участке 6, очень высокое воздействие *H. zea* наблюдалось на стадиях роста R3-R5. Повторение не являлось значимым источником изменчивости при повреждении бобов ( $F=0,0280$ ;  $df=3,52$ ;  $P=0,9936$ ). Объект стал важным источником изменчивости при повреждении бобов ( $F=15,4758$ ,  $df=13, 42$ ,  $P<0,0001$ ). Отрицательный контроль насчитал 64-78% поврежденных бобов, в то время как практически никаких повреждений не произошло в любом из тестовых объектов, включая объект MON87751 (табл. 17).

Таблица 17. Кумулятивная распространенность дефолирующих личинок чешуекрылых, максимальный процент дефолиации и урожай в опытах с естественным поражением в открытом поле, проведенные на полевых опытах участка 6

Трансформационный конструктор	Объект	ИГ	% Поврежденных бобов	
ПОЗ	GM A19478	Cry1Ac	0,1 ± 0,1	C
Конструктор 1	MON87751	Cry2Ab+Cry1A.105	0,1 ± 0,1	C
	8		0,1 ± 0,1	C
	10		0,7 ± 0,4	C
Конструктор 2	20	Cry2Ab	0 ± 0	C
Конструктор 3	29	Cry1A.105	0 ± 0	C
Конструктор 4	32	Cry2Ab+Cry1A.105	0,1 ± 0,1	C
	40		0,5 ± 0,2	C
Конструктор 5	46	Cry2Ab	0,6 ± 0,4	C
Конструктор 6	42	Cry1A.105	0,6 ± 0,5	C
НЕГ	A3555	Отрицательный	63,8 ± 4,4	B
	A5547		78,0 ± 8,8	A
Значения в столбцах, помеченных одинаковой буквой существенно не различаются (тест средних Тьюки-Крамера, $p < 0,05$ ).				

Результаты нескольких открытых полевых опытов, описанных в этом примере, в сочетании с результатами нескольких тепличных опытов (описанных в примере 3) далее подтверждают эффективность, сезонного подавления популяций личинок чешуекрылых вредителей, с которыми сталкиваются все трансгенные объекты сои, созданные при помощи конструкторов 1, 2 или 3 на протяжении пяти поколений растений (от R2 до R7), предполагая стабильную экспрессию трансгенов внутри и между поколениями.

Объединенные результаты демонстрируют, что в условиях, превышающих пороговое значение воздействия всеми четырьмя основными целевыми вредителями *Anticarsia gemmatalis* и *Chrysodeixis includens* в одном географическом месте, и тех же целевых вредителей плюс *Rachiplusia* пи и *Crociosema arogeta* во втором географическом месте), эффективность трансгенных объектов, созданных с помощью конструктора 1, 2 или 3, включая объект MON87751, была эквивалентна трансгенным объектам экспрессирующим Cry1Ac и была ранее продемонстрирована для контроля чешуекрылых насекомых-вредителей сои. Объекты созданные при помощи конструктора 2 или 3 и экспрессирующие только белок Cry2Ab или только белок Cry1A.105 соответственно, также продемонстрировали такую же эффективность как трансгенные объекты экспрессирующие Cry1Ac белок, предполагая, что экспрессия обоих Cry2Ab и Cry1A.105 белков в объекте MON87751 будет иметь повышенную долговечность, большую чем у Cry1Ac трансгенных объектов путем улучшенного управления устойчивостью к насекомым-вредителям.

Эквивалентная эффективность среди объектов, созданных при помощи конструктора 1, в том числе объекта MON87751, кроме того, была продемонстрирована против многочисленных вторичных вредителей, в том числе трех видов совок (*Spodoptera exigua*, *S. frugiperda* и *S. eridania*), два вида (*Helicoverpa zea* и *H. gelotopon*), один вид (*Elasmopalpus lignosellus*) и один дефолирующий вид (*Plathypena scabra*).

Пример 5.

В этом примере описывается молекулярное исследование объекта MON87751, которое включает экспрессию белка и обширное молекулярное исследование. Данное молекулярное исследование было завершено одновременно на объектах, которые были испытаны в агрономических полевых опытах, тепличных опытах эффективности, и полевых опытах эффективности.

