

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290193** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.09.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.28**

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C07K 2/00* (2006.01)  
*C07K 4/10* (2006.01)  
*A01H 1/06* (2006.01)  
*A01H 5/00* (2006.01)  
*A01H 1/02* (2006.01)

---

**(54) ОБЪЕКТ КУКУРУЗЫ MON87429 И СПОСОБЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

---

(31) **62/625,537**

(32) **2018.02.02**

(33) **US**

(62) **202091620; 2019.01.28**

(71) Заявитель:  
**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС  
(US)**

(72) Изобретатель:

**Эллис Кристин М., Гоули Майкл Е.,  
Хуан Цзиньтай, Клингаман Трейси Е.,  
Лару Клейтон Т., Ци Юлинь, Спаркс  
Оскар С., Ван Скойок Брук М., Ян  
Хэпин (US)**

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

---

(57) В изобретении предложены молекулы рекомбинантной ДНК, которые являются уникальными в отношении объекта кукурузы MON87429, а также трансгенные растения кукурузы, части растений кукурузы, семена кукурузы, клетки кукурузы и сельскохозяйственные продукты, содержащие объект кукурузы MON87429, а также способы использования и обнаружения объекта кукурузы MON87429. Трансгенные растения кукурузы, содержащие объект кукурузы MON87429, демонстрируют толерантность к ингибиторам ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе; синтетическим ауксином; ингибиторам глутаминсинтетазы и ингибиторам 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазы (EPSPS).

**A1**

**202290193**

**202290193**

**A1**

**ОБЪЕКТ КУКУРУЗЫ MON87429 И СПОСОБЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ****ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/625 537, поданной 2 февраля 2018 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

**ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[002] Перечень последовательностей, который содержится в файле под названием «MONS430WO-seq.txt» размером 44,2 КВ (MS-Windows), созданном 17 января 2019 г., подан вместе с настоящим документом в электронном виде и включен в настоящий документ посредством ссылки.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[003] Изобретение относится к молекулам рекомбинантной ДНК объекта кукурузы MON87429. Изобретение также относится к трансгенным растениям кукурузы, частям растений, семенам, клеткам и сельскохозяйственным продуктам, содержащим объект кукурузы MON87429, а также к способам использования трансгенных растений кукурузы, частей растений, семян, клеток и сельскохозяйственных продуктов, содержащих объект кукурузы MON87429, и способам обнаружения объекта кукурузы MON87429. Трансгенные растения кукурузы, части растений, семена и клетки, содержащие объект кукурузы MON87429, демонстрируют толерантность к ингибиторам ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, таким как хизалофоп и галоксифоп; синтетическим ауксином, таким как дикамба и 2,4-D; ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как глюфосинат; а также ингибиторам 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS), таким как глифосат.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[004] Кукуруза (*Zea mays*) является важной сельскохозяйственной культурой во многих частях мира, а использование гербицидов при производстве сельскохозяйственных культур для контроля роста сорняков является устоявшейся практикой. Биотехнологические методы используются с целью получения трансгенной кукурузы, толерантной к определенному гербициду благодаря экспрессии гетерологичного гена, также известного как трансген. Признак толерантности к гербициду может использоваться отдельно или в комбинации с другими признаками, такими как толерантность к другому гербициду или устойчивость к вредителям или патогенам. Комбинации признаков толерантности к гербицидам являются желательными для обеспечения возможных способов контроля роста сорняков, которые повышают гибкость сельхозпроизводителей и позволяют использовать различные гербициды для контроля роста проблемных сорняков. Комбинацию признаков можно получить путем скрещивания между собой каждого отдельного признака. Скрещивание между собой отдельных признаков в кукурузе и сохранение этой комбинации в ходе скрещивания с разнообразным пулом элитной идиоплазмы - это трудоемкий и дорогостоящий процесс. Комбинацию признаков также

можно получить путем объединения множества признаков в одном месте, или локусе, в геноме, упрощая, таким образом, процесс скрещивания. Один из способов достичь этого заключается в единой трансгенной вставке, содержащей множество трансгенов. Комбинация признаков толерантности ко множеству гербицидов в одном локусе в кукурузе обеспечит полезный инструмент для контроля роста сорняков, который будет намного проще и дешевле сохранить в процессе скрещивания с разнообразным пулом элитной идиоплазмы.

[005] На экспрессию трансгена в трансгенном растении, части растения, семени или клетке и, таким образом, на его эффективность могут влиять многие различные факторы, такие как элементы, используемые в экспрессионной кассете трансгена, и взаимодействие таких элементов. Это дополнительно усложняется в случае трансгенной вставки, содержащей две или более экспрессионные кассеты, когда каждая экспрессионная кассета содержит трансген, который обеспечивает отдельный признак и также называется мультигенным трансгенным объектом. Коммерчески пригодный мультигенный трансгенный объект предполагает, что экспрессия каждого из трансгенов в трансгенной вставке будет осуществляться так, как это необходимо для каждого признака. Чтобы этого достичь, отдельные экспрессионные кассеты сначала разрабатываются и тестируются в растениях, и для каждого признака отбираются наилучшие экспрессионные кассеты. Затем отобранные экспрессионные кассеты для одного признака объединяют с отобранными экспрессионными кассетами для другого признака(-ов) в одну конструкцию и эту конструкцию тестируют с целью убедиться, что все экспрессионные кассеты хорошо функционируют вместе и каждый трансген экспрессируется должным образом. Затем отобранную комбинацию экспрессионных кассет используют в виде единой трансгенной вставки для получения сотен мультигенных трансгенных объектов, каждый из которых является результатом случайной вставки чужеродной ДНК в различные геномные локации.

[006] Каждый трансгенный объект является уникальным. Уникальные объекты затем анализируют в многочисленных поколениях растений, чтобы отобрать лучший объект для коммерческого использования. На свойства объекта в трансгенном растении, части растения, семени или клетке и, таким образом, на его эффективность может влиять геномная локация трансгенной вставки. Объекты могут иметь одинаковую трансгенную вставку и тем не менее обладать различными уровнями трансгенной экспрессии и различными свойствами в тканях, на разных стадиях развития, в различной идиоплазме или в определенных условиях роста. Создание мультигенного объекта для коммерческого использования требует тщательной молекулярной характеристики, тепличного тестирования и полевых испытаний в течение многих лет, в разных локациях и в различных условиях, чтобы можно было собрать обширные агрономические, фенотипические и молекулярные данные. Полученные данные затем должны быть проанализированы учеными и агрономами, чтобы можно было выбрать объект, пригодный для коммерческого использования. Коммерческий мультигенный объект затем можно интрогрессировать в виде единого локуса, обладающего признаками толерантности ко множеству гербицидов, в

новую идиоплазму, используя способы скрещивания растений.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] В изобретении предложены молекулы рекомбинатной ДНК, содержащие последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:1. В одном варианте осуществления молекула рекомбинатной ДНК получена из растения, семени или клетки, содержащих объект кукурузы MON87429, причем репрезентативный образец семени, содержащего объект, депонирован под номером доступа ATCC PTA-124635. В другом варианте осуществления молекула рекомбинатной ДНК находится в растении, клетке, семени или части растения, содержащих объект кукурузы MON87429, причем репрезентативный образец семени, содержащего объект, депонирован как ATCC PTA-124635. В другом варианте осуществления молекула рекомбинатной ДНК представляет собой ампликон, позволяющий диагностировать присутствие объекта кукурузы MON87429.

