

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040754**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.25

(21) Номер заявки
201691886

(22) Дата подачи заявки
2015.03.10

(51) Int. Cl. *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

(54) **ТРАНСГЕННОЕ СОБЫТИЕ КУКУРУЗЫ MON 87419 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/968,342**

(32) **2014.03.20**

(33) **US**

(43) **2017.01.30**

(86) **PCT/US2015/019663**

(87) **WO 2015/142571 2015.09.24**

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

(56) **US-A1-20120222153**

GenBank FP015960.2 *Sus scrofa* chromosome
8 clone CH242-4F3, WORKING DRAFT
SEQUENCE, 4 unordered pieces [online] 17 May
2009 [retrieved 26 May 2013], available on
the internet: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FP015960>>

WO-A2-2009091518

US-A1-20090029861

(72) Изобретатель:
**Бернс Уэн К., Гоули Майкл И., Хуан
Цзиньтай, Маккэнн Мелинда С.,
Шао Аихуа, Спаркс Оскар С., Стекер
Мартин А., Вэй Липин (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантным молекулам ДНК, которые являются уникальными для трансформанта кукурузы MON 87419, и трансгенным растениям кукурузы, частям растения, семенам, клеткам кукурузы и сельскохозяйственным продуктам, содержащим трансформант кукурузы MON 87419, а также способам использования и детекции трансформанта кукурузы MON 87419. Трансгенные растения кукурузы, содержащие трансформант MON 87419, проявляют устойчивость к гербицидам дикамба и глюфосинат.

B1**040754****040754****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/968342, поданной 20 марта 2014 г.

Включение перечня последовательностей

Перечень последовательностей содержится в файле под названием "MONS362WO.txt", размером 29,4 кб (измерено в MS-Windows), созданном 9 марта 2015 г., подается в данном документе в электронной форме и включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным молекулам ДНК, уникальным для трансгенного события кукурузы MON 87419. Настоящее изобретение также относится к трансгенным растениям, частям, семенам, клеткам кукурузы и сельскохозяйственным продуктам, содержащим событие кукурузы MON 87419, а также к способам их применения. Трансгенные растения кукурузы, содержащие событие кукурузы MON 87419, проявляют устойчивость к гербицидам дикамба и глюфосинату.

Уровень техники

Кукуруза (*Zea mays*) является важнейшей сельскохозяйственной культурой во многих регионах мира. Для этой культуры применялись способы биотехнологии с целью получения кукурузы с желательными признаками. Одним из таких желательных признаков является устойчивость к гербицидам. Экспрессия гетерологичного гена, также известного как трансген, для устойчивости к гербициду в растении может придать устойчивости к гербицидам по всему растению. Однако на экспрессию трансгена и, следовательно, на его эффективность может влиять множество различных факторов, включая такие, как ориентация и состав кассеты, которая отвечает за экспрессию отдельного трансгена, помещенного в хромосому растения, и хромосомная локализация, а также геномный результат трансгенной инсерции. Это дополнительно осложняется в трансгенных растениях со множеством молекулярносвязанных трансгенов, которые определяют отдельные признаки. В такой ситуации, корректная экспрессия каждого из молекулярносвязанных трансгенов в растении должна быть результатом такой же трансгенной инсерции (также называемой мультигенным событием). В таких случаях необходимо разработать и протестировать множество кассет экспрессии, каждая из которых имеет другую конфигурацию трансгенов и элементов экспрессии, а затем произвести и проанализировать большое количество отдельных событий трансформации растений посредством множества поколений растений, для того чтобы отобрать трансгенные события с превосходными свойствами по отношению к каждому из желательных признаков и оптимальными фенотипическими и сельскохозяйственными характеристиками, необходимыми для того, чтобы сделать его пригодным для коммерческих целей. Такой отбор требует обширных молекулярных исследований, а также многолетних тепличных и полевых испытаний в различных местах и при различных условиях, чтобы таким образом можно было собрать значительное количество агрономических, фенотипических и молекулярных данных. Полученные в результате данные и наблюдения должны быть затем проанализированы группами ученых и агрономов с целью отбора события, пригодного для коммерческого использования в сельском хозяйстве в широком диапазоне генетических признаков и в различных полевых условиях. Будучи отобранным, коммерческое событие, определяющее желаемые признаки, может быть интрогрессировано в другие фоновые генотипы с использованием методов разведения растений, тем самым производя ряд различных сортов сельскохозяйственных культур, которые содержат желаемый признак и соответствующим образом адаптированы к конкретным местным условиям произрастания. Для того чтобы создать трансгенное растение, содержащее один объект трансформации, часть конструкции рекомбинантной ДНК переносят в геном клетки кукурузы с использованием методов трансформации растений. Эта клетка кукурузы впоследствии используется для получения уникального растения R₀, которое затем может быть использовано для получения потомства трансгенных растений. Геном растений-потомков содержит уникальное событие, и эти растения могут быть протестированы на желаемый признак(и), а также на агрономическую производительность. На эффективность события могут оказывать влияние *cis* и/или *trans* факторы относительно сайта интеграции в объекте трансформации. На фенотип, определяемый событием, также может оказывать влияние размер и структура ДНК-конструкции, которая может варьировать в зависимости от комбинации генетических элементов в кассете экспрессии, количества трансгенов, количества кассет экспрессии, а также конфигурации таких элементов и таких кассет. Продуктивность данного события может дополнительно осложняться такими факторами, как связанные с развитием растения, суточные, сезонные и пространственные паттерны экспрессии трансгенов; или внешними факторами, например условиями окружающей среды для роста растений, наличием воды, наличием азота, теплом или стрессом. Таким образом, возможность создать событие, определяющее желаемый набор фенотипических признаков, не является легко предсказуемой.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантной молекуле ДНК, содержащей последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной ДНК, полученной от трансгенного растения кукурузы или семени, содержащих событие кукурузы MON 87419. Характерный образец семени, содержащий событие кукурузы MON 87419, был депонирован в ATCC под номером доступа PTA-120860. Настоящее изобретение также относится к ре-

комбинантной молекуле ДНК, которая является ампликоном с целью диагностики наличия ДНК, полученной от события кукурузы MON 87419. Настоящее изобретение также относится к молекуле ДНК, которая находится в растении кукурузы, клетке, семени, растении-потомке или части растения, полученных от трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419.

Настоящее изобретение относится к молекуле ДНК с достаточной длиной непрерывной последовательности ДНК SEQ ID NO: 10, чтобы функционировать в качестве зонда ДНК, который гибридизуется при жестких условиях гибридизации с молекулой ДНК, содержащей ДНК-последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10, и не гибридизуется в жестких условиях гибридизации с молекулой ДНК, не содержащей ДНК-последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. Изобретение также относится к паре молекул ДНК, содержащей первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, при том что первая молекула ДНК представляет собой фрагмент последовательности SEQ ID NO: 9, а вторая молекула ДНК представляет собой фрагмент геномной ДНК кукурузы события кукурузы MON 87419, при этом и первая, и вторая молекулы ДНК содержат последовательность ДНК из смежных нуклеотидов достаточной длины, чтобы функционировать в качестве праймеров ДНК при их совместном использовании в реакции амплификации с ДНК, содержащей событие кукурузы MON 87419, для получения ампликона с целью диагностики события кукурузы MON 87419 в образце.

Изобретение относится к способу детекции наличия события кукурузы MON 87419 в образце ДНК путем приведения в контакт образца с ДНК-зондом, подвергая образец и зонд ДНК жестким условиям гибридизации и детекции гибридизации ДНК зонда к молекуле ДНК в образце, где гибридизация ДНК зонда с молекулой ДНК указывает на наличие события кукурузы MON 87419 в образце ДНК.

Изобретение относится к способу детекции наличия события кукурузы MON 87419 в образце ДНК путем приведения в контакт образца с парой ДНК праймеров, выполняя реакцию амплификации, достаточную для получения ДНК ампликона, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-8 и SEQ ID NO: 10, и детекции наличия ампликона ДНК в реакции, при том что присутствие ампликона ДНК в реакции указывает на наличие события кукурузы MON 87419 в образце ДНК.

Изобретение также относится к набору для детекции ДНК, содержащему по меньшей мере одну молекулу ДНК, содержащую последовательность ДНК из смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 длиной, достаточной для того, чтобы функционировать в качестве специфического праймера или зонда для детекции наличия события кукурузы MON 87419 в образце ДНК.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному растению кукурузы, семени, клетке, части растения или товарному продукту, содержащему молекулу ДНК с последовательностью ДНК, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. Настоящее изобретение также относится к трансгенному растению кукурузы, семени или клетке, устойчивым к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба. Настоящее изобретение также относится к трансгенному растению кукурузы, семени, клетке, части растения или товарному продукту, содержащим событие кукурузы MON 87419. Настоящее изобретение также относится к растению кукурузы или семени, которые представляют собой гибрид, имеющий по меньшей мере одно родительское растение, которое содержит событие кукурузы MON 87419.

Настоящее изобретение относится к способу борьбы с сорняками на участке, включающему посадку трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419, на участке и применение эффективной дозы гербицидов дикамба или глюфосинат либо дикамба и глюфосинат для борьбы с сорняками на участке без повреждения трансгенной кукурузы. Изобретение также относится к способу борьбы с сорняками путем применения эффективной дозы гербицида глюфосинат от около 0,1 фунтов (0,045 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 16 фунтов (7,248 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида глюфосинат в течение периода вегетации. Изобретение также относится к способу борьбы с сорняками путем применения эффективной дозы гербицида глюфосинат от около 0,4 фунтов (0,181 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 1,59 фунтов (0,720 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида глюфосинат в течение периода вегетации. Изобретение также относится к способу борьбы с сорняками путем применения эффективной дозы гербицида дикамба от около 0,1 фунтов (0,045 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 16 фунтов (7,248 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида дикамба в течение периода вегетации. Изобретение также относится к способу борьбы с сорняками путем применения эффективной дозы гербицида дикамба от около 0,5 фунтов (0,227 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 2 фунтов (0,906 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида дикамба в течение периода вегетации.

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного растения кукурузы, устойчивого к гербицидам глюфосинат и дикамба, путем полового скрещивания трансгенного растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419, со вторым растением кукурузы, сбора полученных семян, выращивания семян для получения потомства растений, обработки растений потомства гербицидами глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба, а также отбора растения-потомка, устойчивого к гербицидам глюфосинат и дикамба. Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного растения кукурузы, устойчивого к гербицидам глюфосинат и дикамба, путем са-

моопыления трансгенного растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419, сбора полученных семян, выращивания семян для получения потомства растений, обработки растений потомства гербицидами глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба, а также отбора растения-потомка, устойчивого к гербицидам глюфосинат и дикамба.

Краткое описание графических материалов

Чертеж иллюстрирует организацию трансгенной вставки в геном растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419. Горизонтальные линии соответствуют относительным положениям 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; толстые стрелки, помеченные SQ26644 и SQ26645, обозначают приблизительное положение пары праймеров, используемых для идентификации трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419; толстые, короткие линии под номером от 14 до 22 представляют собой относительное положение уникальных последовательностей рекомбинантных конструктров внутри вставки ДНК (SEQ ID NO: 9) и число относится к соответствующему SEQ ID NO каждой соответственно; тонкие горизонтальные стрелки представляют относительную организацию двух отдельных касет экспрессии встроенной ДНК гетерологичного трансгена, события кукурузы MON 87419, и блоки указывают на отдельные элементы двух касет экспрессии; заглавная 'P' обозначает промоторный элемент, заглавная 'L' обозначает лидерный элемент, заглавная 'I' обозначает интрон, заглавные 'TS' обозначают транзитный пептид хлоропласта, заглавная 'T' обозначает 3'-элемент терминирования транскрипции и полиаденилирования (3' UTR), pat обозначает кодирующий участок белка фосфинотрицинацетилтрансферазы (PAT) и dmo обозначает кодирующий участок белка дикамба монооксигеназы (DMO).