Для молекулярного исследования объект MON87751, количество копии встроенных трансгенных последовательностей (содержащих обе Cry2Ab и Cry1A.105 кассеты, SEQ ID №:9) определяли с использованием комбинации из Саузерн блота и TAQMAN® анализа конечных проб. Молекулярный анализ подтвердил, что там была только одна вставка (Т-ДНК экспрессионная кассета, содержащая экспрессионные кассеты для обоих Cry2Ab и Cry1A.105 белков, и представленная SEQ ID №:9) без выявления остова вектора, и без обнаружения Т-ДНК кассеты, содержащей селективируемый/оценочный маркерные последовательности. Полное секвенирование одиночной вставки (SEQ ID №:9) в геномной ДНК объекта MON87751 подтвердило, что последовательность идентична последовательности трансформационного конструктора. Для экспрессии белка, листовые образцы были собраны из растений, гомозиготных по аллели объекта MON87751 и вытяжки, получали из лиофилизированных образцов, ИФА проводили согласно стандартным протоколам измерения уровня белка Cry2Ab или Cry1A.105 с антителами специфичными для Cry2Ab или Cry1A.105, соответственно, и результаты были выражены в миллионных долях (м.д.) сухой массы. Образцы листьев были собраны на R1 и R3 стадиях роста растений для объектов, которые были созданы путем трансформации с конструкторами 1, 2 или 3 и нетрансгенного контроля A3555. Результаты ИФА продемонстрировали, что уровни Cry2Ab у объектов, созданных при помощи конструкторов 1 и 2 варьировали от примерно 20 м.д. до примерно 50 м.д. сухой массы, за исключением объекта 8 (у которого, как было установлено, присутствовал связанный вирусный промотор, но никаких других по-

следовательностей, из селективируемой/оценочной маркерной Т-ДНК, и объект 8 далее не оценивался), и отсутствие экспрессии *Cry2Ab* у объектов, созданных при помощи конструкта 3 (экспрессирующих только *Cry1A. 105*) или нетрансгенного контроля (фиг. 3А). Уровни экспрессии белка *Cry2Ab* были примерно равны на R1 и R3 этапах роста. Результаты ИФА продемонстрировали, что уровни *Cry1A. 105* у объектов, созданных при помощи конструкта 1 и конструкта 3 варьировали от примерно 150 м.д. до около 800 м.д. сухой массы, и отсутствие экспрессии *Cry1A. 105* у объектов, созданных при помощи конструкта 2 (экспрессирующих только *Cry2Ab*) или нетрансгенного контроля (фиг. 3Б). Уровни экспрессии белка *Cry1A. 105* сильно варьировали для образцов листьев на этапе роста R3 по сравнению с этапом роста R1.

Дополнительные результаты ИФА демонстрируют, что уровни белка *Cry2Ab* у объектов, созданных при помощи конструкта 1 были выше относительно объектов, созданных при помощи конструкта 5 или конструкта 4, и как и ожидалось, не было обнаружено экспрессии *Cry2Ab* ни в нетрансгенном контроле, ни в объектах, созданных при помощи конструкта 6 (экспрессирующих только *Cry1A. 105*) (фиг. 4А). В том же наборе образцов листьев, результаты ИФА демонстрируют, что имеется двойной или более высокий уровень экспрессии *Cry1A. 105*, у объектов, созданных при помощи конструкта 1, приблизительно в четыре раза выше экспрессия для MON87751, при сравнении объектов, созданных или с конструктом 6 или с конструктом 4, и как и ожидалось, не было обнаружено экспрессии *Cry1A. 105* выражение обнаружено ни в нетрансгенном контроле, ни в объектах, созданных при помощи конструкта 5 (экспрессирующих только *Cry2Ab*) (фиг. 4Б). Для этих ИФА, образцы листьев были собраны на стадии роста R3 от растений, выращенных в каждом из двух отдельных мест тепличного опыта эффективности.

Дополнительные результаты ИФА демонстрируют, что уровни белка *Cry2Ab* в вытяжках из объекта, созданного при помощи конструкта 1 и объекта, созданного при помощи конструкта 2 были а) выше относительно объектов, созданных при помощи конструкта 4, конструкта 5 или конструкта 7; б) примерно таким же или немного ниже относительно объектов, созданных при помощи конструкта 9 или конструкта 11, и с) как и ожидалось, не было обнаружено экспрессии *Cry2Ab* ни в нетрансгенном контроле, ни в объектах, созданных при помощи конструкта 3 или конструкта 6 (экспрессирующих только *Cry1A. 105*) (фиг. 5). Для этих ИФА, образцы листьев были собраны на R3 и R5 стадиях роста, и уровни *Cry2Ab* были выше на R5 стадии роста для объектов, созданных при помощи конструкта 1 и конструкта 2, и уровни *Cry2Ab* были выше у объектов, созданных при помощи конструкта 9, и конструкта 11 (фиг. 5). В том же наборе образцов листьев, результаты ИФА демонстрируют, уровни белка *Cry1A. 105*, в вытяжках у объектов, созданных при помощи конструкта 1 и конструкта 3, были значительно выше по сравнению с объектами, созданными при помощи конструкта 4, конструкта 6, конструкта 9 или конструкта 7, и как ожидалось, не было обнаружено экспрессии *Cry1A. 105* ни в нетрансгенном контроле, ни в объектах, созданных при помощи конструкта 2 или конструкта 5 (экспрессирующих только *Cry2Ab*) (фиг. 6) Для этих ИФА, образцы листьев были собраны на R3 и R5 стадии роста, и уровни *Cry1A. 105* были на несколько порядков выше в R5 стадии роста для объектов, созданных при помощи конструкта 1 и конструкта 3, по сравнению с объектами, созданными при помощи конструкта 4, конструкта 6, конструкта 9 или конструкта 7, см. фиг. 6А оси Y нанесены 0 - 5000 м.д. в сухой массе и фиг. 6Б оси Y нанесены 0-500 м.д. в сухой массе. Данные ИФА указывают на то, что есть повышенная экспрессия обоих *Cry2Ab* и *Cry1A. 105* в объектах, созданных при помощи конструкта 1 по сравнению с объектами, созданными при помощи конструкта 4, конструкта 7 или конструкта 9, все содержащие две экспрессионные кассеты *Cry* белков - одна экспрессионная кассета кодирующая *Cry2Ab* и одна экспрессионная кассета, кодирующая *Cry1A. 105*. Кроме того, было отмечено, что сравнительно высокая экспрессия белков в объектах, созданных при помощи конструкта 1 (включая объект MON87751), конструкта 2 и конструкта 3, была стабильной в течение по крайней мере 4 поколений сои (R0, R1 R2 и R3), а уровень белка *Cry1A. 105* повышался в тканях листа, собранных с гомозиготных объектов на стадиях роста от R3 до R5 стадии.