[008] В изобретении предложена конструкция ДНК, содержащая четыре экспрессионные кассеты, причем первая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Erianthus ravennae*, (II) последовательность, кодирующую фосфинотрицин N-ацетилтрансферазу, и (III) 3'-НТО фруктозобисфосфат-альдолазы от *Setaria italica*; вторая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Coix lacryma-jobi*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид альбиносного и бледно-зеленого б хлоропласта, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую дикамба-монооксигеназу, и (IV) 3'-НТО металлотионеин-подобного белка от *Oryza sativa*; третья экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Arundo donax*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта малатдегидрогеназы, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую белок FT\_T, и (IV) 3'-НТО белка неверхушечной меристемы от *Oryza sativa*; и четвертая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор и лидер CaMV 35S, (II) лидер хлорофилл a/b-связывающего белка от *Triticum aestivum*, (III) интрон актина 1 от *Oryza sativa*, (IV) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта ShkG, от *Arabidopsis thaliana*, (V) последовательность, кодирующую толерантную к глифосату 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, от штамма CP4 *Agrobacterium sp*, (VI) миРНК-мишень, специфичную к тканям мужских растений, от *Zea mays*, и (VII) 3'-НТО богатого глицином РНК-связывающего белка от *Oryza sativa*.

[009] В изобретении предложена молекула ДНК, имеющая достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO:10, чтобы функционировать как ДНК-зонд, специфичный в отношении SEQ ID NO:10, в образце ДНК, полученном от растения кукурузы, семени кукурузы или клетки кукурузы. В одном варианте осуществления ДНК-зонд содержит SEQ ID NO:13.

[0010] В изобретении предложена пара молекул ДНК, содержащая первую молекулу

ДНК и вторую молекулу ДНК, причем первая и вторая молекулы ДНК содержат фрагмент SEQ ID NO:10 и функционируют как ДНК-праймеры, когда они используются вместе в реакции амплификации с ДНК, содержащей объект кукурузы MON87429, для получения ампликона, позволяющего диагностировать в образце объект кукурузы MON87429. В одном варианте осуществления по меньшей мере один ДНК-праймер содержит фрагмент последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8. В другом варианте осуществления первая молекула ДНК содержит SEQ ID NO:11, а вторая молекула ДНК содержит SEQ ID NO:12.

[0011] В изобретении предложен способ обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце ДНК, полученном от растения кукурузы, семени кукурузы или клетки кукурузы, причем способ включает в себя: приведение в контакт образца с ДНК-зондом; помещение образца и ДНК-зонда в жесткие условия гибридизации и обнаружение гибридизации ДНК-зонда с ДНК-молекулой в образце, причем гибридизация ДНК-зонда с ДНК-молекулой указывает на присутствие объекта кукурузы MON87429 в образце ДНК.

[0012] В изобретении предложен способ обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце ДНК, полученном от растения кукурузы, семени кукурузы или клетки кукурузы, причем способ включает в себя: приведение в контакт образца с парой молекул ДНК, которые функционируют как ДНК-праймеры; проведение реакции амплификации, достаточной для получения ампликона ДНК, содержащего последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:1; и обнаружение присутствия ампликона ДНК, причем присутствие ампликона ДНК указывает на присутствие объекта кукурузы MON87429 в образце.

[0013] В изобретении предложен способ обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце, полученном от растения кукурузы, семени кукурузы или клетки кукурузы, причем способ включает в себя: приведение в контакт образца с по меньшей мере одним антителом, специфичным в отношении по меньшей мере одного или более белков, кодируемых объектом кукурузы MON87429; и обнаружение связывания антитела с белком в образце, причем связывание антитела с белком указывает на присутствие объекта кукурузы MON87429 в образце. В другом варианте осуществления способ включает в себя дополнительное приведение в контакт образца с по меньшей мере вторым антителом, специфичным в отношении второго белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429. В другом варианте осуществления способ включает в себя дополнительное приведение в контакт образца с по меньшей мере вторым антителом и третьим антителом, специфичными в отношении второго белка и третьего белка, соответственно, кодируемых объектом кукурузы MON87429. В другом варианте осуществления способ включает в себя дополнительное приведение в контакт образца с по меньшей мере вторым антителом, третьим антителом и четвертым антителом, специфичными в отношении второго белка, третьего белка и четвертого белка, соответственно, кодируемых объектом кукурузы MON87429.

[0014] В изобретении предложен набор для обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429, содержащий ДНК-зонд, специфичный в отношении SEQ ID NO:10, пару ДНК-праймеров, которые вырабатывают ампликон, позволяющий диагностировать объект кукурузы MON87429, или по меньшей мере одно антитело, специфичное в отношении по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429.

[0015] В изобретении предложено растение, семя, клетка, часть растения или товар, содержащие молекулу ДНК, содержащую 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. В одном варианте осуществления растение, семя, клетка или часть растения являются толерантными к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации. В другом варианте осуществления растение, семя, клетка или часть растения являются толерантными к хизалофопу, галоксифопу, дикамбе, 2,4-D и глюфосинату.

[0016] В изобретении предложен способ контроля роста сорняков на участке выращивания сельскохозяйственных культур, включающий в себя посадку кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429, на участке выращивания сельскохозяйственных культур и применение к участку выращивания сельскохозяйственных культур, или любой его части, эффективного количества по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, для контроля роста сорняков на этом участке, не нанося при этом вреда кукурузе. В одном варианте осуществления способ включает в себя применение по меньшей мере двух или более гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS), за урожайный сезон. В другом варианте осуществления способ включает в себя применение гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофопы, галоксифопы, дикамбы, 2,4-D, глюфосината и глифосата или любой их комбинации. В одном варианте осуществления эффективное количество дикамбы составляет от около 0,1 фунта кэ/акр до около 16 фунтов кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество дикамбы составляет от около 0,5 фунта кэ/акр до около 2 фунтов кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество глюфосината составляет от около 0,1 фунта кэ/акр до около 16 фунтов кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество глюфосината составляет от около 0,4 фунта кэ/акр до около 1,59 фунта кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное

количество 2,4-D составляет от около 0,1 фунта кэ/акр до около 10 фунтов кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество 2,4-D составляет от около 0,75 фунта кэ/акр до около 1,0 фунта кэ/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество гербицида ФОП составляет от около 0,01 фунта аи/акр до около 1,0 фунта аи/акр за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество гербицида ФОП составляет от около 0,034 фунта аи/акр до около 0,083 фунта аи/акр хизалофоп за урожайный сезон. В одном варианте осуществления эффективное количество гербицида ФОП составляет от около 0,018 фунта аи/акр до около 0,07 фунта аи/акр галоксифопа за урожайный сезон.

[0017] В изобретении предложен способ контроля самосевной кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429, на участке, включающий в себя применение гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного циклогександионного (DIM) гербицида, причем применение гербицида предотвращает рост кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429. В одном варианте осуществления циклогександионный (DIM) гербицид выбран из группы, состоящей из клетодима, сетоксидима и тралкоксидима.