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность ДНК длиной в тридцать нуклеотидов, отображающую 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 1 соответствует позициям нуклеотидов от 1232 до 1261 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность ДНК длиной в тридцать нуклеотидов, отображающую 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 2 соответствует позициям нуклеотидов от 7994 до 8023 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность ДНК длиной в шестьдесят нуклеотидов, отображающую 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 3 соответствует позициям нуклеотидов от 1217 до 1276 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность ДНК длиной в шестьдесят нуклеотидов, отображающую 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 4 соответствует позициям нуклеотидов от 7979 до 8038 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность ДНК длиной в сто нуклеотидов, отображающую 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 5 соответствует позициям нуклеотидов от 1197 до 1296 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность ДНК длиной в сто нуклеотидов, отображающую 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO: 6 соответствует позициям нуклеотидов от 7959 до 8058 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность ДНК длиной в 1771 нуклеотидов, отображающую 1246 нуклеотидов 5'-фланкирующей геномной ДНК кукурузы и 525 нуклеотидов 5'-конца трансгенной вставки.

SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность ДНК длиной в 1767 нуклеотидов, отображающую 516 нуклеотидов 3'-конца трансгенной вставки и 1251 нуклеотидов 3'-фланкирующей геномной ДНК кукурузы.

SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность ДНК длиной в 6762 нуклеотида, соответствующую трансгенной вставке события кукурузы MON 87419.

SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность ДНК длиной в 9259 нуклеотидов, отображающую события кукурузы MON 87419; последовательность содержит 5'-фланкирующую последовательность геномной ДНК позиций от 1 до 1246, ДНК трансгенной вставки позиций от 1247 до 8008 и 3'-фланкирующую последовательность геномной ДНК позиций от 8009 до 9259.

SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность ДНК длиной в 33 нуклеотида, соответствующую праймеру, обозначенному как SQ26644, который используется для идентификации ДНК события кукурузы MON 87419 в образце; она соответствует позициям от 7966 до 7998 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность ДНК длиной в 24 нуклеотида, соответствующую праймеру, обозначенному как SQ26645, который используется для идентификации ДНК события кукурузы MON 87419 в образце; она соответствует позициям от 8022 до 8045 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность ДНК длиной в 19 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PB11207, который используется для идентификации ДНК события кукурузы MON 87419 в образце; она соответствует позициям от 8002 до 8020 из SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 14-22 представляют собой последовательности ДНК, соответствующие уникальным

последовательностям в пределах трансгенной вставки события кукурузы MON 87419.

Подробное описание изобретения

Следующие определения и способы предложены для того, чтобы лучше определить настоящее изобретение и направить среднего специалиста в данной области техники в практическом подходе по настоящему изобретению. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии с обычным использованием средними специалистами в данной области техники.

Современные методы трансформации растений используются для создания генетически модифицированных растений. Термин "трансгенный" также может быть использован для обозначения генетически сконструированных растений. В процессе создания трансгенного растения чужеродную ДНК случайным образом встраивают в геном растительной клетки. Во время трансформации трансформируются многие отдельные клетки. Вследствие случайной интеграции, отдельное и уникальное событие рекомбинации ДНК будет происходить в пределах генома каждой отдельной трансформированной клетки растения. Целое трансгенное растение затем выращивают из одной отдельной трансгенной клетки, что обязательно приводит в результате к тому, что в каждой клетке трансгенного растения содержится уникально встроенная ДНК в качестве стабильной части ее генома. Устойчивая к гербицидам трансгенная кукуруза, содержащая событие кукурузы MON 87419, вмещает одну вставку трансгенной ДНК в хромосоме/геноме зародышевой плазмы кукурузы. Событие кукурузы MON 87419 был получен путем

(I) трансформации тысяч клеток растения кукурузы конструкцией нуклеиновой кислоты, которая включает представляющие интерес трансгены;

(II) регенерации популяции растений кукурузы, каждое из которых содержит уникальное трансгенное событие; и

(III) многолетнего тестирования, скрининга и отбора, чтобы отобрать событие с необходимыми агротехническими свойствами, событие кукурузы MON 87419.

Событие кукурузы MON 87419 характеризуется уникальной последовательностью ДНК вставки трансгена в определенном месте генома растения кукурузы.

Акт вставки трансгенной ДНК в геном растения кукурузы осуществляется путем акта трансформации растений и в результате приводит к созданию новой трансгенной геномной молекулярной последовательности, известной как "событие". Эта последовательность является уникальной и специфической для события и может быть легко идентифицирована при сравнении с оригинальной геномной последовательностью кукурузы или другими трансгенными объектами кукурузы. Молекулярный анализ события кукурузы MON 87419 определил геномный сайт вставки встроенной ДНК (SEQ ID NO: 9) и фланкирующую геномную последовательность ДНК кукурузы, непосредственно примыкающую к обеим сторонам от встроенной ДНК (SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8). Такое расположение встроенной ДНК по отношению к окружающей ДНК генома растения кукурузы является, таким образом, специфическим и уникальным для устойчивой к гербицидам трансгенной кукурузы, включающей событие кукурузы MON 87419. Эта новая геномная молекулярная последовательность (SEQ ID NO: 10) также является неотъемлемой частью хромосомы трансгенных устойчивых к гербицидам растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419, а также, таким образом, является статической в растении и может передаваться потомству растения. Настоящее изобретение также относится к потомству исходного трансформанта, содержащему событие кукурузы MON 87419. Такое потомство может быть получено путем самоопыления растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419, или полового скрещивания между растением кукурузы, содержащим событие кукурузы MON 87419, и еще одним растением, которое содержит или не содержит событие кукурузы MON 87419. Такое другое растение может быть трансгенным растением, содержащим то же самое или другое событие (события), или нетрансгенным растением, таким как растение другого сорта. Даже после многократного обратного скрещивания с рекуррентным родителем событие кукурузы MON 87419, полученное от трансформированного родителя, присутствует в потомстве, полученном от скрещивания, на том же месте генома.

Используемый в данном документе термин "кукуруза" означает *Zea mays* (также известный как кукуруза) и включает все виды растений, которые можно скрещивать с кукурузой.

Настоящее изобретение относится к устойчивому к гербициду трансгенному растению кукурузы, содержащему событие кукурузы MON 87419, устойчивому к гербицидам дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоте) и глюфосинат (2-амино-4-(гидроксиметилфосфинил)-бутановой кислоте). Дикамба представляет собой синтетический ауксиновый гербицид, применяемый для борьбы с широким спектром широколиственных сорняков. Глюфосинат представляет собой органофосфорный гербицид, применяемый для борьбы с широким спектром однолетних и многолетних трав и широколиственных сорняков. Событие кукурузы MON 87419 содержит ген деметилазы (dmo) из *Stenotrophomonas maltophilia*, который экспрессирует белок дикамба моно-оксигеназы (DMO) для придания устойчивости к гербициду дикамба и ген устойчивости к биалафосу (pat) из *Streptomyces viridochromogenes*, который экспрессирует белок фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы (PAT) для придания устойчивости к гербициду глюфосинат.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" относится к ненатуральным ДНК, белку или организму, которые обычно не встречаются в природе и были созданы путем человеческого

вмешательства. Используемая в данном документе "молекула рекомбинантной ДНК" представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не встречаются вместе в естественных условиях, и является результатом человеческого вмешательства, например ДНК-молекулу, которая содержит комбинацию по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных по отношению друг к другу, например молекулу ДНК, которая содержит трансген и геномную ДНК растения, примыкающую к трансгену. Пример молекулы рекомбинантной ДНК представляет собой молекулу ДНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10. Используемое в данном документе "рекомбинантное растение" представляет собой растение, которое обычно не существует в природе, является результатом человеческого вмешательства и содержит трансгенную молекулу ДНК. В результате такого изменения генома рекомбинантное растение представляет собой что-то новое и заметно отличается от соответствующего растения дикого типа. Примером рекомбинантного растения является растение кукурузы, содержащее событие кукурузы MON 87419.

Используемый в данном документе термин "трансген" относится к молекуле ДНК, искусственно встроенной в геном организма в результате человеческого вмешательства, например, с помощью методов трансформации растений. Трансген может быть гетерологичным по отношению к организму. Термин "трансгенная вставка", используемый в данном документе, относится к трансгену, встроенному с помощью методов трансформации растений в геном кукурузы для получения события кукурузы MON 87419. Последовательность для этой трансгенной вставки обеспечивается как последовательность SEQ ID NO: 9. Термин "трансгенный" относится к чему-то, что содержит трансген, например "трансгенное растение" относится к растению, содержащему трансген.

Используемый в данном документе термин "гетерологичный" относится к первой молекуле, которая в природе, как правило, не связана со второй молекулой или организмом. Например, молекула ДНК может быть получена от первых видов и встроена в геном вторых видов. Молекула ДНК, таким образом, будет гетерологичной по отношению к геному и организму.

Используемый в данном документе термин "химерный" относится к одной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, при этом ни первая, ни вторая молекулы ДНК, как правило, не были бы в норме найдены в такой слитой конфигурации по отношению к другой. Молекула химерной ДНК, таким образом, представляет собой новую молекулу ДНК, которая, как правило, не встречается в природе. Пример молекулы химерного ДНК представляет собой молекулу ДНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10.

Настоящее изобретение относится к молекулам ДНК и соответствующим им ДНК последовательностям. Используемые в данном документе термины "ДНК" и "молекула ДНК" относятся к молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Молекула ДНК может быть геномного или синтетического происхождения и, как принято, представляется от 5'- (левого) конца к 3'- (правому) концу. Используемый в данном документе термин "Последовательность ДНК" относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Используемая номенклатура является такой, как требуется в разделе 37 Кодекса федеральных нормативных актов Соединенных Штатов § 1.822, и приведена в таблицах в стандарте ВОИС ST.25 (1998), приложение 2, табл. 1 и 3. Как принято, последовательности ДНК по настоящему изобретению и их фрагменты описаны со ссылкой только по одной нити из двух комплементарных нитей ДНК последовательности. Косвенно и преднамеренно комплементарные последовательности предложенных в данном документе последовательностей (последовательности комплементарной цепи), также называемых в данной области техники обратными комплементарными последовательностями, находятся в пределах объема настоящего изобретения и явно подразумеваются в пределах заявленного предмета. Таким образом, используемые в данном документе ссылки на SEQ ID NO: 1-10 и SEQ ID NO: 14-22 и их фрагменты включают и относятся к последовательности комплементарной цепи и ее фрагментам.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" относится к небольшой части целого. Например, фрагменты SEQ ID NO: 10 будут включать последовательности, которые составляют по меньшей мере около 20 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 25 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 30 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 35 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 40 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 45 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 50 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 60 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 70 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 80 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 90 последовательных нуклеотидов или по меньшей мере около 100 последовательных нуклеотидов полной последовательности SEQ ID NO: 10.