Пример 6.

Этот пример описывает способы, полезные при определении наличия ДНК объекта MON87751 в образце сои. Пара ПЦП праймеров и зонд были разработаны с целью идентификации уникальной связи, образованной между геномной ДНК и произвольно заданным 3' концом встроенной ДНК объекта MON87751 (т.е., на 3' сайте сплайсинга) и заключается в SEQ ID №:10, SEQ ID №: 8, SEQ ID №:2, SEQ ID №:4 или SEQ ID №:6. Последовательность прямого олигонуклеотидного праймера SQ20267 (SEQ ID №:11) идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей позициям 11400-11426 SEQ ID №:10, и позициям 212 -238 SEQ ID №:8, и позициям 10066-10092 №:9. Последовательность обратного олигонуклеотидного праймера SQ25826 (SEQ ID №:12) идентична обратному комплементу нуклеотидной последовательности, соответствующей позициям 11454-11479 SEQ ID №:10, и позициям 266-291 SEQ ID №:8, и позициям 51-76 SEQ ID №:6, и позиции с 31 по 56 SEQ ID №:4. Последовательность олигонуклеотидного зонда PB10263 (SEQ ID №:13) идентична нуклеотидной последовательности, соответствующей позициям 11428-11446 SEQ ID №:10, и позициям 10094-10112 от SEQ ID №:9, и позициям 240-258 SEQ ID №:8, и позициям 25-43 SEQ ID №:6, и позициям 5-23 SEQ ID №:4. ПЦП-праймеры SQ20267 (SEQ ID №:11) и SQ25826 (SEQ ID №:12) амплифицируют 80 нуклеотидный ампликон уникальной геномной/встроенной ДНК в правый сегмент сплайсинга объекта MON87751. Эта же пара праймеров с

зондом PB10263 (SEQ ID №:13), которые могут быть флуоресцентно меченые (например флуоресцентной меткой 6FAM), может быть использована в ПЦР анализе TaqMan® для определения наличия ДНК, полученной из объекта MON87751 в образце.

В дополнение к SQ20267 (SEQ ID №:11), SQ25826 (SEQ ID №:12) и PB10263 (SEQ ID №:13), это должно быть очевидным для специалистов в данной области техники, другие праймеры и/или зонды могут быть сконструированы так, чтобы или амплифицировать и/или гибридизировать последовательности в SEQ ID №:10, которые являются уникальными и пригодными для обнаружения ДНК, полученной из объекта MON87751 в образце.

Следуя стандартной практике лаборатории молекулярной биологии, анализы ПЦР для идентификации объекта были разработаны для обнаружения ДНК объекта MON87751 в образце. Параметры стандартной ПЦР или TaqMan® ПЦР были оптимизированы с каждым набором пар праймеров и зондов (т.е. зондов, меченных флуоресцентной меткой, такой как 6FAM™), которые используются для обнаружения ДНК, полученной из объекта MON87751 в образце SQ20267 (сл код: 11), SQ25826 (SEQ ID №:12) и PB10263 (SEQ ID №:13). Контроль для ПЦР праймеров включает праймеры внутреннего контроля и зонды внутреннего контроля зонда (например, VIC™-меченый), специфичные для одной копии гена в геноме сои. Специалист в данной области будет знать, как конструировать праймеры, специфичные к одной копии гена в геноме сои. Как правило, параметры которых были оптимизированы для обнаружения ДНК объекта MON87751 в образце включают концентрацию праймера и зонда, объем матрицы ДНК и параметры циклов амплификации ПЦР. Матрица ДНК образцов и контроля следующая: [1] ДНК экстрагированная из образца листьев или одиночного образца семян для анализа; [2] отрицательная контрольная ДНК (нетрансгенная ДНК сои); [3] отрицательный водный контроль (без шаблона); и [4] положительная контрольная ДНК MON87751. Другие способы, известные специалистам в данной области техники, которые производят ампликоны, которые идентифицируют ДНК объекта MON87751 в образце находятся в пределах данной области техники.