[0018] В изобретении предложен способ получения растения, которое является толерантным к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, причем способ включает в себя: скрещивание растения, содержащего объект кукурузы MON87429, с самим собой или со вторым растением с получением семени и идентификацию семени потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429. В одном варианте осуществления идентификация семени потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429, происходит путем проращивания семени потомства с получением растений потомства; обработки растений потомства эффективным количеством по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофоп, галоксифопа, дикамбы, 2,4-D, глюфосината, глифосата или любой их комбинации; и отбора растения потомства, которое является толерантным к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (ACC) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS). В одном варианте осуществления идентификация семени потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429, происходит путем обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце, полученном из семени потомства. В одном варианте осуществления идентификация семени потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429, происходит путем обнаружения присутствия по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429, в образце, полученном из семени потомства.

[0019] В изобретении предложен способ получения гибридного семени,

включающий в себя: выращивание растения, содержащего SEQ ID NO:10; применение эффективного количества глифосата до или во время развития ткани мужских органов размножения растения, вызывая, таким образом, у растения мужскую стерильность; оплодотворение растения пыльцой второго растения и сбор гибридного семени с растения. В одном варианте осуществления глифосат применяют до или во время развития в эффективном количестве от около 0,25 фунта кэ/акр до около 11,0 фунтов кэ/акр. В одном варианте осуществления глифосат применяют до или во время развития в эффективном количестве от около 0,5 фунта кэ/акр до около 2,5 фунта кэ/акр в совокупности за одно или более применений. В одном варианте осуществления эффективное количество глифосата применяют на стадии развития, выбранной из группы, состоящей из стадии V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 и V14 развития растения кукурузы. В изобретении предложено гибридное семя, содержащее SEQ ID NO:10 и полученное способом получения гибридного семени, включающим в себя: выращивание растения, содержащего SEQ ID NO:10; применение эффективного количества глифосата до или во время развития ткани мужских органов размножения растения, вызывая, таким образом, у растения мужскую стерильность; оплодотворение растения пыльцой второго растения и сбор гибридного семени с растения.

[0020] В изобретении предложен способ определения зиготности растения по объекту кукурузы MON87429, включающий в себя: приведение в контакт образца, содержащего ДНК, полученную из растения, с набором праймеров, способным произвести первый ампликон, позволяющий диагностировать присутствие объекта кукурузы MON87429, и второй ампликон, позволяющий диагностировать геномную ДНК кукурузы дикого типа, не содержащую объект кукурузы MON87429; проведение реакции амплификации нуклеиновых кислот; обнаружение первого ампликона и второго ампликона, причем присутствие обоих ампликонов указывает на то, что образец является гетерозиготным по объекту кукурузы MON87429, а присутствие только первого ампликона указывает на то, что образец является гомозиготным по объекту кукурузы MON87429. В одном варианте осуществления набор праймеров содержит SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12.

[0021] В изобретении предложен способ повышения толерантности к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, у растения кукурузы, включающий в себя: (а) получение конструкции ДНК, содержащей четыре экспрессионные кассеты, причем первая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Erianthus ravennae*, (II) последовательность, кодирующую фосфинотрицин N-ацетилтрансферазу, и (III) 3'-НТО фруктозобисфосфат-альдолазы от *Setaria italica*; вторая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Coix lacryma-jobi*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид альбиносного и бледно-зеленого 6 хлоропласта, от

*Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую дикамба-монооксигеназу, и (IV) 3'-НТО металлотионеин-подобного белка от *Oryza sativa*; третья экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Arundo donax*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта малатдегидрогеназы, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую белок FT\_T, и (IV) 3'-НТО белка неверхушечной меристемы от *Oryza sativa*; и четвертая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор и лидер CaMV 35S, (II) лидер хлорофилл a/b-связывающего белка от *Triticum aestivum*, (III) интрон актина 1 от *Oryza sativa*, (IV) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта ShkG, от *Arabidopsis thaliana*, (V) последовательность, кодирующую толерантную к глифосату 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, от штамма CP4 *Agrobacterium sp.*, (VI) миРНК-мишень, специфичную к тканям мужских растений, от *Zea mays*, и (VII) 3'-НТО богатого глицином РНК-связывающего белка от *Oryza sativa*; (b) вставку конструкции ДНК в геном клетки кукурузы; (c) регенерацию клетки кукурузы в растение кукурузы и (d) отбор растения кукурузы, содержащего конструкцию ДНК. В одном варианте осуществления отбор происходит путем обработки растения кукурузы эффективным количеством по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофоп, галоксифопа, дикамбы, 2,4-D, глюфосината или глифосата. В одном варианте осуществления в изобретении предложено растение кукурузы, семя кукурузы или клетка кукурузы, толерантные к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, и полученные способом, в котором растение кукурузы, семя кукурузы или клетка кукурузы содержат конструкцию ДНК. В дополнительном варианте осуществления растение кукурузы, семя кукурузы или клетка кукурузы, полученные таким способом, содержат SEQ ID NO:10.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] На Фиг. 1 представлена последовательность объекта кукурузы MON87429. Горизонтальные линии соответствуют 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 и SEQ ID NO:9 относительно SEQ ID NO:10; горизонтальные стрелки, обозначенные SQ51062 (SEQ ID NO:11) и SQ51053 (SEQ ID NO:12), показывают приблизительное положение пары праймеров, которые могут использоваться для обнаружения объекта кукурузы MON87429; а горизонтальная линия, обозначенная PB50370 (SEQ ID NO:13), показывает приблизительное положение ДНК-зонда, который может использоваться для обнаружения объекта кукурузы MON87429.

[0023] На Фиг. 2 показаны четыре экспрессионные кассеты объекта кукурузы MON87429 относительно SEQ ID NO:9 с их соответствующими генетическими элементами, обозначенными как описано в таблице 1.

[0024] На Фиг. 3 показаны создание, тестирование, характеристика и отбор объекта MON87429, как описано в настоящем документе. Все значения времени являются приблизительными.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0025] SEQ ID NO:1 - последовательность ДНК из тридцати нуклеотидов, представляющая 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:1 соответствует нуклеотидным позициям с 1015 по 1044 в SEQ ID NO:10.

[0026] SEQ ID NO:2 - последовательность ДНК из тридцати нуклеотидов, представляющая 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:2 соответствует нуклеотидным позициям с 15023 по 15052 в SEQ ID NO:10.

[0027] SEQ ID NO:3 - последовательность ДНК из шестидесяти нуклеотидов, представляющая 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:3 соответствует нуклеотидным позициям с 1000 по 1059 в SEQ ID NO:10.

[0028] SEQ ID NO:4 - последовательность ДНК из шестидесяти нуклеотидов, представляющая 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:4 соответствует нуклеотидным позициям с 15008 по 15067 в SEQ ID NO:10.

[0029] SEQ ID NO:5 - последовательность ДНК из ста нуклеотидов, представляющая 5'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:5 соответствует нуклеотидным позициям с 980 по 1079 в SEQ ID NO:10.

[0030] SEQ ID NO:6 - последовательность ДНК из ста нуклеотидов, представляющая 3'-соединение геномной ДНК кукурузы и трансгенной вставки. SEQ ID NO:6 соответствует нуклеотидным позициям с 14988 по 15087 в SEQ ID NO:10.