Последовательность ДНК, соответствующая полной последовательности ДНК вставки трансгена и существенных сегментов ДНК генома кукурузы, фланкирующих любой конец трансгенной вставки, представлена как SEQ ID NO: 10. ДНК-последовательности геномной ДНК кукурузы физически связаны фосфодиэфирной связью и, таким образом, фланкирующий 5'-конец трансгенной вставки представлен как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7. Последовательность ДНК геномной ДНК кукурузы физически связана фосфодиэфирной связью и, таким образом, фланкирующий 3'-конец трансгенной вставки представлен как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8.

Трансгенная кукуруза, содержащая событие кукурузы MON 87419, содержит два участка, называемых соединениями. "Соединение" представляет собой место, в котором один конец трансгенной вставки соединен с геномной ДНК. Соединение охватывает или тянется на стыке трансгенной вставки и прилегающей к ней фланкирующей геномной ДНК и как таковое является точкой соединения этих двух в качестве одной смежной молекулы. Одно соединение на 5'-конце трансгенной вставки и одно на 3'-конце трансгенной вставки, упоминается в данном документе как 5'- и 3'-соединение соответственно. "Последовательность соединения" относится к последовательности ДНК любой длины, которая охватывает 5'- или 3'-соединение события. Последовательности соединения события кукурузы MON 87419 являются очевидными для специалиста в данной области техники, использующего SEQ ID NO: 10. Примеры последовательностей соединений события кукурузы MON 87419 представлены как SEQ ID NO: 1-8. Чертеж иллюстрирует физическое расположение SEQ ID NO: 1-10, расположенных от 5' до 3'. Таким образом, настоящее изобретение относится к молекуле ДНК, которая содержит по меньшей мере одну из последовательностей ДНК, приведенных в SEQ ID NO: 1-8.

Последовательности соединения события кукурузы MON 87419 могут присутствовать как часть генома трансгенного растения кукурузы, семени или клетки, содержащих событие кукурузы MON 87419. Идентификация любой одной или нескольких из SEQ ID NO: 1-8 в образце, взятом из растения трансгенной кукурузы, части растения, семени или клетки, указывает на то, что ДНК была получена от трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419, и является диагностическим параметром наличия события кукурузы MON 87419.

Событие кукурузы MON 87419 содержит последовательности, которые являются уникальными для трансгенной вставки, в частности, SEQ ID NO: 14-22. Эти последовательности являются уникальными для конкретной химерной конфигурации различных промоторов, интронов, хлоропласт-направленных пептидов (СТР), 3'-сигнала терминации, генов *pat* и *dmo* в пределах трансгенной вставки события. Чертеж иллюстрирует относительное положение каждой из этих уникальных последовательностей вставки трансгена в отношении последовательности SEQ ID NO: 9. Предложенными являются примеры молекул ДНК, которые могут быть использованы в качестве праймеров или зондов с целью диагностики наличия в образце ДНК, полученной от события кукурузы MON 87419. Такие праймеры или зонды являются специфическими для последовательности-мишени нуклеиновой кислоты и в качестве таковых могут быть использованы для идентификации события кукурузы MON 87419 с помощью методов, описанных в данном документе.

"Праймер" представляет собой молекулу ДНК, которая предназначена для использования при отжиге или гибридизационных методах, которые включают реакцию амплификации. Реакция амплификации представляет собой реакцию *in vitro*, которая амплифицирует матричную ДНК для получения ампликона. Используемый в данном документе "ампликон" представляет собой молекулу ДНК, которая была синтезирована с использованием методов амплификации. Ампликоны согласно настоящему изобретению имеют последовательность ДНК, содержащую одну или более из SEQ ID NO: 1-10 или их фрагменты. Пара праймеров может быть использована с матричной ДНК, такой как образец геномной ДНК кукурузы, в реакции амплификации, такой как полимеразная цепная реакция (ПЦР), чтобы получить ампликон, при этом полученный ампликон будет иметь последовательность ДНК, соответствующую последовательности матричной ДНК, расположенной между двумя участками где праймеры гибридизуются с матрицей. Праймер, как правило, предназначен для гибридизации с комплементарной целевой цепью ДНК с образованием гибрида между праймером и целевой цепью ДНК. Наличие праймера является точкой распознавания для полимеразы, чтобы начать удлинение праймера с использованием в качестве матрицы цепь ДНК-мишени. Пары праймеров относятся к использованию двух праймеров, связывающих противоположные цепи двухцепочечного нуклеотидного сегмента с целью амплификации нуклеотидного сегмента между ними. Примеры последовательностей праймеров представлены как SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12. Пара праймеров, представлена как SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, может быть использована в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, при том что первая молекула ДНК представляет собой фрагмент SEQ ID NO: 9, а вторая молекула ДНК представляет собой фрагмент последовательности геномной ДНК кукурузы SEQ ID NO: 10 и каждая имеет достаточную длину, чтобы функционировать в качестве праймеров ДНК при их совместном использовании в реакции амплификации с ДНК, содержащей событие кукурузы MON 87419, для получения ампликона в целях диагностики события кукурузы MON 87419 в образце. Последовательность геномной ДНК кукурузы события кукурузы MON 87419 представлена в качестве позиций 1-1246 и 8009-9259 из SEQ ID NO: 10.

"Зонд" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной к целевой цепи нуклеиновой кислоты и используется в гибридизационных методах детекции. Зонды по настоящему изобретению включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также и полиамиды и другие материалы зонда, которые специфически связываются с последовательностью ДНК мишени и детекция такого связывания может быть использована при детекции наличия или отсутствия ДНК последовательности мишени. Зонд может быть присоединен к обычной детектируемой метке или репортеру, такой как радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент. В качестве примера последовательность ДНК, используемая в качестве зонда для детекции собы-

тия кукурузы MON 87419, представлена как SEQ ID NO: 13.

Способы конструирования и использования праймеров и зондов хорошо известны в данной области техники, а ДНК-молекулы, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 1-10 и используемые в качестве праймеров и зондов для детекции события кукурузы MON 87419, могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники. Молекулы ДНК и соответствующие им ДНК последовательности, представленные в данном документе, таким образом, используются для идентификации события кукурузы MON 87419 в трансгенных растениях кукурузы, клетках, семенах или частях растения; отбора сортов кукурузы или гибридов, содержащих событие кукурузы MON 87419; и детекции наличия или отсутствия события кукурузы MON 87419 в образце. Используемый в данном документе термин "изолированный" относится к разделению молекулы от других молекул, обычно связанных с ней в своем природном или естественном состоянии. Термин "изолированный", таким образом, может относиться к молекуле ДНК, которая была отделена от другой молекулы(молекул) ДНК, которые обычно связаны с ней в своем природном или естественном состоянии. Такая молекула ДНК может присутствовать в рекомбинированном состоянии, таком как рекомбинантная молекула ДНК. Таким образом, молекулы ДНК, слитые с регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не связаны, например, как результат рекомбинантных технологий, считаются изолированными, даже при встраивании в качестве трансгена в хромосому клетки или присутствии с другими молекулами ДНК.

Настоящее изобретение относится к растениям кукурузы, потомству, семенам, клеткам растения и частям растения, содержащим событие кукурузы MON 87419, и товарным продуктам, полученным с их использованием. Характерный образец трансгенного семени кукурузы, устойчивой к гербицидам, содержащий MON 87419 событие, депонирован в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур (ATCC®). Репозиторий ATCC для семени трансгенного устойчивого к гербицидам растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419, присвоил обозначение патентного депозита РТА-120860. Растения, потомство, семена, растительные клетки, части растения и товарные продукты по настоящему изобретению содержат детектируемое количество ДНК, имеющее по меньшей мере одну из последовательностей, приведенных как SEQ ID NO: 1-10 и SEQ ID NO: 14-22. Растения, потомство, семена, растительные клетки и части растений по настоящему изобретению могут также содержать один или более дополнительных трансгенных признаков, в частности тех, которые вносятся путем скрещивания растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419, с другим растением, содержащим дополнительный трансгенный признак(и). Такие признаки включают, но не ограничиваются ими, повышенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность использования воды, повышенную производительность урожая, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян, улучшение питательных характеристик, продукцию гибридных семян и/или повышенную устойчивость к гербицидам, при этом признак измеряется по отношению к растению кукурузы, не имеющему такой трансгенный признак.

Растения по настоящему изобретению могут быть использованы для получения потомства, которое содержит событие кукурузы MON 87419. Используемый в данном документе термин "потомство" включает любое растение, семя и растительную клетку, содержащую событие кукурузы MON 87419, унаследованное от растения предка, обозначенное растением, содержащим молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10. Растения, потомство и семена могут быть гомозиготным или гетерозиготным по событию кукурузы MON 87419. Потомство растений можно выращивать из семян, производимых растением кукурузы, содержащим событие кукурузы MON 87419, или из семян, полученных с помощью растения кукурузы, оплодотворенной пыльцой, содержащей событие кукурузы MON 87419.

Используемый в данном документе термин "часть растения" по настоящему изобретению представляет собой любую часть, полученную от трансгенного растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419. Части растений включают, но не ограничиваются ими, пыльцу, семяпочки, стручок, цветок, корни, стебли, волокна и листья. Части растения могут быть жизнеспособными или нежизнеспособными. Изобретение относится к товарному продукту, который получен от трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Товарные продукты по настоящему изобретению содержат детектируемое количество ДНК, содержащее последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. Используемый в данном документе термин "товарный продукт" относится к любой композиции или продукту, который состоит из материала, полученного от трансгенного растения кукурузы, семени кукурузы, клетки растения кукурузы или части растения кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Товарные продукты включают, но не ограничиваются ими, обработанные семена, зерна, части растения и еду. Трансгенная кукуруза, содержащая событие кукурузы MON 87419, может быть использована для производства любого товарного продукта, как правило, полученного от кукурузы. Товарный продукт по настоящему изобретению будет содержать детектируемое количество ДНК, соответствующее событию кукурузы MON 87419. Детекция одной или более из этой ДНК в образце может быть использована для определения содержания или источника товарного продукта. Можно использовать любой стандартный способ детекции молекул ДНК, в том числе способы обнаружения, описанные в данном документе. Настоящее изобретение относится к способам борьбы с сорняками с использованием

гербицидов глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба с трансгенной кукурузой, содержащей событие кукурузы MON 87419. Предусмотрено, что способ борьбы с сорняками на участке, таком как поле, состоит из посадки трансгенных растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419, на участке и применения гербицидно эффективной дозы гербицидов глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба на участке с целью борьбы с сорняками на участке, не повредив трансгенных растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419. Такое применение гербицидов глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба может быть до всходов (в любое время после посадки семени трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419 и перед всходом трансгенного растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419) или после всходов (в любое время после произрастания трансгенных растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419). Гербицидно эффективная доза глюфосината для использования на участке для борьбы с сорняками должна состоять из диапазона от около 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного эквивалента на акр (к.э./акр) вплоть до около 16 фунтов (7,248 кг) к.э./акр глюфосината в течение периода вегетации. Гербицидно эффективная доза дикамбы для использования на участке для борьбы с сорняками должна состоять из диапазона от около 0,1 фунта (0,045 кг) к.э./акр вплоть до около 16 фунтов (7,248 кг) к.э./акр дикамбы в течение периода вегетации. Множество применений гербицидов глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба могут быть использованы в течение периода вегетации, например два применения (такие, как применение до посадки и применение после появления всходов или довсходовое применение и применение после появления всходов) или три применения (такие, как применение до посадки, применение перед всходами и применение после появления всходов).