Анализ зиготности пригоден для определения, содержит ли растение объект, гомозиготных по событию ДНК; то есть составляющие экзогенной ДНК в том же месте на каждой хромосомы в хромосомной паре; или гетерозиготных по объекту ДНК, то есть составляющие экзогенной ДНК только одной хромосомы в хромосомной паре; или является нулем для объекта ДНК, то есть диким типом. Способ термальной амплификации TAQMAN® был использован при разработке анализа зиготности для объекта MON87751. Для этого анализа, три праймера и два зонда были смешаны вместе с образцом для анализа. Три праймера были SQ20267 (SEQ ID №:11), который гибридизуется и удлиняется специфично к 3' области встроенной экзогенной ДНК; праймер SQ27115 (SEQ ID №:14), который гибридизуется и удлиняется, специфично, на геномной ДНК сои, фланкирующей с 3' стороны встроенную экзогенную ДНК; и праймер SQ26901 (SEQ ID №:15), который гибридизуется и удлиняется, специфично на геномной ДНК сои, фланкирующей 5' сторону встроенной экзогенной ДНК. SQ20267 и SQ27115 праймеры и зонд PB10263 (SEQ ID №:13) (6-РАМ™-меченый) являются диагностическим, при наличии копии встроенной экзогенной ДНК присутствующей в шаблоне ДНК, т.е. объекта MON87751. SQ26901 и SQ27115 праймеры и зонд PB11254 (SEQ ID №:16) VIC™-меченых) являются диагностическим, при отсутствии копии встроенной экзогенной ДНК присутствующей в геномной ДНК, т.е. дикого типа. Когда три праймера и два зонда смешиваются вместе в ПНР с ДНК, выделенной из растений, гомозиготных по объекту MON87751, имеется флуоресцентный сигнал только от 6-РАМ™-меченного зонда PB 10263 что свидетельствует об обнаружении у растений, гомозиготности по объекту MON87751. Когда три праймера и два зонда смешиваются вместе в ПЦР с ДНК, выделенной из растений, гетерозиготных по объекту MON87751, имеется флуоресцентный сигнал и от 6-РАМ™-меченного зонда PB 10263 и от VIC™-меченного зонда, что свидетельствует об обнаружении у растений, гомозиготности по объекту MON87751. Когда три праймера и два зонда смешиваются вместе в ПЦР с ДНК, выделенной из растений, с отсутствием объекта MON87751 (т.е. дикий тип), имеется флуоресцентный сигнал только от VIC™-меченного зонда PB 11254, что свидетельствует об отсутствии у растений, объекта MON87751, т.е. дикий тип Матрица ДНК образцов и контроля следующая: [1] ДНК экстрагировали из листьев или семян образец один образец для анализа; [2] отрицательный контроль ДНК (нетрансгенной ДНК сои); [3] отрицательный водный контроль (без шаблона); [4] положительный контроль MON87751 геномной ДНК из известных гетерозиготных образцов; и [5] положительный контроль MON87751 геномной ДНК из известных гомозиготного образца.

#### Пример 7.

В следующем примере описывается, как можно определить объект MON87751 в потомстве при любом скрещивании с использованием объекта сои MON87751.

Пара праймеров ДНК объекта используются для производства диагностики ампликоном ПЦР для объекта сои MON87751. Диагностический ампликон для MON87751 содержит по меньшей мере одну связующую последовательность, представленную как SEQ ID №:1, или SEQ ID №:2, или SEQ ID №:3, или SEQ ID №:4, или SEQ ID №:5, или SEQ ID №:6. Пара праймеров, которые будут создавать диагностический ампликон для MON87751, включают пару праймеров на основе фланкирующей последова-

тельности и встроенной экспрессионной кассеты (как (SEQ ID №:9). Для создания диагностического ампликона, в котором обнаруживаются SEQ ID №:1 или SEQ ID №:3 или SEQ ID №:5, необходимо создать молекулу прямого праймера на основании SEQ ID №:7 от 1 до 1334 основания и обратную молекулу праймера на основе последовательности ДНК встроенной экспрессионной кассеты (SEQ ID №:9 позиции 1-10119), в котором молекулы праймеров имеют достаточную длину последовательных нуклеотидов для специфической гибридизации с SEQ ID №:7 и SEQ ID №:9. Для создания диагностического ампликона, в котором обнаруживаются SEQ ID №:2 или SEQ ID №:4 или SEQ ID №:6, необходимо создать молекулу прямого праймера на основе последовательности ДНК встроенной экспрессионной кассеты (SEQ ID №:9 позиции 1-10119) и обратную молекулу праймера на основе 3' фланкирующей последовательности (SEQ ID №:8 позиции 266-1452), в которой молекулы праймеров имеют достаточную длину последовательных нуклеотидов для специфической гибридизации с SEQ ID №:8 и SEQ ID №:9.