[0031] SEQ ID NO:7 - последовательность ДНК из 1350 нуклеотидов, представляющая 1029 нуклеотидов 5' фланкирующей геномной ДНК кукурузы и 321 нуклеотид на 5'-конце трансгенной вставки.

[0032] SEQ ID NO:8 - последовательность ДНК из 1069 нуклеотидов, представляющая 38 нуклеотидов на 3'-конце трансгенной вставки и 1031 нуклеотид 3' фланкирующей геномной ДНК кукурузы.

[0033] SEQ ID NO:9 - последовательность ДНК из 14008 нуклеотидов, соответствующая трансгенной вставке объекта кукурузы MON87429.

[0034] SEQ ID NO:10 - последовательность ДНК из 16068 нуклеотидов, соответствующая объекту кукурузы MON87429; последовательность содержит 5' фланкирующую геномную последовательность ДНК в позициях с 1 по 1029, трансгенную ДНК-вставку в позициях с 1030 по 15037 и 3' фланкирующую геномную последовательность ДНК в позициях с 15038 по 16068.

[0035] SEQ ID NO:11 - последовательность ДНК из 29 нуклеотидов, соответствующая праймеру, называемому SQ51062 и используемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON87429 в образце; она соответствует позициям с 15038 по 15066 в SEQ ID NO:10.

[0036] SEQ ID NO:12 - последовательность ДНК из 17 нуклеотидов,

соответствующая праймеру, называемому SQ51053 и используемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON87429 в образце; она соответствует позициям с 14987 по 15003 в SEQ ID NO:10.

[0037] SEQ ID NO:13 - последовательность ДНК из 16 нуклеотидов, соответствующая зонду, называемому PB50370 и используемому для идентификации ДНК объекта кукурузы MON87429 в образце; она соответствует позициям с 15009 по 15024 в SEQ ID NO:10.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0038] Последующие определения и способы представлены для лучшего описания изобретения и для инструктирования специалистов в данной области техники при осуществлении настоящего изобретения на практике. Если не указано иное, специалистам в данной области техники следует понимать термины в соответствии с общепринятым применением.

[0039] Методики трансформации растения используются для вставки чужеродной ДНК (также известной как трансгенная ДНК) случайным образом в хромосому генома клетки с целью получения генетически сконструированной клетки, также называемой «трансгенной» или «рекомбинантной» клеткой. Используя данную методику, многие отдельные клетки трансформируют и в результате каждой трансформации получают уникальный трансгенный объект благодаря случайной вставке чужеродной ДНК в геном. Трансгенное растение затем регенерируют из каждой отдельной трансгенной клетки. Это приводит к тому, что каждая клетка трансгенного растения содержит уникально вставленный трансгенный объект как стабильную часть своего генома. Это трансгенное растение можно затем использовать для получения растений потомства, каждое из которых будет содержать уникальный трансгенный объект. Объект кукурузы MON87429 был получен путем: (i) трансформации тысяч клеток кукурузы с помощью конструкции ДНК, которая содержит четыре экспрессионные кассеты (каждую экспрессионную кассету отбирали в результате индивидуального тестирования с последующим тестированием в комбинации с остальными тремя экспрессионными кассетами), (ii) регенерации популяции трансгенных растений, каждое из которых содержит уникальный трансгенный объект, и (iii) строгого многолетнего отбора объектов, включающего в себя тестирование и анализ молекулярных свойств, эффективности толерантности к гербицидам и агрономических свойств различных фоновых генотипов тысяч объектов среди десятков тысяч растений. Таким образом, объект кукурузы MON87429 был получен и отобран как уникальный лучший объект, пригодный для широкомасштабного применения в коммерческих агрономических целях.

[0040] Как используется в настоящем документе, «трансгенный объект» или «объект» представляет собой молекулу ДНК, созданную путем вставки молекулы трансгенной ДНК в геномную ДНК клетки растения, используя способы трансформации растения, известные в данной области техники. Подобная вставка создает новую трансгенную геномную последовательность ДНК, которая состоит из вставленной

чужеродной ДНК (называемой «трансгенной вставкой») и геномной ДНК, расположенной непосредственно рядом с трансгенной вставкой (или «фланкирующей» трансгенную вставку) по обе стороны от места вставки (называемой «фланкирующей ДНК»). Последовательность ДНК объекта является уникальной и специфичной в отношении этого объекта и может быть легко идентифицирована при сравнении с другими последовательностями ДНК, как например, последовательностями других объектов или нетрансформированной геномной ДНК кукурузы. Объект кукурузы MON87429 имеет новую и уникальную последовательность ДНК, представленную в виде SEQ ID NO:10, которая содержит последовательность трансгенной вставки, представленную в виде SEQ ID NO:9, и 5' и 3' фланкирующие последовательности ДНК, представленные в виде SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно. Таким образом, объект кукурузы MON87429 представляет собой молекулу ДНК, которая является неотъемлемой частью хромосомы клеток и растений трансгенной кукурузы, содержащих этот объект, и поэтому является статичным и может передаваться клеткам и растениям потомства.

[0041] В настоящем изобретении также предложено потомство исходной трансформированной клетки и растения, которые содержат объект кукурузы MON87429. Подобное потомство можно получить из тканевой культуры клетки, путем самооплодотворения растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON87429, или путем полового скрещивания растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON87429, с другим растением, которое может содержать или не содержать этот объект. Таким другим растением может быть трансгенное растение, содержащее аналогичный или другой объект(-ы), или нетрансгенное растение, как например, растение другого вида. Объект кукурузы MON87429 передается потомству от исходного родителя через каждое поколение.

[0042] Как используется в настоящем документе, термин «кукуруза» означает *Zea mays* (также называемая «маис») и охватывает все виды растений, которые можно скрещивать с *Zea mays*.

[0043] В изобретении предложен объект кукурузы MON87429, который придает клеткам, растениям и семенам кукурузы, которые содержат этот объект, толерантность к ингибиторам ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, таким как хизалофоп и галоксифоп; синтетическим ауксинам, таким как дикамба и 2,4-D; ингибиторам глутаминсинтетазы, таким как глюфосинат; а также ингибитору 5-енолпирувиллицимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) глифосату. Объект кукурузы MON87429 содержит четыре экспрессионные кассеты. Как используется в настоящем документе, «экспрессионная кассета» или «кассета» представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую комбинацию отдельных элементов, которые должны экспрессироваться трансформированной клеткой. В таблице 1 представлен перечень элементов, которые содержатся в SEQ ID NO:10, как показано на Фиг. 2.