Используемый в данном документе термин "активный ингредиент" или "а.и." является компонентом гербицидного состава, отвечающего за гербицидную активность, часто измеряется в фунтах на галлон или применяется в фунтах на акр (0,405 га). Для гербицидов, которые являются кислотами (например, молекулы, которые имеют карбоксильную группу, как часть их структуры), в которых кислотную группу часто превращают в (может быть заменено желаемыми ионами, чтобы сформировать) соль или (подвергают взаимодействию со спиртом, чтобы сформировать) сложный эфир в процессе составления. Это может изменить не только химические характеристики конкретной молекулы гербицида, но и массу. Тем не менее соответствующая кислота является гербицидно активной частью состава и эквивалентность гербицидной активности между различными активными ингредиентами можно рассчитать с использованием кислотного эквивалента в качестве стандартной единицы измерения. Термин "кислотный эквивалент" или "к.э." означает ту часть активного ингредиента в составе, которая теоретически может быть преобразована обратно в соответствующую кислоту. Нормы расхода гербицида могут быть выражены в виде "кислотного эквивалента на акр" (сокращенно "к.э./акр") или в качестве "активного ингредиента на акр" (сокращенно "а.и./акр").

Предложены способы получения трансгенного растения кукурузы, устойчивого к гербицидам, содержащее событие кукурузы MON 87419. Потомство, полученное этими способами может быть сортовыми или гибридными растениями; может быть выращено из семян, произведенных трансгенным растением кукурузы, содержащим событие кукурузы MON 87419, или из семян, произведенных растением кукурузы, оплодотворенным пыльцой из трансгенного растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419; и может быть гомозиготным или гетерозиготным по событию кукурузы MON 87419. Растения могут быть самоопыляемыми (также известно как "самоопыление") или перекрестно опыляемыми (также известно как "перекрестное опыление"). Трансгенные растения кукурузы, содержащие событие кукурузы MON 87419, могут быть самоопыляемыми для создания истинной линии для разведения растений, которые являются гомозиготными по событию кукурузы MON 87419. Самоопыление в результате приводит к получению потомства, известного как "инбредное", и используется для производства инбредных линий, которые являются генетически однородными. В качестве альтернативы трансгенные растения кукурузы, содержащие событие кукурузы MON 87419, могут быть ауткроссными (скрещенные с другим растением, которое является трансгенным или нетрансгенным) для получения сортового или гибридного семени. Семена и потомство растений, полученные способами по настоящему изобретению, будут содержать событие кукурузы MON 87419, а затем могут быть обработаны гербицидами глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба. Обработку гербицидами глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба можно использовать для отбора устойчивого потомства. В качестве альтернативы эти растения-потомки могут быть проанализированы с помощью диагностических методов, чтобы отобрать растения или семена, содержащие событие кукурузы MON 87419. Растения, потомство, семена, растительные клетки и части растений по настоящему изобретению могут также содержать один или более дополнительных трансгенных признаков кукурузы, в частности тех, которые вносятся путем скрещивания растения кукурузы, содержащего событие кукурузы MON 87419 с другим растением кукурузы, содержащим дополнительный трансгенный(ые) признак(и). Такие трансгенные признаки кукурузы включают, но не ограничиваются ими, повышенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность использования воды, повышенную производительность урожая, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян, улучшение питательных характеристик, продукцию гибридных семян и устойчивость к гербицидам, при этом признак измеряется по отношению к растению кукурузы, не

имеющему такого трансгенного признака. Такие трансгенные признаки кукурузы известны специалисту в данной области техники; например, перечень таких признаков предоставляется в Государственном департаменте сельского хозяйства Соединенных Штатов (USDA) Службы контроля здоровья животных и растений (APHIS) и могут быть найдены на их сайте: <http://www.aphis.usda.gov>. Два трансгенных растения, таким образом, могут быть скрещены для получения потомства, которое содержит два или более независимых друг от друга отдельных трансгенных признака. Обратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением также рассматриваются, как и вегетативное размножение.

Описания способов разведения, которые обычно используются для различных признаков и культур, можно найти в одной из нескольких ссылок, например Fehr, *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Растения, семена, клетки, части растений и товарные продукты по настоящему изобретению могут быть использованы для детекции ДНК и белковых молекул, свидетельствующих о наличии события кукурузы MON 87419. Такую детекцию можно осуществлять с использованием ДНК последовательности, предложенной в данном документе, и соответствующих последовательностей белков DMO и PAT, кодируемых трансгенной вставкой, которая приведена как SEQ ID NO: 9. Детекцию наличия события кукурузы MON 87419 можно осуществить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как термическая амплификация нуклеиновой кислоты, методы гибридизации нуклеиновых кислот (такие как нозерн-блоттинг и саузерн-анализ), методы детекции белка (такие как вестерн блоттинг, иммунопреципитация и твердофазный иммуносорбентный анализ (ИФА)) или с помощью методов детекции и/или наборов для детекции, предложенных в настоящем документе. Один из способов относится к контактированию образца ДНК с парой праймеров, которая способна производить ампликон из ДНК трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419, выполняя реакции амплификации и, таким образом, продуцируя ампликон ДНК, содержащий по меньшей мере одну из последовательностей ДНК, представленных как SEQ ID NO: 1-10 и SEQ ID NO: 14-22, а затем детекции наличия или отсутствия молекулы ампликона и возможному подтверждению в пределах последовательности ампликона последовательности, содержащей по меньшей мере одну из последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-10 и SEQ ID NO: 14-22. Наличие такого ампликона является диагностическим признаком наличия специфической ДНК для трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419, и, таким образом, биологического материала в образце, который получен от трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Другой способ относится к контактированию образца ДНК с ДНК зондом, подвергая зонд и образец ДНК жестким условиям гибридизации, а затем детекции гибридизации между зондом и образцом ДНК мишени. Детекция гибридизации является диагностическим признаком наличия специфической ДНК для трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419 в образце ДНК.

Предлагаются наборы для детекции ДНК события кукурузы MON 87419.

Вариации таких наборов также могут быть разработаны с использованием композиций и способов, описанных в данном документе, и способов детекции ДНК, хорошо известных в данной области техники. Наборы для детекции ДНК можно применять к способам разведения трансгенных растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419. Такие наборы содержат ДНК праймеры или зонды, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 1-10. Один из примеров такого набора содержит по меньшей мере одну молекулу ДНК из смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 достаточной длины, чтобы функционировать в качестве зонда ДНК, используемого для детекции наличия и/или отсутствия в образце ДНК, полученной от трансгенных устойчивых к гербицидам растений кукурузы, содержащих событие кукурузы MON 87419. Предлагается молекула ДНК, достаточная для использования в качестве зонда ДНК, что используется для определения, детекции или диагностики наличия и/или отсутствия в образце трансгенной устойчивой к гербицидам кукурузы, ДНК, содержащей событие кукурузы MON 87419, приведенной как SEQ ID NO: 13. Другие зонды могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники и должны содержать по меньшей мере около пятнадцати нуклеотидов SEQ ID NO: 10 и быть достаточно уникальными для устойчивой к гербицидам трансгенной кукурузы, содержащей ДНК события кукурузы MON 87419 с целью выявления ДНК, полученной от события кукурузы MON 87419. Другой тип набора содержит пару праймеров, используемых для получения ампликона, который используется для детекции наличия или отсутствия в образце события кукурузы MON 87419. Такой набор должен использовать способ, включающий приведение в контакт образца ДНК-мишени с парой праймеров, а затем проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, достаточной для получения ампликона, содержащего молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10, а затем детекцию наличия или отсутствия ампликона. Такой способ может также включать секвенирование ампликона или его фрагмента. Другие пары праймеров могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники и должны содержать по меньшей мере двадцать нуклеотидов SEQ ID NO: 10 и быть достаточно уникальными для устойчивой к гербицидам трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419 с целью детекции события кукурузы MON 87419. Наборы по настоящему изобретению также могут необязательно включать реагенты для выполнения

обнаружения или диагностических реакций, описанных в данном документе или инструкциях по применению набора и его содержимого.

Используемый в данном документе термин "содержащий" означает "включающий, но не ограничивающийся".

Информация о депозите.

Депозит характерного образца семени трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419, был произведен в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур (ATCC), по адресу 10801 University Boulevard, Manassas, Вирджиния, США, почтовый индекс 20110. ATCC обозначением патентного депозита (номер доступа) для семян, содержащих событие кукурузы MON 87419, является РТА-120860, и датой депозита было 17 января 2014 г. Депозит будет сохранен в депозитарии в течение 30 или 5 лет после последнего запроса или в течение срока действия патента в зависимости от того, какой период дольше.

Примеры

Следующие примеры включены для более полного описания настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные модификации могут быть сделаны в конкретных примерах, которые описаны, но все еще с получением аналогичного результата. Некоторые средства, которые схожи и химически, и физиологически, могут быть использованы вместо средств, описанных в данном документе, достигая тех же самых или подобных результатов. Все такие замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются входящими в объем настоящего изобретения.

Пример 1. Получение и отбор события MON 87419.

Этот пример описывает получение, анализ и отбор трансгенной кукурузы, содержащей событие MON 87419, событие, которое может обеспечить устойчивость к обоим гербицидам: дикамба и глюфосинат. Обобщенно говоря, для окончательного отбора события кукурузы MON 87419 необходимы получение и анализ десятков тысяч отдельных растений в течение многих лет при помощи строгих молекулярных, фенотипических и полевых испытаний.

Векторы трансформации, содержащие различные кассеты экспрессии, были разработаны и протестированы для подтверждения их полезности для экспрессии генов *dmo* и *pat*. Используя эти данные, были отобраны комбинации элементов экспрессии и восемь различных векторов преобразования были сконструированы и трансформированы в кукурузу. С помощью этих векторов были протестированы промоторы и терминаторы в различных комбинациях с двумя кодирующими участками гена *pat* и *dmo* (табл. 1). Полученные в результате растения анализировали на экспрессию белка и два вектора (обозначенные как А и В в табл. 1) были отобраны для коммерческой трансформации кукурузы.

Таблица 1

Конфигурация кассеты трансформирующих векторов

Вектор	кассета 1 (PAT)			кассета 2 (DMO)		
	Промотор	Ген интереса	Терминатор	Промотор	Ген интереса	Терминатор
A	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
B	P-1	PAT	T-1	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
C	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-1	CTP4/DMO	Hsp17.5
D	P-1	PAT	T-1	AND.ge.Ubq1	CTP4/DMO	Hsp17.5
E	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
F	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5
G	P-1	PAT	T-1	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
H	P-1	PAT	T-1	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5

Более тринадцати тысяч уникальных трансформированных растений кукурузы были получены с использованием двух векторов (А и В), которые были отобраны. В растениях часто наблюдаются значительные различия в уровнях экспрессии встроенного гена среди отдельных событий и экспрессия генов может непосредственно положительно или отрицательно коррелировать с фенотипом растения, содержащего событие. Экспрессия чужеродных генов в растениях, как известно, находится, среди прочего, под влиянием их положения в хромосоме. По этой причине было необходимо произвести отбор большого количества отдельных растений, содержащих случайные вставки событий, в течение многих лет и локализаций для того, чтобы определить оптимальное событие. Трансгенное событие кукурузы MON 87419 был создан с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации LH244 незрелых зародышей кукурузы. Способы трансформации кукурузы известны в данной области техники. Кукурузные клетки были трансформированы и регенерированы в целые растения кукурузы. Были отобраны укорененные растения с нормальными фенотипическими характеристиками. Тысячи отдельных независимых событий

затем переносили в почву для роста и дополнительной оценки.