Пример амплификации условия для этого анализа иллюстрируется в примере 4. Впрочем любая модификация этих способов или использование ДНК-праймеров, гомологичных или комплементарных SEQ ID №:7 и SEQ ID №:8 или последовательностей ДНК в генетических элементах, содержащуюся в трансгенной вставке SEQ ID №:9) MON87751, которые производят диагностического ампликон для MON87751 располагается в пределах области изобретения. Диагностический ампликон содержит молекулу ДНК, гомологичную или комплементарную по меньшей мере, одной трансгенной/геномной связывающей ДНК (как SEQ ID №:1 и SEQ ID №:2 и SEQ ID №:3 и SEQ ID №:4 и SEQ ID №:5 и SEQ ID №:6), или значительной его части. Кроме того, диагностического ампликон содержит молекулу ДНК, гомологичную или комплементарную к по меньшей мере одной уникальной последовательности трансгена (SEQ ID №:17 и SEQ ID №:18 SEQ ID №:19 и SEQ ID №:20 SEQ ID №:21 и sSEQ ID №:22 и SEQ ID №:23).

Анализ образца ткани MON87751 должен включать положительный контроль из ткани объекта MON87751, отрицательный контроль от растения сои, не содержащего объект MON87751 (например, но не ограничиваясь A3555), и отрицательный контроль, не содержащий геномной ДНК сои. Пара праймеров, которые амплифицируют эндогенные молекулы ДНК сои будет служить в качестве внутреннего контроля условий амплификации ДНК. Дополнительные последовательности праймеров могут быть выбраны из SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, и SEQ ID №:9 с помощью специалиста в данной области техники амплификации ДНК способы, и условия выбранного для создания ампликона с помощью способов, показанных в примере 4 могут отличаться, но приведут к диагностическим ампликонам для ДНК объекта MON87751. Использование этих последовательности ДНК-праймера с модификациями способов примера 4, входят в объем изобретения. Ампликон, полученный с по меньшей мере одной последовательностью ДНК праймеров, полученных из SEQ ID №:7, SEQ ID №:8, и SEQ ID №:9, что является диагностическим для MON87751 является одним из аспектов изобретения. ДНК наборы обнаружения содержат по меньшей мере один праймер ДНК достаточной длины смежных нуклеотидов, полученных из SEQ ID №:7, SEQ ID №:8 и SEQ ID №:9, что при использовании в методе амплификации ДНК производит диагностического ампликона для MON87751 или его потомства является одним из аспектов изобретения. В MON87751 сои растения, части растений, растительная клетка, семя, или товарный продукт, который будет производить диагностического ампликона для MON87751 в опытах амплификации ДНК является одним из аспектов изобретения. Анализ для MON87751 ампликонов может быть выполнена с помощью прикладных Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (запущенного с максимальной скоростью) или MJ Research DNA Engine PTC-225 термоциклер или любая другая системы амплификации, которая может использоваться для производства ампликона диагностики MON87751, как показано в примере 4.

Пример 8.

Для производства растения сои или его части, которые содержат улучшенные агрономические, инсектицидные, или гербицидных свойства растений сои, содержащих объект MON87751 скрещиваются с растением сои, содержащих потенциально любой другой соевый объект или их комбинации фенотипов и оцениваются для определения обусловленных ими свойств в потомстве растений. Свойства, предоставленные потомства растений в результате такой селекции могут выходить за рамки сопротивления чешуекрылых объекта MON87751, включая, но не без ограничения устойчивость к наземным вредителям, к гербицидам, нематодным свойства, засухоустойчивость, сопротивление вирусам, антигрибковый контроль, сопротивление бактериям, мужское бесплодие, холодостойкость, солеустойчивость, повышенную урожайность, повышенный выход масла, повышенное содержание масла, повышенная питательная эффективность или измененное содержание аминокислот. Примеры трансгенных объектов с улучшенными хозяйственно-ценными признаками являются хорошо известными в данной области техники. Ниже приведен не исчерпывающий перечень возможных трансгенных линий сои, которые могут быть использованы в селекции с объекта MON87751 для наделения улучшенными свойствами растений сои, частей растений, семян или товарной продукции. В селекции может включать в себя любые и все комбинации следующие: устойчивостью к гербицидам: TS 40-3-2, MON87708, MON89788, A2704-12, A2704-21, A5547-35, A5547-127, BPS-CV127-9, DP356043, GU262, W62, W98, DAS-44406-6, DAS-68416-4, FG72, BPS-CV127-9, SYHT04R, SYHT0H2, 3560.4.3.5, EE-GM3, pDAB4472-1606, pDAB4468-0416, pDAB8291.45.36, 127, AAD-12; устойчивостью к насекомым-вредителям: MON87701, DAS-81419-2; улучшение масличных

свойств: DP-305423, G94-1, G94-19, G168, OT96-15, MON87705, MON87769; увеличение урожайности: MON 87712.

Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в настоящей спецификации, и которая является существенной для изобретения, включены здесь путем ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально указаны для включения путем ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула ДНК, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и последовательностей, комплементарных указанной, которая является маркерной для трансгенных растений сои, устойчивых к поражению насекомыми отряда чешуекрылых, причем репрезентативный образец семян указанных трансгенных растений депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166.

2. ДНК-зонд, включающий последовательность достаточной длины из последовательно расположенных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 или последовательности, комплементарной указанной, для обнаружения присутствия трансгенной ДНК-конструкции в геноме растения сои, где репрезентативный образец семян, содержащих указанную конструкцию, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166 и где указанная конструкция придает растениям сои устойчивость к поражению насекомыми отряда чешуекрылых, причем указанный зонд специфично гибридизуется в жестких условиях с рекомбинантной молекулой ДНК, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и последовательностей, комплементарных указанной.

3. Пара молекул ДНК, содержащая первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, отличающаяся от первой молекулы ДНК, которые являются ДНК-праймерами для реакции амплификации трансгенной ДНК-конструкции, которая придает растениям сои устойчивость к насекомым отряда чешуекрылых, где репрезентативный образец семян, содержащих указанную трансгенную конструкцию, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166, причем указанная реакция амплификации приводит к образованию ампликона, являющегося диагностическим маркером присутствия указанной трансгенной ДНК-конструкции в геноме растения сои, где указанный ампликон содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26.

4. Способ выявления присутствия молекулы ДНК по п.1 в геноме трансгенного растения сои, где репрезентативный образец семян, содержащих указанную молекулу ДНК, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166, причем указанный способ включает:

- а) контактирование ДНК из генома сои с ДНК-зондом по п.2 в жестких условиях гибридизации и
- б) выявление гибридизации указанного ДНК-зонда с указанной ДНК из генома сои, причем наличие гибридизации является маркером присутствия указанной молекулы ДНК в геноме трансгенного растения сои.

5. Способ выявления присутствия молекулы ДНК по п.1 в геноме трансгенного растения сои, где репрезентативный образец семян, содержащий указанную молекулу ДНК, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166, причем указанный способ включает:

- а) контактирование ДНК из генома растения сои с парой молекул ДНК по п.3;
- б) проведение реакции амплификации, достаточной для получения ДНК-ампликона; и
- в) выявление указанного ДНК-ампликона, полученного в результате указанной реакции, где указанный ДНК-ампликон содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, причем обнаружение указанного ДНК-ампликона является маркером присутствия указанной молекулы ДНК в геноме трансгенного растения сои.

6. Растение сои или его часть, которые являются инсектицидными в отношении насекомых отряда чешуекрылых, содержащие рекомбинантную полинуклеотидную молекулу, включающую нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:10, которая является маркером для трансгенных растений сои, устойчивых к поражению насекомыми отряда чешуекрылых, причем репрезентативный образец семян указанных трансгенных растений депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166.

7. Растение сои или его часть по п.6, отличающиеся тем, что указанное насекомое отряда чешуе-

крылых выбрано из *Chrysodeixis* spp., *Spodoptera* spp., *Helicoverpa* spp., *Crociosema* spp., *Rachiplusia* spp., *Anticarsia* spp., *Elasmopalpus* spp. и *Plathypena* spp.

8. Потомство растения сои по п.6 или 7.

9. Способ защиты растений сои от поражения насекомыми отряда чешуекрылых, включающий выращивание растения сои по пп.6, 7.

10. Способ получения растения сои, устойчивого к насекомым, включающий:

а) половое скрещивание двух различных растений сои, причем по меньшей мере одно из двух растений содержит рекомбинантную молекулу ДНК по п.1;

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

в) выявление присутствия последовательности ДНК, являющейся маркером присутствия указанной молекулы ДНК в образце из этапа б) для определения потомства, содержащего указанную молекулу ДНК; и

д) отбор указанного потомства, содержащего указанную молекулу ДНК, причем указанное потомство представляет собой устойчивое к насекомым отряда чешуекрылых растение сои.

11. Семя сои, которое является инсектицидным в отношении насекомых отряда чешуекрылых, содержащее выявляемое количество нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:10, или последовательности, полностью комплементарной указанным.