**Таблица 1. Описание объекта кукурузы MON87429**

Элемент	Позиция в	Описание
---------	-----------	----------

	SEQ ID NO:10	
5' фланкирующая ДНК	1-1029	Последовательность ДНК, фланкирующая 5'-конец трансгенной вставки
Область левой границы	1030-1288	Область ДНК от <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , содержащая последовательность левой границы
Промежуточная последовательность	1289-1359	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
P- <i>Ea.ubq</i>	1360-3541	Последовательности промотора, 5'-НТО и интрона гена убиквитина от <i>Erianthus ravennae</i>
Промежуточная последовательность	3542-3546	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
CS- <i>Sv.pat</i>	3547-4098	Кодирующая последовательность для фосфинотрицин N-ацетилтрансферазы (PAT)
T- <i>Si.fba</i>	4099-4475	Последовательность 3'-НТО гена <i>фруктозобисфосфат-альдозы</i> от <i>Setaria italica</i>
Промежуточная последовательность	4476-4537	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
P- <i>Clj.ubq</i>	4538-6463	Последовательности промотора, 5'-НТО и интрона гена убиквитина от <i>Coix lacryma-jobi</i>
Промежуточная последовательность	6464-6473	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
TS- <i>At.apg6</i>	6474-6677	Кодон-оптимизированная нацеливающая последовательность <i>альбиносного и бледно-зеленого 6</i> гена от <i>Arabidopsis thaliana</i>
CS- <i>Sm.dmo</i>	6678-7700	Кодирующая последовательность для белка дикамбы-монооксигеназы (DMO)
Промежуточная последовательность	7701-7708	Последовательность, используемая при клонировании ДНК

T- <i>Os.mt</i>	7709-8008	Последовательность 3'-НТО металлотионеин-подобного белка от <i>Oryza sativa</i>
Промежуточная последовательность	8009-8016	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
P- <i>Ad.ubq</i>	8017-9973	Последовательности промотора, 5'-НТО и интрона гена убиквитина от <i>Arundo donax</i>
Промежуточная последовательность	9974-9986	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
TS- <i>At.mdh</i>	9987-10229	Последовательность транзитного пептида гена малатдегидрогеназы от <i>Arabidopsis thaliana</i>
CS- <i>Sh.ft_t</i>	10230-11117	Кодирующая последовательность для белка FT_T
Промежуточная последовательность	11118-11132	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
T- <i>Os.nam</i>	11133-11649	Последовательность 3'-НТО белка неверхушечной меристемы от <i>Oryza sativa</i>
Промежуточная последовательность	11650-11655	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
P- <i>CaMV.35S</i>	11656-11979	Промотор и лидер из РНК 35S вируса мозаики цветной капусты
Промежуточная последовательность	11980-12001	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
L- <i>Ta.cab</i>	12002-12062	Лидерная последовательность 5'-НТО из хлорофилл a/b-связывающего белка от <i>Triticum aestivum</i>
Промежуточная последовательность	12063-12078	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
I- <i>Os.ract1</i>	12079-12558	Последовательность интрона и НТО белка актина I от <i>Oryza sativa</i>

Промежуточная последовательность	12559-12567	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
TS- <i>At.CTP2</i>	12568-12795	Последовательность транзитного пептида гена <i>ShkG</i> от <i>Arabidopsis thaliana</i>
CS- <i>cp4epsps</i>	12796-14163	Кодирующая последовательность для белка 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфат синтазы (CP4-EPSPS)
Промежуточная последовательность	14164-14169	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
мтс-миРНК	14170-14370	Последовательность миРНК-мишени, специфичной к тканям мужских растений
Промежуточная последовательность	14371-14378	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
T- <i>Os.grp3</i>	14379-14989	Последовательность 3'-НТО гена богатого глицином РНК-связывающего белка ( <i>Grp3</i> ) от <i>Oryza sativa</i>
Промежуточная последовательность	14990-15030	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
Область правой границы	15031-15037	Область ДНК от <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , содержащая последовательность правой границы
3' фланкирующая ДНК	15038-16068	Фланкирующая ДНК

[0044] Как используется в настоящем документе, термин «рекомбинантный» относится к неприродным ДНК, белку или организму, которые обычно не встречаются в природе и были созданы путем вмешательства человека. Как используется в настоящем документе, «молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые естественным образом не встречаются вместе, и являющуюся результатом вмешательства человека, например, молекулу ДНК, которая содержит комбинацию по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных по отношению друг к другу, таких как молекула ДНК, которая содержит трансген и геномную ДНК растения, смежную с трансгеном. Примером молекулы рекомбинантной ДНК является

молекула ДНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-10. Как используется в настоящем документе, «рекомбинантное растение» представляет собой растение, которого обычно не существует в природе, которое является результатом вмешательства человека и которое содержит молекулу трансгенной ДНК. В результате подобного геномного изменения рекомбинантное растение представляет собой нечто новое и явным образом отличается от родственного растения дикого типа. Примером рекомбинантного растения является растение кукурузы, содержащее объект кукурузы MON87429.

[0045] Как используется в настоящем документе, термин «трансген» относится к молекуле ДНК, искусственным образом включенной в геном организма в результате вмешательства человека, например, при помощи способов трансформации растения. Трансген может быть гетерологичным по отношению к организму. Термин «трансгенная вставка», как используется в настоящем документе, относится к чужеродной ДНК, вставленной с помощью методик трансформации растения в геном кукурузы для получения объекта кукурузы MON87429. Последовательность для трансгенной вставки объекта кукурузы MON87429 представлена в виде SEQ ID NO:9. Термин «трансгенный» относится к чему-либо, содержащему трансген, например, термин «трансгенное растение» относится к растению, содержащему трансген.

[0046] Как используется в настоящем документе, термин «гетерологичный» относится к первой молекуле, которая обычно не связана со второй молекулой или организмом в природе. Например, молекула ДНК может происходить от первого вида и быть вставленной в геном второго вида. Молекула ДНК, таким образом, будет гетерологичной по отношению к геному и к организму.

[0047] Как используется в настоящем документе, термин «химерный» относится к одной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, причем ни первая, ни вторая молекула ДНК обычно не встречается в подобной конфигурации, будучи слитой с другой молекулой. Химерная молекула ДНК, таким образом, представляет собой новую молекулу ДНК, которая обычно не встречается в природе. Примером химерной молекулы ДНК является молекула ДНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-10.

[0048] Как используется в настоящем документе, термин «выделенный» относится к отделению молекулы от других молекул, которые обычно с ней связаны в нативном или естественном состоянии. Таким образом, термин «выделенный» может относиться к молекуле ДНК, которая была отделена от другой(-их) молекулы(молекул) ДНК, с которой она связана в нативном или естественном состоянии. Подобная молекула ДНК может присутствовать в рекомбинантном состоянии, например, в виде молекулы рекомбинантной ДНК. Таким образом, молекула ДНК, удаленная из своего естественного состояния и слитая с другой молекулой ДНК, с которой она обычно не связана, будет выделенной молекулой ДНК. Подобную выделенную молекулу ДНК можно получить путем применения биотехнологических методик, таких как создание рекомбинантной ДНК или интеграция

чужеродной ДНК в хромосому клетки, растения или семени.

[0049] В изобретении предложены молекулы ДНК и их соответствующие последовательности ДНК. Как используется в настоящем документе, термины «ДНК» и «молекула ДНК» относятся к молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Молекула ДНК может быть геномной или синтетического происхождения и обычно идет в направлении от 5' (верхнего) конца до 3' (нижнего) конца. Как используется в настоящем документе, термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Используемая номенклатура соответствует требованиям раздела 37 Свода федеральных нормативных актов США § 1.822 и изложена в таблицах стандарта ВОИС ST.25 (1998), приложении 2, таблицах 1 и 3. Условно считается, что последовательности ДНК по изобретению и их фрагменты описаны со ссылкой только на одну цепочку из двух комплементарных цепочек последовательности ДНК. Согласно смыслу или намерениям, комплементарные последовательности из последовательностей, представленных в настоящем документе (последовательности комплементарной цепочки), также называемых в данной области обратными комплементарными последовательностями, находятся в пределах объема настоящего изобретения и явным образом предназначены для охвата объемом заявленного предмета изобретения. Таким образом, как используется в настоящем документе, ссылки на SEQ ID NO:1-10 и их фрагменты включают в себя и относятся к последовательности комплементарной цепочки и ее фрагментам.