Таблица 2

Процесс отбора события				
	Этап	Вектор А	Вектор В	Всего
		Продвину тые события	Продвинуты ые события	Уникаль ные продвину тые события
Оценка R0	Полученные трансгенные события	5236	8413	13649
	Прохождение первого анализа с одной копией	1300	1698	2998
	Опрыскивание R0	642	798	1440
	Первичный детальный молекулярный анализ	85	99	184
	Саузерн R0	54	58	112
Ранние отборы (R1 и R2)	Испытания R1 и молекулярный анализ	22	22	44
	Испытания R2 и молекулярный анализ	20	22	42
Продвинутые полевые испытания и молекулярный анализ	1 год ЮАм	7	10	17
	1 год США	5	6	11
	2 год ЮАм	2	3	5
	Детальная оценка	2	0	2
	Окончательный отбор события	1	0	1

На протяжении всего процесса отбора событий были проведены, часто одновременно, молекулярный анализ, а также полевые испытания для оценки фенотипа, агрономии и эффективности событий (табл. 2). Было проанализировано 13000 уникальных трансформированных R0 растений кукурузы вначале с помощью ПЦР, чтобы отобрать события с одной копией трансгенной вставки (прохождение первого анализа с одной копией). Это привело в результате к продвижению 2998 событий. Следующий отбор на устойчивость R0 к опрыскиванию гербицидами проводился в теплице. Растения тестировались одновременно на устойчивость к глюфосинату (гербицид Ignite® 280) и дикамбе (гербицид Clarity®) с использованием баковой смеси глюфосината (0,9 фунтов а.и./акр) и дикамбы (2,0 фунта к.э./акр), распыленных на стадии роста V1/V2. Растения, продемонстрировавшие >15% повреждения, были отброшены и 1440 событий были отобраны для дополнительного анализа. Был проведен первичный детальный молекулярный анализ, который включал идентификацию и подтверждение последовательности и вторую проверку количества копий и отсутствия основы. Этот анализ в результате привел к 184 событиям, содержащим только одну копию трансгенной вставки, отобранной для продвижения. Саузерн анализ на ДНК, извлеченной из событий R0, был проведен для дальнейшего подтверждения числа копий трансгенной вставки и подтверждения отсутствия трансформации основы. Исходя из этого 112 событий были отобраны для продвижения к R1 для дополнительного анализа. Растения R0 самоопылялись и семена собирали для испытаний с R1.

Одновременно со всеми полевыми испытаниями в стадии разработки был дополнительный молеку-

лярный анализ. Нозерн-анализ был проведен для детекции и измерения транскриптов мРНК *pat* и *dmo* генов. N-концевое белковое секвенирование белков PAT и DMO, очищенных из трансгенных растений, содержащих отобранные события, проводили для того, чтобы подтвердить последовательность рекомбинантного белка. Вестерн-анализ для детекции PAT и DMO белков проводили с трансгенными образцами растений. Было проведено секвенирование всего трансгена и обоих 5'- и 3'-концов вставки и впоследствии использовано для разработки способов детекции отдельных событий. Детальный анализ по Саузерну проводили на R1 растениях для того, чтобы подтвердить число копий и отсутствия основы.

Для полевого испытания R1 ранних отборов среди 112 событий, отобранных из R0 скрининга, были отобраны 82 события, учитывая всхожесть семян и размер рассадника. Растения R1 были разделены и, таким образом, были нулевыми, гемизиготными или гомозиготными по событию. Оценивали 82 события в R1 растениях при отборе по эффективности на поле с высокими уровнями применения гербицидов. Повреждение растений оценивали после обработки различными комбинациями глюфосината (Ignite 280) и дикамбы (Clarity) (до 20-кратной глюфосината и до 16-кратной дикамбы указанных норм расхода) и с учетом времени применения на различных стадиях роста от V1/V2 до V8/V10. Степень повреждения оценивали через 10-14 дней после применения гербицидов. Стандарты степени повреждения включают балльную оценку хлороза, мальформаций и скрещиваемости. Общие средние значения для множества растений, содержащих то же событие, были использованы для отбора события для продвижения. При применении гербицидов в 2-кратных значениях обычно получают менее 10% повреждений, а при применении гербицидов в 16-кратных и 20-кратных значениях получают более чем 10% степень повреждения. Помимо тестирования эффективности проводили агрономическое оценивание в баллах для каждого растения и коррелировали с событием, которое в нем содержится. Критерии агрономического оценивания в баллах, которые были оценены, включали высоту растения, высоту колоса, процент влажности, тест веса, дни до 50% опыления и дни до 50% шелка. На основе анализа данных, собранных в ходе полевых испытаний R1, и молекулярного анализа были отобраны 44 события для продвижения к R2 для дополнительного анализа. Растения R1 самоопылялись и семена собирали для испытаний с R2.

В полевом исследовании R2 ранних отборов R2 и F1 события (из R1 ауткроссов) оценивались в отборах полевой эффективности в трех местах (двух штатах и Пуэрто-Рико). Повреждение растений оценивали после обработки различными комбинациями норм расхода глюфосината и дикамбы и с учетом времени применения. Растения R2 являются гомозиготными по событию и уровень неудавшейся устойчивости к гербицидам после обработки гербицидами был низким, что подтверждает результаты R1. Агрономические данные были собраны и оценены по баллам как в полевых испытаниях R1. Дополнительный молекулярный анализ, включая анализ экспрессии генов, также был использован для отбора растений, содержащих лучшие события. На основе анализа данных, собранных в ходе полевых испытаний R2 и F1, и молекулярного анализа были отобраны 42 события для продвижения к R3 для дополнительного анализа. Растения R2 самоопылялись и семена собирали для испытаний с R3.

Для продвинутых полевых испытаний были проведены полевые испытания как гибридной, так и инбредной эффективности, а также гибридные и инбредные агрономические полевые испытания. Агрономические полевые испытания проводились в течение того же сезона, что и полевые испытания эффективности. Все полевые испытания использовали рандомизацию по полным группам и были проведены в нескольких местах. Для полевых испытаний эффективности и агрономических полевых испытаний в течение всего испытательного сезона было проведено агрономическое оценивание в баллах, а в конце сезона определяли урожайность (эффективности урожая или агрономическую урожайность). Полевые испытания эффективности были проведены для оценки повреждения сельскохозяйственных культур от 10 до 14 дней после применения гербицида, оценки повреждения сельскохозяйственных культур и урожая. Оценка повреждения целевого урожая в баллах была менее 10% для продвижения события. Для агрономических полевых испытаний на участках поддерживалось отсутствие сорняков и в период вегетации не использовались гербициды глюфосинат или дикамба. Гибридные агрономические полевые испытания включали контроли сравняемого гибрида (гибридного контроля), полученного с использованием тех же родительских линий кукурузы, которые использовались для того, чтобы произвести трансгенное гибридное скрещивание, но не содержащего трансгенного события. Инбредные контроли были сопоставимы по инбредности с трансгенными инбредными линиями.

Мета-анализ проводили с использованием совокупности мультисезонных многолокационных данных полевых испытаний. В табл. 3 представлено количество повторов, для которых повторяли наблюдение для конкретного типа полевого исследования для растений, содержащих одно из событий. Для каждого из этих двух событий насчитывалось 135 значений, зарегистрированных для агрономических реализаций гибрида, 933 значения для эффективности гибрида, 179 значений для инбредной агрономии, 30 значений для инбредной эффективности и 16 значений для тестирования события испытанием нагрузками нормами расхода гербицида для кукурузы, содержащей событие.

Таблица 3

Повторы полевых испытаний для двух окончательных событий

Описание	Повторы для каждого объекта
Агрономия гибрида	135 повторов
Эффективность гибрида	933 повтора
Инбредная агрономия	179 повторов
Инбредная эффективность	30 повторов
Испытание события нагрузками	16 повторов
Общее количество повторов для каждого события	1293

Гибридные растения, каждое из которых содержит один из 23 отобранных событий (подмножество 42 события полевого испытания R2), были оценены в Южной Америке (ЮАм) в 1-й год контра-сезона полевых испытаний эффективности и агрономических полевых испытаний. Испытания проводились в шести местах при рандомизации по полным группам с 4 обработками и 2 повторами каждой обработки. В полевых испытаниях эффективности препаратом дикамба был гербицид Banvel® 4SL и составом глюфосината был Liberty® 1.67SL. Обработки гербицидами состояли из следующего:

- (1) необработанного контроля;
- (2) дикамбы в 2 фунта (0,906 кг) к.э./акр (акр) PRE (при том что PRE определяется как при посадке или до появления урожая) с последующей дикамбой в 1 фунт (0,45 кг) к.э./акр, примененной к каждому из VE-V2 с последующим V4 с последующим V8;
- (3) глюфосината, примененного в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр к VE-V2 с последующим V4 с последующим V8; и
- (4) глюфосината, примененного в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр, плюс дикамбы, примененных в 1 фунте (0,454 кг) к.э./акр к VE-V2 с последующим V4 с последующим V8.

Степень повреждения оценивали через 10-14 дней после применения гербицидов. Общие средние значения для множества растений, содержащих то же событие, были использованы для отбора событий для продвижения. Оценка повреждения целевого урожая в баллах была менее 10% и оценка наблюдаемого повреждения была менее 1%. На основе оценивания в баллах повреждения гибрида, агрономического оценивания в баллах эффективности урожая, агрономической урожайности и дополнительного молекулярного анализа были отобраны 17 событий для продвижения.

Инбредные и гибридные растения из 17 событий, продвинутых из 1 года ЮАм полевых испытаний контра-сезона, были затем дополнительно оценены в полевых испытаниях эффективности года 1 и агрономических полевых испытаниях в Соединенных Штатах (США). Эти испытания были проведены в 2012 г., который был сезоном сильной засухи в Соединенных Штатах. Полевые испытания эффективности гибрида проводились в 12 местах, 2 штатах при рандомизации по полным группам с 6 обработками и 3 повторами каждой обработки. Гибридные растения, содержащие трансгенное событие устойчивости к глифосату, происходили от мужского родителя при скрещивании. В полевых испытаниях эффективности составом глифосата был Roundup PowerMAX® 4.5SL, составом дикамбы был Clarity 4SL и составом глюфосината был Ignite 280 2.34SL. Обработки гербицидами состояли из следующего:

- (1) необработанного контроля;
- (2) глифосата в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр, примененного к V4, с последующим V8;
- (3) глюфосината в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр, примененного к V2, с последующим V4 с последующим V8;
- (4) дикамбы в 2 фунта (0,906 кг) а.и./акр, примененной PRE и затем снова примененной к V4, с последующим V8;
- (5) глифосата в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр плюс дикамбы в 1,5 фунта (0,68 кг) к.э./акр, примененной к V2, с последующим V4 с последующим V8;
- (6) дикамбы в 2 фунта (0,906 кг) к.э./акр, примененной к V2, с последующим глюфосинатом в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр плюс дикамбы в 1 фунт (0,454 кг) к.э./акр, примененной на стадии роста V4, с последующим глифосатом в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр плюс дикамба в 1,5 фунта (0,68 кг) к.э./акр, примененных на стадии роста V8.