12. Способ определения зиготности растения сои или семени сои, содержащего рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, которая является маркером для трансгенного растения сои, устойчивого к поражению насекомыми-вредителями отряда чешуекрылых, где репрезентативный образец семян указанных растений депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166, включающий:

а) контактирование образца, содержащего ДНК из генома растения сои с набором праймеров, способных создать первый ампликон, являющийся маркером присутствия указанной рекомбинантной молекулы ДНК, и второй ампликон, являющийся маркером присутствия нативной ДНК генома растения сои, не содержащей указанную рекомбинантную молекулу ДНК;

б) проведение реакции амплификации с указанным образцом и указанным набором праймеров и

в) выявление указанного первого ампликона, полученного в результате указанной реакции, или указанного второго ампликона, где присутствие в образце только первого ампликона означает, что растение сои является гомозиготным по указанной рекомбинантной молекуле ДНК, и где совместное присутствие в образце первого ампликона и второго ампликона означает, что растение сои является гетерозиготным по указанной рекомбинантной молекуле ДНК.

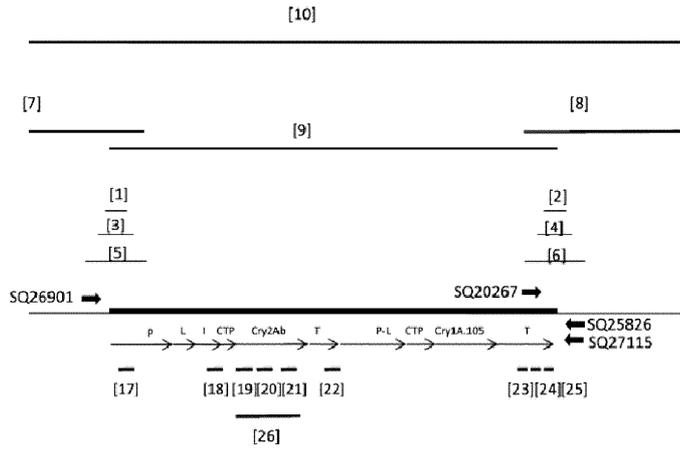
13. Способ по п.2, отличающийся тем, что набор праймеров содержит SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:15.

14. Способ определения зиготности растения сои или семени сои, содержащего рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, которая является маркером для трансгенных растений сои, устойчивых к поражению насекомыми отряда чешуекрылых, где репрезентативный образец семян указанных трансгенных растений депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166, включающий:

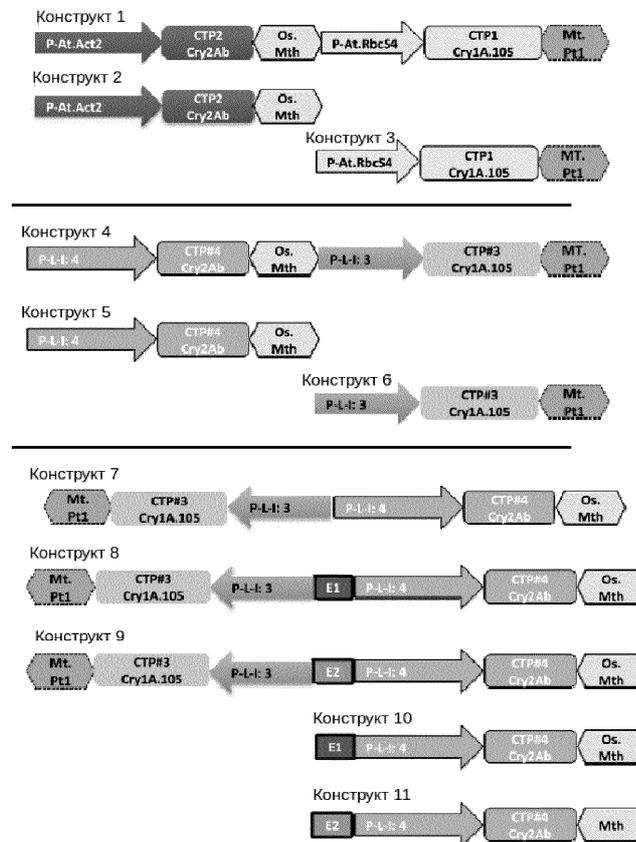
а) контактирование образца, содержащего ДНК из генома растения сои с набором зондов, содержащим по меньшей мере первый зонд, который специфически гибридизуется с указанной молекулой ДНК, и по меньшей мере второй зонд, который специфически гибридизуется с ДНК генома растения сои, которая была нарушена путем встраивания указанной молекулы ДНК, где репрезентативный образец семян, содержащий указанную молекулу ДНК, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120166 и не гибридизуется с указанной молекулой ДНК; и

б) гибридизацию набора зондов с указанным образцом в жестких условиях, где выявление в образце гибридизации только указанного первого зонда означает, что растение сои является гомозиготным по указанной молекуле ДНК и где выявление совместной гибридизации указанного первого зонда и указанного второго зонда означает, что растение сои является гетерозиготным по указанной молекуле ДНК.