[0050] Как используется в настоящем документе, термин «фрагмент» относится к меньшему куску целого. Например, фрагменты SEQ ID NO:10 будут включать в себя последовательности, которые состоят из по меньшей мере около 10 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 11 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 12 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 13 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 14 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 15 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 16 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 17 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 18 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 19 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 20 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 25 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 30 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 35 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 40 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 45 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 50 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 60 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 70 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 80 последовательных нуклеотидов, по меньшей мере около 90 последовательных нуклеотидов или по меньшей мере около 100 последовательных нуклеотидов из полной последовательности SEQ ID NO:10.

[0051] Последовательность ДНК для трансгенной вставки объекта кукурузы MON87429 представлена в виде SEQ ID NO:9. Последовательность ДНК трансгенной вставки и геномной ДНК кукурузы, фланкирующей каждую сторону трансгенной вставки,

представлена в виде SEQ ID NO:10. Последовательности ДНК части фланкирующей ДНК и 5' конца трансгенной вставки представлены в виде SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7. Последовательности ДНК части фланкирующей ДНК и 3' конца трансгенной вставки представлены в виде SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:8.

[0052] Последовательность ДНК области, приходящейся на соединение посредством фосфодиэфирной связи одного конца трансгенной вставки с фланкирующей геномной ДНК кукурузы, называется в настоящем документе «соединением». Соединение представляет собой точку связывания трансгенной вставки с фланкирующей ДНК в одну непрерывную молекулу. Одно соединение находится на 5' конце трансгенной вставки, а другое соединение - на 3' конце трансгенной вставки, в настоящем документе они называются 5' и 3' соединениями, соответственно. «Последовательность соединения» относится к последовательности ДНК любой длины, которая охватывает 5' или 3' соединение объекта. Последовательности соединения объекта кукурузы MON87429 будут очевидны специалисту в данной области техники, использующему SEQ ID NO:10. Примеры последовательностей соединения объекта кукурузы MON87429 представлены в виде SEQ ID NO:1-8. На Фиг. 1 проиллюстрировано физическое расположение SEQ ID NO:1-10, расположенных от 5' до 3'. Последовательности соединения объекта кукурузы MON87429 могут присутствовать как часть генома растения, семени или клетки, содержащих объект кукурузы MON87429. Идентификация любой одной или более из SEQ ID NO:1-8 или 10 в образце, полученном от растения, части растения, семени или клетки, указывает на то, что ДНК была получена от кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429, и позволяет диагностировать присутствие объекта кукурузы MON87429.

[0053] Растения, семена, клетки, части растения и товары по изобретению можно использовать для обнаружения ДНК или молекул белка, свидетельствующих о присутствии объекта кукурузы MON87429. Предложены примеры молекул ДНК, которые можно использовать в качестве праймеров или зондов для обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце. Такие праймеры или зонды являются специфичными в отношении последовательности целевой нуклеиновой кислоты и, таким образом, пригодны для идентификации объекта кукурузы MON87429 способами, описанными в настоящем документе. Обнаружение присутствия объекта кукурузы MON87429 может осуществляться способами, известными в данной области техники, такими как термическая амплификация нуклеиновой кислоты или методики гибридизации нуклеиновой кислоты (такие как нозерн-блоттинг и саузерн-блоттинг).

[0054] «Праймер» представляет собой молекулу ДНК, сконструированную для применения в способах отжига или гибридизации, которые предполагают реакцию амплификации. Реакция амплификации - это реакция *in vitro*, которая амплифицирует шаблон ДНК с получением ампликона. Как используется в настоящем документе, «ампликон» представляет собой молекулу ДНК, которую синтезировали с помощью методик амплификации. Ампликоны по изобретению содержат последовательность ДНК,

содержащую одну или более из SEQ ID NO:1-10 или их фрагменты. Пара праймеров может использоваться с шаблоном ДНК, таким как образец геномной ДНК кукурузы, в реакции амплификации, такой как полимеразная цепная реакция (ПЦР), для получения ампликона, причем полученный ампликон будет иметь последовательность ДНК, соответствующую последовательности шаблона ДНК, расположенного между двумя сайтами, где праймеры гибридизировались с шаблоном. Праймер, как правило, сконструирован с возможностью гибридизации с целевой комплементарной цепочкой ДНК для образования гибрида между праймером и целевой цепочкой ДНК. Присутствие праймера является для полимеразы точкой распознавания для начала удлинения праймера, используя в качестве шаблона целевую цепочку ДНК. Пары праймеров относятся к использованию двух праймеров, связывающих противоположные цепочки двухцепочечного нуклеотидного сегмента, с целью амплификации нуклеотидного сегмента между ними. Примеры последовательностей праймеров представлены в виде SEQ ID NO:11 (SQ51062) и SEQ ID NO:12 (SQ51053). Пары праймеров, представленные как SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, используются как первая молекула ДНК и вторая молекула ДНК, причем первая молекула ДНК представляет собой фрагмент последовательности ДНК SEQ ID NO:10 трансгенной вставки, а вторая молекула ДНК представляет собой фрагмент фланкирующей последовательности ДНК SEQ ID NO:10, и обе имеют достаточную длину, чтобы функционировать в качестве праймеров ДНК при использовании вместе в реакции амплификации с ДНК, содержащей объект кукурузы MON87429, для получения ампликона, позволяющего диагностировать объект кукурузы MON87429 в образце. Пары праймеров по настоящему изобретению могут в определенных вариантах осуществления определяться как такие, которые содержат первую и вторую молекулы ДНК, причем первая молекула ДНК представляет собой фрагмент геномной части SEQ ID NO:10 кукурузы, а вторая молекула ДНК представляет собой фрагмент трансгенной части SEQ ID NO:10, и обе имеют достаточную длину, чтобы функционировать в качестве праймеров ДНК при использовании вместе в реакции амплификации с ДНК, содержащей объект кукурузы MON87429, для получения ампликона, позволяющего диагностировать объект кукурузы MON87429 в образце.

[0055] «Зонд» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной по отношению к цепочке целевой нуклеиновой кислоты и используется в способах обнаружения гибридизации. Зонды в соответствии с изобретением включают в себя не только дезоксирибонуклеиновую или рибонуклеиновую кислоты, но также и полиамиды и другие материалы зондов, которые специфически связываются с целевой последовательностью ДНК, и обнаружение такого связывания может быть пригодным при обнаружении присутствия или отсутствия целевой последовательности ДНК. Зонд может быть присоединен к обычной обнаруживаемой метке или репортерной молекуле, такой как радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент. Пример последовательности ДНК, пригодной в качестве зонда для обнаружения объекта кукурузы MON87429, представлен в виде SEQ ID NO:13 (PB50370).