Степень повреждения оценивали через 10-14 дней после применения гербицидов. Общие средние значения для множества растений, содержащих то же событие, были использованы для отбора событий для продвижения. Оценка повреждения целевого урожая в баллах была менее 10% и оценка наблюдаемого повреждения была менее 1%. На основе оценивания в баллах повреждения гибрида, агрономического оценивания в баллах эффективности урожая, агрономической урожайности и дополнительного молекулярного анализа были отобраны 11 событий для продвижения. Полевые испытания года 2 контра-сезона в Южной Америке (ЮАм) для оценки эффективности гибрида и инбредной агрономической урожайности

сти были затем проведены с растениями, содержащими эти 11 событий. Гибридные растения, содержащие трансгенное событие устойчивости к глифосату, происходили от мужского родителя при скрещивании. Полевые испытания эффективности гибрида были проведены в основном, как описано для контра-сезона 1 года полевых испытаний в Южной Америке (ЮАм), но со следующими гербицидными обработками:

- (1) необработанным контролем;
- (2) глифосатом в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр, примененным к V4, с последующим V8;
- (3) глюфосинатом в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр, примененным к V4, с последующим V8;
- (4) дикамбой в 2 фунта (0,906 кг) к.э./акр, примененной PRE и затем снова примененной к V4 с последующим V8;
- (5) глифосатом в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр плюс дикамба в 1,5 фунта (0,68 кг) к.э./акр, примененных к V4 с последующим V8;
- (6) глюфосинатом в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр плюс дикамба в 1 фунт (0,454 кг) к.э./акр, примененных к V4, с последующим глифосатом в 3 фунта (1,361 кг) к.э./акр плюс дикамба в 1,5 фунта (0,68 кг) к.э./акр, примененных к V8.

Степень повреждения оценивали через 10-14 дней после применения гербицидов. Общие средние значения для множества растений, содержащих то же событие, были использованы для отбора событий для продвижения. На основе оценивания в баллах повреждения гибрида, агрономического оценивания в баллах эффективности урожая гибрида, инбредного агрономической урожайности, и дополнительного молекулярного анализа были отобраны 5 событий для продвижения. Затем был совершен дополнительный молекулярный анализ для этих 5 событий. Многолетние полевые и молекулярные данные для каждого из 5 событий, включая полевые испытания признака эффективности гибрида, гибридные и инбредные измерения урожайности, агрономическое оценивание в баллах и молекулярную информацию, были впоследствии рассмотрены и два события были отобраны для дополнительного анализа. Оба эти события были получены с использованием того же вектора трансформации и, таким образом, имели ту же вставку трансгена, но не ту же локализацию в геноме или фланкирующую последовательность.

Полевые испытания года 2 в Соединенных Штатах (США) инбредной эффективности, а также гибридные и инбредные агрономические полевые испытания были проведены для оценки этих двух событий. Полевые испытания эффективности гибрида были проведены аналогичным образом, как в год 1 полевых испытаний в США, но включая разные режимы распыления. Эффективность была измерена по степени повреждения и эффективности урожая гибрида. Затем был совершен дополнительный молекулярный анализ для этих событий. Гибридные растения, содержащие трансгенное событие устойчивости к глифосату, происходили от мужского родителя при скрещивании. Полевые испытания 1 и 2 эффективности гибрида проводились в 12 местах среди двух штатов и полевые испытания 3 эффективности гибрида проводились в тридцати трех местах среди четырех штатов. В этих полевых испытаниях эффективности составом глифосата был Roundup PowerMAX 4.5SL, составом дикамбы был Clarity 4SL и составом глюфосината был Ignite 280 2.34SL. Гербицидами для испытаний эффективности 1 и эффективности 2 (со скрещиванием двух отдельных инбредных линий) были

- (1) необработанный контроль;
- (2) глюфосинат в 0,4 фунта (0,181 кг) а.и./акр, примененный к VE-V2, с последующим V6;
- (3) глюфосинат в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр, примененный к VE-V2, с последующим V6;
- (4) дикамба в 0,5 фунтов (0,227 кг) к.э./акр, примененная к V4, с последующим V8;
- (5) дикамба в 1,0 фунтов к.э./акр, примененная к V4, с последующим V8; и
- (6) глифосат в 2,25 фунтов к.э./акр плюс дикамба в 1,0 фунтов к.э./акр, примененные к V4, с последующим V8.

Гербицидами для испытаний эффективности 3 (представляющими гибрид, полученный от скрещивания с третьей инбредной линией) были

- (1) необработанный контроль;
- (2) дикамба в 0,5 фунтов (0,227 кг) к.э./акр, примененная к VE-V2, с последующим глюфосинатом в 0,4 фунта (0,181 кг) а.и./акр, примененным к V6; и
- (3) дикамба в 1,0 фунтов к.э./акр, примененная к VE-V2, с последующим глюфосинатом в 0,8 фунтов (0,363 кг) а.и./акр, примененным к V6.

Степень повреждения оценивали через 10-14 дней после применения гербицидов и множество растений, содержащих такое же событие, использовали для отбора событий для продвижений. Собирали данные урожайности и агрономические данные. Для сравнения степени повреждения гибрида для двух событий был проведен мета-анализ многочисленных полевых испытаний эффективности гибрида. (табл. 4). Степень повреждения оценивали на V8 (при том что анализ V8 охватывает кумулятивное повреждение от V2, V4, V6 и V8 применений гербицидов) со статистической наименьшей достоверной разностью (LSD при $p < 0,05$). Тестер 1, тестер 2 и тестер 3 представляют собой скрещивания с 3 независимыми инбредными родительскими линиями кукурузы, которые были использованы для создания гибрида для указанного полевого испытания. Ни для одного из испытаний не было найдено статистической разницы в степени повреждения между гибридами, полученными с использованием родительской трансгенной

кукурузы, содержащей один из двух событий.

Таблица 4

Мета-анализ степени повреждения из полевых испытаний эффективности гибрида

Полевое испытание	Трансгенная кукуруза	Повреждение V8	LSD (P<0,05)
1 год комбинировано ЮАм и США	MON 87419	0,43	0,3
1 год комбинировано ЮАм и США	событие 2	0,49	0,3
Эффективность гибрида 2 года ЮАм	MON 87419	2,58	3
Эффективность гибрида 2 года ЮАм	событие 2	1,98	3
Тестер 1 гибрида 2 года ЮАм	MON 87419	0	0
Тестер 1 гибрида 2 года ЮАм	событие 2	0	0
Тестер 2 гибрида 2 года США	MON 87419	0	0
Тестер 2 гибрида 2 года США	событие 2	0	0
Тестер 3 гибрида 2 года США	MON 87419	0,31	0,42
Тестер 3 гибрида 2 года США	событие 2	0,12	0,42

Был проведен мета-анализ эффективности урожая гибрида (бушелей/акр) из многочисленных полевых испытаний эффективности по сравнению с урожаем гибридов, содержащих каждый из двух событий (табл. 5). Ни для одного из испытаний не было найдено статистической разницы в эффективности урожая гибридов между гибридами, полученными с использованием родительской трансгенной кукурузы, содержащей один из двух событий.

Таблица 5

Мета-анализ урожайности полевых испытаний эффективности гибрида

Полевое испытание	Гибрид кукурузы	Урожайность (бушелей/акр)	LSD (P<0,05)
1 год комбинировано ЮАм и США	MON 87419	171,07	4
1 год комбинировано ЮАм и США	событие 2	172,90	4
2 год ЮАм	MON 87419	233,66	14
2 год ЮАм	событие 2	231,59	14
Тестер 1 2 года США	MON 87419	217,43	10
Тестер 1 2 года США	событие 2	220,06	10
Тестер 2 2 года США	MON 87419	219,68	7
Тестер 2 2 года США	событие 2	221,21	7
Тестер 3 2 года США	MON 87419	208,76	5,67
Тестер 3 2 года США	событие 2	213,02	5,67

Полевые испытания тестирования испытанием нагрузками были проведены также с гибридной трансгенной кукурузой, содержащей один из двух событий. В тестах испытанием нагрузками гербицидами либо глюфосинат (Ignite 280, 2.34SL), либо дикамба (Clarity 4SL) применялись при некоммерчески высоких величинах. Для типичных полевых испытаний 1-кратная величина глюфосината составляла 0,4 фунта (0,181 кг) а.и./акр и 1-кратная величина для дикамба составляла 0,5 фунта (0,22 кг) к.э./акр. Для полевых испытаний тестирования испытанием нагрузками глюфосината применяли глюфосинат на VE-V2 с последующим V4 с последующим V8 со следующими величинами:

- (1) 1 фунт (0,454 кг) а.и./акр (2,5-кратный);
- (2) 2 фунта (0,906 кг) а.и./акр (5-кратный);
- (3) 4 фунта а.и./акр (10-кратный); и
- (4) 8 фунтов (3,629 кг) а.и./акр (20-кратный).

Для полевых испытаний тестирования испытанием нагрузками дикамбы, применяли дикамбу на

VE-V2 с последующим V4 с последующим V8 со следующими величинами:

- (1) 2 фунта (0,906 кг) к.э./акр (4-кратный);
- (2) 4 фунта к.э./акр (8-кратный);
- (3) 8 фунтов (3,629 кг) к.э./акр (16-кратный); и
- (4) 16 фунтов (7,248 кг) к.э./акр (32-кратный).

В конце сезона полевые испытания тестирования испытанием нагрузками гибрида собирали и определяли урожайность (бушелей/акр или буш/акр). Анализ данных по урожайности сравнивали с гибридами, содержащими любой из этих двух событий. Ни для одного из испытаний не было найдено статистической разницы в урожайности по любой из величин применения гербицидов между гибридами, полученными с использованием родительской трансгенной кукурузы, содержащей один из двух событий.

Таблица 6

Урожайность из полевых испытаний эффективности тестирования гибрида испытанием нагрузками

Полевое испытание	Трансгенный Гибрид кукурузы	Урожайность (бушелей/акр)	LSD (P<0,05)
Тест испытания нагрузками 2,5-20-кратного глюфосината	MON 87419	207,31	40
Тест испытания нагрузками 2,5-20-кратного глюфосината	событий 2	201,65	40
Тест испытания нагрузками 4-32-кратного дикамба	MON 87419	239,93	40
Тест испытания нагрузками 4-32-кратного дикамба	событий 2	234,60	40

Агрономические полевые испытания гибридов проводились в 3 комплексах по 15 мест в каждом комплексе в 21 местах среди 3 штатов и были проведены в течение того же сезона с полевыми испытаниями эффективности гибрида. Агрономические измерения были собраны в течение испытательного полевого сезона, а в конце сезона была определена агрономическая урожайность. Мета-анализ мультисезона многолокационных агрономических полевых испытаний гибрида использовали для сравнения с урожайностью гибридного контроля и гибридов, содержащих один из двух событий. Никакой статистической разницы для агрономической урожайности гибрида не было найдено ни между трансгенными гибридами, ни по сравнению с контрольными гибридами (табл. 7).