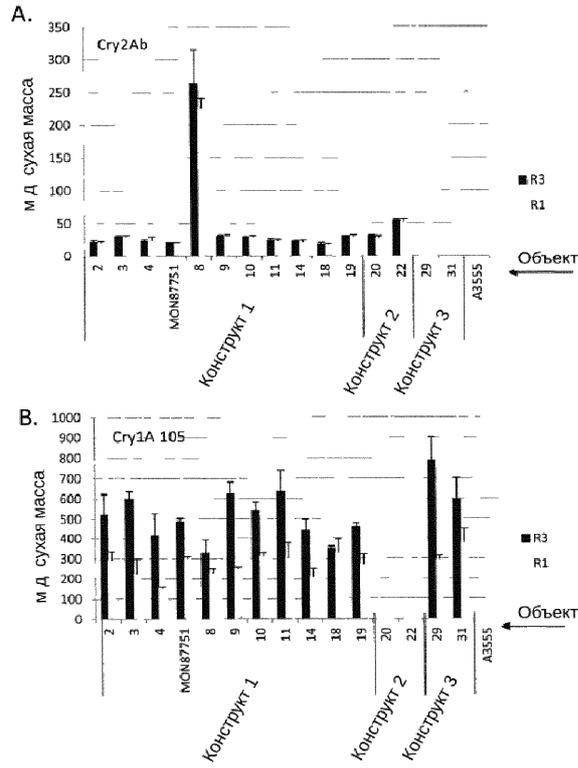
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что набор зондов содержит SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:16.



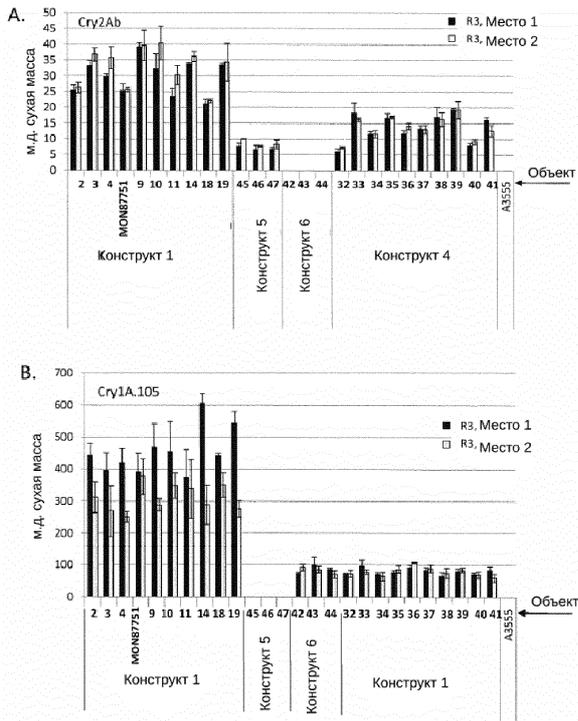
Фиг. 1



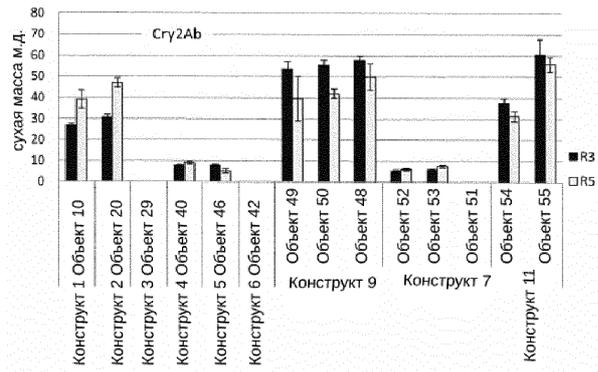
Фиг. 2



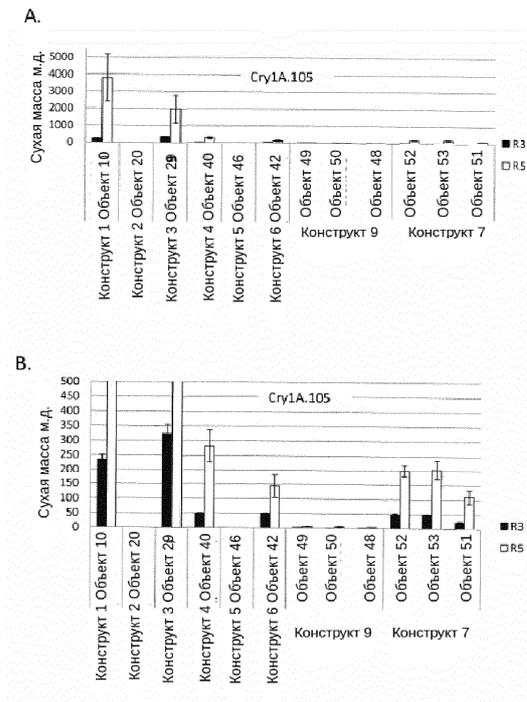
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