[0056] Способы конструирования и использования праймеров и зондов хорошо

известны в данной области техники. Молекулы ДНК, содержащие полную длину или фрагменты SEQ ID NO:1-10, пригодны в качестве праймеров и зондов для обнаружения объекта кукурузы MON87429 и могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники с помощью последовательностей, предложенных в настоящем документе.

[0057] Зонды и праймеры в соответствии с изобретением могут иметь полную идентичность последовательности с целевой последовательностью, хотя с помощью обычных способов могут быть сконструированы праймеры и зонды, отличающиеся от целевой последовательности, которые сохраняют способность гибридизироваться предпочтительно с целевыми последовательностями. Чтобы молекула нуклеиновой кислоты могла служить в качестве праймера или зонда, ей необходимо быть всего лишь достаточно комплементарной в последовательности, чтобы быть в состоянии образовывать стабильную двухцепочечную структуру при конкретных используемых концентрациях растворителя и соли. Любой обычный способ гибридизации или амплификации нуклеиновой кислоты может использоваться для идентификации присутствия трансгенной ДНК объекта кукурузы MON87429 в образце. Длина зондов и праймеров, как правило, составляет по меньшей мере около 11 нуклеотидов, по меньшей мере около 18 нуклеотидов, по меньшей мере около 24 нуклеотидов или по меньшей мере около 30 нуклеотидов. Такие зонды и праймеры специфически гибридизуются с целевой последовательностью ДНК в жестких условиях гибридизации. Обычные условия жесткости описаны у MR Green and J Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4<sup>th</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012). Как используется в настоящем документе, две молекулы нуклеиновой кислоты способны специфически гибридизироваться друг с другом, если эти две молекулы способны образовывать антипараллельную двухцепочечную структуру нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты является «комплементом» другой молекулы нуклеиновой кислоты, если они демонстрируют полную комплементарность. Как используется в настоящем документе, две молекулы демонстрируют «полную комплементарность», если при выравнивании каждый нуклеотид первой молекулы является комплементарным каждому нуклеотиду второй молекулы. Две молекулы являются «минимально комплементарными», если они могут гибридизироваться друг с другом достаточно стабильно, чтобы позволить им оставаться аннелированными друг с другом по меньшей мере в обычных условиях «низкой жесткости». Аналогично, молекулы являются «комплементарными», если они могут гибридизироваться друг с другом достаточно стабильно, чтобы позволить им оставаться аннелированными друг с другом в обычных условиях «высокой жесткости». Отклонения от полной комплементарности являются, таким образом, допустимыми до тех пор, пока такие отклонения не будут полностью лишать молекулы возможности образовывать двухцепочечную структуру.

[0058] Соответствующие условия жесткости, которые способствуют гибридизации ДНК, например, 6,0 x хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при около 45°C с последующим промыванием в 2,0 x SSC при 50 °C, известны специалистам в данной области техники и

могут быть найдены в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Например, концентрация соли на стадии промывания может быть выбрана в диапазоне от низкой жесткости около 2,0 X SSC при 50°C до высокой жесткости около 0,2 x SSC при 50°C. Кроме того, температуру на стадии промывания можно повышать в диапазоне от условий низкой жесткости при комнатной температуре, около 22°C, до условий высокой жесткости при около 65°C. Можно варьировать оба значения температуры и концентрации соли либо же можно поддерживать постоянным одно из значений: температуру или концентрацию соли, а другое значение изменять.

[0059] Предложены белки, которые можно использовать для получения антител для обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце. Такие антитела являются специфичными в отношении одного или более белков, которые кодируются объектом кукурузы MON87429. Последовательность ДНК, кодирующая такие белки, представлена в виде SEQ ID NO:10, а начальные позиции и конечные позиции кодирующей последовательности указаны в таблице 1. Последовательность ДНК, кодирующая каждый белок, и белок, кодируемый последовательностью, используются для получения антител для обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 способами, описанными в настоящем документе. Обнаружение присутствия объекта кукурузы MON87429 может осуществляться с помощью любых методик обнаружения белка, известных в данной области техники, таких как вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, иммуноферментный анализ (ИФА), присоединение антитела к обнаруживаемой метке или репортерной молекуле (такой как радиоактивный изотоп, лиганд, хемиллюминесцентный агент или фермент) или ферментативная активность на репортерной молекуле. Один способ предполагает приведение в контакт образца с антителом, которое связывается с белком DMO, PAT, FT\_T или CP4-EPSPS, кодируемым объектом кукурузы MON87429, а затем обнаружение присутствия или отсутствия связывания антитела. Связывание такого антитела позволяет диагностировать присутствие одного или более белков, кодируемых объектом кукурузы MON87429.

[0060] Предложены наборы для обнаружения белка и нуклеиновой кислоты с целью выявления присутствия объекта кукурузы MON87429. Вариации таких наборов также могут быть разработаны, используя композиции и способы, описанные в настоящем документе, а также способы, хорошо известные в области обнаружения белков и нуклеиновых кислот. Наборы для обнаружения белка и нуклеиновой кислоты могут применяться в способах скрещивания с растениями, содержащими объект кукурузы MON87429. Такие наборы содержат праймеры или зонды, содержащие фрагменты SEQ ID NO:1-10 или антитела, специфичные в отношении белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429.

[0061] Один пример набора для обнаружения включает в себя по меньшей мере одну молекулу ДНК, имеющую достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO:10, чтобы функционировать в качестве ДНК-зонда, пригодного для обнаружения присутствия или отсутствия объекта кукурузы MON87429 в образце. Примером молекулы ДНК, которую

можно использовать в качестве зонда, является молекула, содержащая последовательность, представленную в виде SEQ ID NO:13. Другие зонды могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники. Другой пример набора для обнаружения включает в себя по меньшей мере одну пару праймеров, используемую для получения ампликона, пригодного для обнаружения присутствия или отсутствия объекта кукурузы MON87429 в образце. Подобный способ может также включать в себя секвенирование ампликона или его фрагмента. Примерами молекул ДНК, которые можно использовать в качестве пары праймеров, являются молекулы, содержащие последовательности, представленные в виде SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. Другие пары праймеров могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники. Наборы по изобретению также могут необязательно содержать реагенты для проведения реакций обнаружения или диагностирования, описанных в настоящем документе. Другой пример набора для обнаружения включает в себя по меньшей мере одно антитело, специфичное в отношении по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429. Например, в таком наборе может использоваться тест-полоска с технологией латеральной диффузии, содержащая реагенты, которые активируются при контакте кончика полоски с водным раствором. Примерами белков, которые могут использоваться для получения антител, являются белки, кодируемые последовательностью, представленной в виде SEQ ID NO:10, или любым ее фрагментом.

[0062] В изобретении предложены растения кукурузы, ее потомство, семена, клетки и части растения, содержащие объект кукурузы MON87429, а также товары, которые производят с их использованием. Растения, потомство, семена, клетки, части растения и товары по изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащей по меньшей мере одну из последовательностей, представленных в виде SEQ ID NO:1-8 и SEQ ID NO:10.

[0063] Растения, потомство, семена, клетки и части растения по изобретению могут также содержать один или более дополнительных трансгенных признаков, в частности, введенных путем скрещивания растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON87429, с другим растением, содержащим дополнительный трансгенный признак(-и). Такие признаки включают в себя без ограничения повышенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность водопользования, повышенную урожайность, повышенную засухоустойчивость, повышенное качество семян, повышенную пищевую ценность, производство гибридных семян и/или повышенную толерантность к гербицидам, при этом признак оценивается по отношению к растению кукурузы, не обладающему подобным трансгенным признаком.