Таблица 7

Мета-анализ урожайности агрономических полевых испытаний гибрида

Полевое испытание	Гибрид кукурузы	Урожайность (бушелей/акр)	LSD (P<0,05)
1 год комбинировано ЮАм и США	Контроль	180,28	6
1 год комбинировано ЮАм и США	MON 87419	179,01	6
1 год комбинировано ЮАм и США	событие 2	184,88	6
2 год ЮАм	Контроль	231,70	10
2 год ЮАм	MON 87419	232,47	10
2 год ЮАм	событие 2	225,07	10
Тестер 1 2 года США	Контроль	185,80	17,40
Тестер 1 2 года США	MON 87419	187,09	17,40
Тестер 1 2 года США	событие 2	192,28	17,40

Тестер 2 2 года США	Контроль	219,12	12,83
Тестер 2 2 года США	MON 87419	219,56	12,83
Тестер 2 2 года США	событие 2	221,22	12,83
Тестер 3 2 года США	Контроль	197,62	8,66
Тестер 3 2 года США	MON 87419	191,49	8,66
Тестер 3 2 года США	событие 2	195,48	8,66

Полевые испытания инбредной эффективности были проведены с использованием рандомизации по полным группам в 6 местах в 1 штате. В этих полевых испытаниях составом дикамбы был Clarity 4SL и составом глюфосината был Ignite 280 2.34SL. Применения гербицида для инбредных полевых испытаний эффективности представляли собой глюфосинат в 0,8 фунта а.и./акр и дикамбу в 2,0 фунта к.э./акр, примененные при VE-V2 с последующим глюфосинатом в 0,8 фунта а.и./акр и дикамбой в 2,0 фунта к.э./акр, примененным на V8. В конце сезона измеряли урожайность. Для каждого из испытаний была найдена статистическая разница в инбредной эффективности урожайности по сравнению инбредной урожайностью, полученной в этих испытаниях от трансгенной кукурузы, содержащей один из двух событий (табл. 8). Эти данные указывают на более высокую производительность трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419.

Таблица 8

Мета-анализ урожайности полевых испытаний инбредной эффективности

Полевое испытание	Инбредная кукуруза	Урожайность (бушелей/акр)	LSD (P<0,05)
Инбредное год 2 США	MON 87419	110,95	7
Инбредное год 2 США	событие 2	98,89	7

Инбредные агрономические полевые испытания проводились в течение того же сезона, что и полевые испытания эффективности года 1 США, полевые испытания эффективности года 1 ЮАм и полевые испытания эффективности года 2 США (11 мест, 1 штат). Участки были установлены при рандомизации по полным группам, проведенной во многих местах, а также испытания включали контроль сравнимой инбредной линии с трансгенными инбредными линиями. Мета-анализ мультисезона многолокационных инбредных агрономических полевых испытаний проводили по сравнению урожайности парного контроля и трансгенного инбредного растения с использованием одного из двух событий. Для инбредной агрономической урожайности не было найдено никакой статистической разницы между контрольной и трансгенной кукурузой, содержащей событие MON 87419 (табл. 9). В отличие от этого наблюдалось статистически значимое снижение урожайности трансгенной кукурузы, содержащей событие 2, по сравнению или с контролем, или трансгенной кукурузой, содержащей событие MON 87419. Эти данные дополнительно указывают на более высокую производительность трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419.

Таблица 9

Мета-анализ урожайности инбредных агрономических полевых испытаний

Полевое испытание	Инбредная кукуруза	В общем (бушелей/акр)	LSD (P<0,05)
Инбредное 1 года США	Контроль	65,87	31
Инбредное 1 года США	MON 87419	60,33	31
Инбредное 1 года США	событие 2	43,10	31
Инбредное 2 года ЮАм	Контроль	95,88	7
Инбредное 2 года ЮАм	MON 87419	98,77	7
Инбредное 2 года ЮАм	событие 2	75,85	7
Инбредное 2 года США	Контроль	108,90	6
Инбредное 2 года США	MON 87419	109,22	6
Инбредное 2 года США	событие 2	96,88	6

Пример 2. Характеристика последовательности ДНК с событием кукурузы MON 87419.

Этот пример описывает обширную молекулярную характеристику, которая была проведена для события кукурузы MON 87419. Трансгенная вставка события кукурузы MON 87419 в направлении от 5' к 3' содержит

(i) промотор (P-ANDge.Ubq1), лидер и интрон (L-1-ANDge.Ubq1) гена убиквитина (Ubq) из *Andropogon gerardii*; функционально связанный с *pat* геном из *Streptomyces viridochromogenes* (CR-STRvi.pat), который кодирует фосфинотрицин N-ацетилтрансферазу (PAT), что придает устойчивость к гербициду глюфосинату; функционально связанный с сигналом полиаденилирования (также известный как терминатор, который направляет полиаденилирование мРНК) из RA5B предшественника ген из *Oryza sativa* (T-Os.Ara5); и

(ii) промотор полной длины транскрипта вируса хлоротической полосатости арахиса с удвоенным энхансерным участком (PCISV); ген из *Triticum aestivum* (L-Ta.Lhcb1), функционально связанный с лидером светособирающего комплекса b1; функционально связанный с первым интроном гена актина 1 из *Oryza sativa* (I-Os.Act1); функционально связанный с N-концевым транзитным пептидом хлоропласта из гибрида гена 5-энолпирувилликимат-3-фосфат-синтазы петунии (TS-Ph.ShkG-CTP4); функционально связанный с *dmo* ген *Stenotrophomonas maltophilia*, оптимизированный для экспрессии в однодольных (CR-STEma.DMO), который кодирует монооксигеназу дикамбы (DMO), что придает устойчивость к гербициду дикамба; функционально связанный с сигналом полиаденилирования белка теплового шока 17 из *Triticum aestivum* (T-Ta.Hsp17).

5'-Конец трансгенной вставки фланкирован правой границей *Agrobacterium tumefaciens* и 3'-конец трансгенной вставки фланкирован левой границей *Agrobacterium tumefaciens*. Саузерн-блот-анализ был проведен, чтобы подтвердить, что трансгенная кукуруза, содержащая событие кукурузы MON 87419, содержит единственную неповрежденную копию всей трансгенной вставки без какой-либо основы вектора. Фланкирующие последовательности были отделены от обоих 5'- и 3'-концов вставки, а соответствующие соединения были определены с помощью обратной ПЦР и/или методов "прогулки по геному". Хромосомное расположение вставки события кукурузы MON 87419 определяли с помощью обратной ПЦР для амплификации геномной ДНК за пределами сайта, представляющего интерес. Фланкирующие последовательности события кукурузы MON 87419 были картированы по известной физической совокупности генома кукурузы, и было подтверждено, что событие кукурузы MON 87419 не было в пределах любого из известных генов. Эта информация о последовательности была использована для разработки TAQMAN® анализов по конечной точке, специфичных по отношению к событию, для выявления присутствия события кукурузы MON 87419 в образце. Информация о последовательности сайта вставки была также использована для биоинформатического анализа хромосомной локализации события. Целост-

ность сайта вставки определялась с помощью ПЦР через аллель дикого типа с использованием праймеров, специфичных к фланкирующим участкам события кукурузы MON 87419. Дикий тип вставки сайта был использован для картирования по эталонному геному кукурузы уникального сайта вставки трансгена для события кукурузы MON 87419. Для того чтобы гарантировать, что никакие изменения или мутации не были введены в любой участок трансгена в процессе трансформации, вся трансгенная вставка события кукурузы MON 87419 была выделена из растения и секвенирована.

N-концевое белковое секвенирование экспрессированных белков PAT и DMO проводили с использованием иммуноочищенных белковых экстрактов, полученных из зерна трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Эту последовательность затем использовали для подтверждения подлинности N-концевой аминокислотной последовательности. Вестерн-анализ проводили на белковых экстрактах, полученных из зерна трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Это подтверждало, что производился один белок ожидаемого размера для PAT и DMO соответственно. Были проведены анализы ИФА для определения уровней белка в различных типах тканей трансгенной кукурузы (листьев, семян, корней и пыльцы) для белка PAT или DMO, экспрессированного из события кукурузы MON 87419. Нозерн-анализ был проведен на полиаденилированной РНК, выделенной из зерна трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419. Это подтверждало размер транскрипта и количество продуктов мРНК pat и dmo. Уровни экспрессии РНК также были измерены с помощью ПНР в реальном времени с использованием образцов, полученных от трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419.

Пример 3. Специфичные по отношению к событию TAQMAN® анализы по конечной точке.

В этом примере описан специфичный по отношению к событию способ термической амплификации TAQMAN® по конечной точке, разработанный для идентификации трансгенной кукурузы, содержащей событие кукурузы MON 87419 в образце. ДНК-праймеры, используемые в анализе по конечной точке представляют собой праймеры SQ26644 (SEQ ID NO: 11), SQ26645 (SEQ ID NO: 12) и 6-FAM™ меченый зонд PB11207 (SEQ ID NO: 13). 6-FAM™ представляет собой флуоресцентный краситель, продукт из Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния), присоединенный к ДНК-зонду. Для зондов TAQMAN® MGB™ 5' экзонуклеазная активность Taq ДНК-полимеразы расщепляет зонд с 5'-конца между флуорофором и гасителем. При гибридизации с цепью ДНК-мишени гаситель и флуорофор разделены достаточно, чтобы получить флуоресцентный сигнал, тем самым высвобождая флуоресценцию. SQ26644 и SQ26645 при использовании с этими методами реакции и PB 11207 позволяют получить ДНК ампликон, который является диагностическим для события кукурузы MON 87419.

Контроли для этого анализа должны включать положительный контроль, содержащий событие кукурузы MON 87419, отрицательный контроль из нетрансгенной кукурузы, а также отрицательный контроль, который не содержит матричной ДНК. Кроме того, контроль ПЦР-реакции должен оптимально включать праймеры внутреннего контроля и зонд внутреннего контроля, специфичные к одной копии гена в геноме кукурузы. Эти анализы оптимизированы для использования либо с Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (пробег на максимальной скорости) или на MJ Research DNA Engine PTC-225 термоциклере, но можно использовать и другое оборудование.

Примером условий, которые используются со способом анализа TAQMAN® по конечной точке, который используется для детекции события кукурузы MON 87419, является следующее.

Стадия 1: 18 мегаомной воды доводят до конечного объема 10 мкл.

Стадия 2: 5,0 мкл 2-кратной смеси Universal Master Mix (dNTP, фермент, буфер) доводят до 1-кратной конечной концентрации.

Стадия 3: 0,5 мкл праймер-1 для события (SQ26644) и праймер-2 для события (SQ26645). Смесь (ресуспендировали в 18 мегаомной воде до концентрации 20 мкМ каждого праймера) доводят до 1,0 мкМ конечной концентрации (например, в пробирке для микроцентрифуги, чтобы достичь 500 мкл конечной концентрации 20 мкМ, необходимо добавить следующее: 100 мкл праймера SQ26644 в концентрации 100 мкМ; 100 мкл праймера SQ26645 в концентрации 100 мкМ; 300 мкл 18 мегаомной воды).

Стадия 4: 0,2 мкл зонда для события 6-FAM™ MGB PB11207 (10 мкМ) (ресуспендировали в 18 мегаомной воде до концентрации от 10 до 0,2 мкМ конечной концентрации).

Стадия 5: 0,5 мкл смеси праймера-1 внутреннего контроля и праймера-2 внутреннего контроля (ресуспендировали в 18 мегаомной воде до концентрации 20 мкМ для каждого праймера) доводят до 1,0 мкМ конечной концентрации.

Стадия 6: 0,2 мкл зонда внутреннего контроля VIC™ (10 мкМ) доводят до 0,2 мкМ конечной концентрации (ресуспендировали в 18 мегаомной воде до концентрации 10 мкМ).

Стадия 7: 3,0 мкл выделенной ДНК (матричной) для каждого образца с одним из следующего, содержащего

- 1) образцы листьев для анализа;
- 2) отрицательный контроль (не трансгенная ДНК);
- 3) отрицательный контроль воды (без матрицы);
- 4) положительный контроль трансгенной кукурузы, содержащей ДНК события кукурузы

MON 87419.

Стадия 8: условия термоциклера следующие:

один цикл при 50°C в течение 2 мин;

один цикл при 95°C в течение 10 мин;

десять циклов при 95°C в течение 15 с, затем 64°C в течение 1 мин при (-1°C/цикл);

тридцать циклов при 95°C в течение 15 с, затем 54°C 1 мин, необязательные дополнительные от 10 до 20 циклов (95°C в течение 15 с, затем 64°C в течение 1 мин (-1°C/цикл) могут обеспечить более четкое разделение популяции при анализе EndPoint TaqMan®);

окончательный цикл при 10°C.

Пример 4. Анализ зиготности.

Анализ зиготности может быть использован для определения того, является ли растение, содержащее событие кукурузы MON 87419, гетерозиготным или гомозиготным по событию или аллелю дикого типа. Анализ реакции амплификации может быть разработан с использованием информации о последовательности, указанной в настоящем документе. Например, такой анализ ПЦР будет включать в себя конструкцию по меньшей мере трех праймеров: праймера-1, праймера-2 и праймера-3, при том что праймер-1 является специфическим для геномной ДНК кукурузы на 3' фланкирующем конце события кукурузы MON 87419; праймер-2 является специфическим для трансгенной вставки события кукурузы MON 87419; и праймер-3 является специфическим для аллеля дикого типа. При использовании в качестве пары праймеров в реакции амплификации праймера-1 с праймером-2 будет получен ПЦР ампликон, специфический для события кукурузы MON 87419. При использовании в качестве пары праймеров в реакции амплификации праймера-1 с праймером-3 будет получен ПЦР ампликон, специфический для аллеля дикого типа. При ПЦР-реакции, выполненной на геномной ДНК кукурузы, соответствующие ПЦР ампликоны, полученные с помощью праймера-1+праймера-2 и праймера-1+праймера-3, будут отличаться по последовательности и размеру ампликона. Когда три праймера включены в реакцию ПЦР с ДНК, выделенной из растения, гомозиготного по событию кукурузы MON 87419, будет синтезироваться только ампликон праймер-1+праймер-2. Когда три праймера включены в реакцию ПЦР с ДНК, выделенной из растения, гетерозиготного по событию кукурузы MON 87419, будут синтезироваться ампликон праймер-1+праймер-2 и ампликон праймер-1+праймер-3. Когда три праймера смешиваются вместе при реакции ПЦР с ДНК, выделенной из растения, нулевого по событию кукурузы MON 87419 (такого, которое является диким типом), будет синтезироваться только ампликон праймер-1+праймер-3. Другим способом определения зиготности растения кукурузы для события кукурузы MON 87419 является TaqMan® реакция термической амплификации по конечной точке. Для данного типа анализа в дополнение к праймерам, как описано выше, анализ будет включать в себя два флуоресцентно меченных зонда. Зонд-1 будет специфическим для события кукурузы MON 87419 и зонд-2 будет специфическим для растения кукурузы, которое является нулевым по событию кукурузы MON 87419 (диким типом), при том что два зонда содержат различные флуоресцентные метки, например 6-FAM™-метку или VIC™-метку. При использовании TAQMAN® реакции термической амплификации по конечной точке праймера-1+праймер-2+зонд-1 будет производить первый флуоресцентный сигнал, специфический для события кукурузы MON 87419. При использовании TAQMAN® реакции термической амплификации по конечной точке праймера-1+праймер-3+зонд-2 будет производить второй флуоресцентный сигнал, специфический для кукурузы дикого типа. Когда три праймера и два зонда включены в TAQMAN® реакцию термической амплификации по конечной точке с ДНК, выделенной из растения, гомозиготного по событию кукурузы MON 87419, будет генерироваться только первый флуоресцентный сигнал (специфичный праймеру-1+праймеру-2+зонду-1). Когда три праймера включены в TAQMAN® реакцию термической амплификации по конечной точке с ДНК, выделенной из растения, гетерозиготного по событию кукурузы MON 87419, будет генерироваться первый флуоресцентный сигнал (специфичный праймеру-1+праймеру-2+зонду-1) и второй флуоресцентный сигнал (специфичный праймеру-1+праймеру-3+зонду-2). Когда три праймера смешиваются вместе при TAQMAN® реакции термической амплификации по конечной точке с ДНК, выделенной из растения, которое является нулевым по событию кукурузы MON 87419 (диким типом), будет генерироваться только второй флуоресцентный сигнал (специфичный праймеру-1+праймеру-3+зонду-2).

Другим способом определения зиготности растения кукурузы для события MON 87419 будет анализ по Саузерну. Специалисту в данной области техники должно быть понятно как разработать гибридизационный(ые) зонд(ы) для анализа по Саузерну, специфичные для события кукурузы MON 87419, и второй гибридизационный зонд для анализа по Саузерну, специфичный для растения кукурузы, которое является нулевым по событию кукурузы MON 87419 (диким типом). С помощью анализа по Саузерну сигнал, детектируемый только от первого гибридизационного зонда для анализа по Саузерну, будет свидетельствовать о том, что растение является гомозиготным по событию кукурузы MON 87419; сигнал, детектируемый как от первого гибридизационного зонда для анализа по Саузерну, так и от второго гибридизационного зонда для анализа по Саузерну, будет свидетельствовать о том, что растение является гетерозиготным по событию кукурузы MON 87419; и сигнал, детектируемый только от второго гибридизационного зонда для анализа по Саузерну, будет свидетельствовать о том, что ДНК выделили из расте-

ния, которое является нулевым по событию кукурузы MON 87419 (диким типом).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекombинантная молекула ДНК, содержащая последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 или комплементарных им,

причем молекула рекомбинантной ДНК является маркером трансгенного события, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

2. Рекombинантная молекула ДНК по п.1, отличающаяся тем, что молекула ДНК получена из трансгенного растения кукурузы или семени, содержащего трансгенное событие кукурузы.

3. Рекombинантная молекула ДНК по п.1, отличающаяся тем, что молекула ДНК представляет собой ампликон для диагностики наличия ДНК трансгенного события кукурузы.

4. Молекула ДНК, содержащая SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, где ДНК молекула является зондом ДНК.

5. Пара ДНК праймеров для выявления рекомбинантной молекулы ДНК по п.1, где пара ДНК праймеров содержит первый ДНК и второй ДНК праймеры,

причем первый ДНК праймер содержит последовательность достаточной длины из последовательных нуклеотидов в пределах 1247-8008 последовательности SEQ ID NO: 10 или ее комплемент для функционирования в качестве ДНК праймера и второй ДНК праймер содержит последовательность достаточной длины из последовательных нуклеотидов в пределах 1-1246 или 8009-9259 последовательности SEQ ID NO: 10 или ее комплемент для функционирования в качестве ДНК праймера,

причем ДНК праймеры при их совместном использовании в реакции амплификации с образцом ДНК, содержащей рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, продуцируют ампликон, который содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

6. Способ обнаружения наличия рекомбинантной молекулы ДНК по п.1 в образце ДНК,

причем способ включает

приведение образца в контакт с молекулой ДНК по п.4;

применение к образцу и молекуле ДНК жестких условий гибридизации; и

детекцию гибридизации молекулы ДНК с молекулой ДНК-мишени в образце,

причем гибридизация ДНК молекулы с молекулой ДНК-мишени свидетельствует о наличии указанной рекомбинантной молекулы ДНК по п.1 в образце ДНК.

7. Способ обнаружения наличия рекомбинантной молекулы ДНК по п.1 в образце ДНК,

причем способ включает

приведение образца в контакт с парой ДНК праймеров по п.5;

проведение реакции амплификации, достаточной для получения ДНК ампликона, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; и

обнаружение ДНК ампликона в реакции,

причем наличие ДНК ампликона в реакции свидетельствует о наличии указанной рекомбинантной молекулы ДНК по п.1 в образце ДНК.

8. Набор для обнаружения ДНК, содержащий

а) молекулу ДНК, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; или

б) пару ДНК праймеров по п.5; и

с) инструкции по применению указанного набора,

причем набор обнаруживает наличие указанного трансгенного события кукурузы,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

9. Трансгенное растение кукурузы, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п.1,

причем присутствие молекулы рекомбинантной ДНК указывает на присутствие трансгенного события кукурузы, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

10. Трансгенное семя растения кукурузы, содержащее рекомбинантную молекулу ДНК по п.1,

причем присутствие молекулы рекомбинантной ДНК указывает на присутствие трансгенного события кукурузы, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

11. Трансгенная клетка растения кукурузы, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, причем присутствие молекулы рекомбинантной ДНК указывает на присутствие трансгенного события кукурузы, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

12. Трансгенная часть растения кукурузы, содержащая рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, причем присутствие молекулы рекомбинантной ДНК указывает на присутствие трансгенного события кукурузы, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

13. Товарный продукт, содержащий рекомбинантную молекулу ДНК по п.1, причем указанный товарный продукт содержит детектируемое количество указанной молекулы ДНК, и

причем присутствие молекулы рекомбинантной ДНК указывает на присутствие трансгенного события, обеспечивающего толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860, где указанный товарный продукт включает переработанные семена, зерна, части растения или кукурузную муку.

14. Трансгенное растение кукурузы по п.9, отличающееся тем, что растение кукурузы представляет собой гибрид, имеющий по меньшей мере одно родительское растение, которое содержит трансгенное событие кукурузы, причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

15. Трансгенное семя по п.10, отличающееся тем, что семя кукурузы представляет собой гибрид, имеющий по меньшей мере одно родительское растение, которое содержит трансгенное событие кукурузы, причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860.

16. Способ борьбы с сорняками на участке, включающий посадку трансгенной кукурузы, содержащей трансгенное событие кукурузы, обеспечивающее толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба, на участке и применение эффективной дозы гербицидов дикамба или глюфосинат либо дикамба и глюфосинат для борьбы с сорняками на участке без повреждения трансгенной кукурузы,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860,

причем указанное трансгенное событие кукурузы содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что эффективная доза гербицида глюфосинат в целом составляет от около 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 16 фунтов (7,248 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида глюфосината в течение периода вегетации.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что эффективная доза гербицида глюфосинат в целом составляет от около 0,4 фунта (0,181 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 1,59 фунтов (0,720 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида глюфосината в течение периода вегетации.

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что эффективная доза гербицида дикамба в целом составляет от около 0,1 фунта (0,045 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 16 фунтов (7,248 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида дикамба в течение периода вегетации.

20. Способ по п.16, отличающийся тем, что эффективная доза гербицида дикамба в целом составляет от около 0,5 фунта (0,22 кг) кислотного эквивалента на акр (0,405 га) до приблизительно 2 фунтов (0,906 кг) кислотного эквивалента на акр гербицида дикамба в течение периода вегетации.

21. Способ получения трансгенного растения кукурузы, устойчивого к гербицидам глюфосинат и дикамба, при этом способ включает

половое скрещивание трансгенного растения кукурузы, содержащего трансгенное событие кукурузы, обеспечивающее толерантность к гербицидам глюфосинат или дикамба либо глюфосинат и дикамба с самим собой или другим растением кукурузы,

причем характерный образец семени, содержащий указанное событие, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-120860,

причем указанное событие кукурузы содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10;

сбор полученных семян;