[0064] Растения по изобретению могут использоваться для получения потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429. Как используется в настоящем документе, «потомство» включает в себя любое растение, семя и клетку, содержащие объект кукурузы MON87429, унаследованный от растения-предшественника, на что указывает растение, содержащее молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность,

выбранную из SEQ ID NO:1-8 и SE ID NO:10. Растения, семена и клетки могут быть гомозиготными или гетерозиготными по объекту кукурузы MON87429. Растения потомства могут быть выращены из семян, полученных от растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON87429, или из семян, полученных от растения кукурузы, оплодотворенного пыльцой, содержащей объект кукурузы MON87429.

[0065] Как используется в настоящем документе, «часть растения» по изобретению представляет собой любую часть растения, содержащего объект кукурузы MON87429. Части растения включают в себя без ограничения образцы ткани, пыльцу, семязачаток, стручок, цветок, корни, стебли, волокна и листья целиком или по частям. Части растения могут быть жизнеспособными или нежизнеспособными.

[0066] В изобретении предложен товар, который производят из растений, содержащих объект кукурузы MON87429. Товары по изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащей последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-10. Как используется в настоящем документе, «товар» относится к любой композиции или продукту, которые состоят из материала, полученного из растения, семени, клетки или части растения, содержащих объект кукурузы MON87429. Товары включают в себя без ограничения обработанные семена, зерна, части растения и муку. Товар по изобретению будет содержать обнаруживаемое количество ДНК, соответствующей объекту кукурузы MON87429. Обнаружение одной или более таких ДНК в образце можно использовать для определения состава или источника происхождения товара. Может использоваться любой стандартный способ обнаружения молекул ДНК, включая способы обнаружения, описанные в настоящем документе.

[0067] Объект кукурузы MON87429 содержит четыре экспрессионные кассеты, которые вместе обеспечивают толерантность к ингибиторам ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе; синтетическим ауксином; ингибиторам глутаминсинтетазы и ингибиторам 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS).

[0068] Как используется в настоящем документе, ингибиторы ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе (называемые «ФОП-гербицидами») включают в себя без ограничения клодинафоп, клодинафоп-этил, клодинафоп-пропаргил, цигалофоп, цигалофоп-бутил, диклофоп, диклофоп-метил, диклофоп-Р, диклофоп-Р-метил, феноксапроп, феноксапроп-Р, феноксапроп-Р-этил, фентиапроп, флуазифоп, флуазифоп-бутил, флуазифоп-Р, флуазифоп-Р-бутил, флуороксипир, галоксифоп, галоксифоп-этилол, галоксифоп-метил, галоксифоп-Р, галоксифоп-Р-метил, изоксапирифоп, метамифоп, пропаквизафоп, хизалофоп, хизалофоп-этил, хизалофоп-Р, хизалофоп-Р-этил, хизалофоп-Р-тефурил и трифоп.

[0069] Как используется в настоящем документе, синтетические ауксины включают в себя без ограничения гербициды на основе бензойной кислоты, гербициды на основе феноксикислоты, гербициды на основе арилпиколинатов и гербициды на основе пиридинилокси кислоты. Примеры гербицидов на основе бензойной кислоты включают в

себя без ограничения дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойную кислоту), соли дикамбы, дикамба-бутотил, дигликольаминовую соль дикамбы, дикамба-диметиламмоний, дикамба-диэтанолламмоний, дикамба-изопропиламмоний, дикамба-калий, дикамба-натрий и дикамба-троламин. Примерами гербицидов на основе феноксикислоты является 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), 2,4-D-бутотил, 2,4-D-бутил, 2,4-D-холин, 2,4-D-диметиламмоний, 2,4-D-диоламин, 2,4-D-этил, 2,4-D-2-этилгексил, 2,4-D-изобутил, 2,4-D-изоктил, 2,4-D-изопропил, 2,4-D-изопропиламмоний, 2,4-D-калий, 2,4-D-натрий, 2,4-D-триизопропанолламмоний, 2,4-D-троламин, кломепроп, дихлорпроп, фенопроп, МСРА, МСРА-бутотил, МСРА-диметиламмоний, МСРА-2-этилгексил, МСРА-изопропиламмоний, МСРА-калий, МСРА-натрий, МСРА-тиоэтил, 2,4-DB, МСРВ, МСРВ-метил, МСРВ-этил-натрий и мекопроп. Примерами гербицидов на основе арилпиколинатов является галауксифен, галауксифен-метил и флорпирауксифен-бензил. Примерами гербицидов на основе пиридинилокси кислоты является триклопир, флуороксипир, аминопиралид, клопиралид и пиклорам.

[0070] Как используется в настоящем документе, ингибиторы глутаминсинтетазы включают в себя без ограничения фосфинотрицин, глюфосинат, соли глюфосината, глюфосинат-аммоний, глюфосинат-натрий, глюфосинат-Р, L-глюфосинат-аммоний и L-глюфосинат-натрий.

[0071] Как используется в настоящем документе, ингибиторы 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) включают в себя без ограничения глифосат, соли глифосата, глифосат-изопропиламмоний, глифосат-аммоний, глифосат-диметиламмоний, глифосат-тримезиум (=сульфозат), глифосат-диаммоний, глифосат-калий и глифосат-натрий.

[0072] Как используется в настоящем документе, «толерантный к гербицидам», или «толерантность к гербицидам», или «толерантность» означает способность полностью или частично не поддаваться воздействию присутствия или применения одного или более гербицидов, например, противостоять токсическому эффекту гербицида при его применении. Клетка, семя или растение являются «толерантными к гербициду» или обладают «повышенной толерантностью», если способны сохранять по меньшей мере определенный нормальный рост или фенотип в присутствии одного или более гербицидов. Признак является признаком толерантности к гербициду, если его наличие способно придать повышенную толерантность к гербициду клетке, растению или семени по сравнению с клеткой, растением или семенем дикого типа или контрольной клеткой, растением или семенем. Культуры, имеющие признак толерантности к гербицидам, могут продолжать свой рост в присутствии гербицида, и присутствие гербицида минимальным образом повлияет на такие культуры. Белок будет обеспечивать «толерантность к гербициду», если экспрессия этого белка может придать повышенную толерантность к гербициду клетке, растению или семени по сравнению с клеткой, растением или семенем дикого типа или контрольной клеткой, растением или семенем. Примерами белков толерантности к гербицидам является фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза,

последовательность, кодирующая дикамба-монооксигеназу, белок FT\_T и последовательность, кодирующая толерантную к глифосату 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, от штамма CP4 *Agrobacterium sp.* Толерантность к гербициду может представлять собой полную или частичную невосприимчивость к определенному гербициду и может выражаться в виде процента (%) толерантности или невосприимчивости к определенному гербициду.

[0073] Как используется в настоящем документе, «сорняк» представляет собой любое нежелательное явление. Растение может считаться нежелательным в общем для сельского хозяйства или растениеводства (например, вид *Amaranthus*) или может считаться нежелательным в конкретной ситуации (например, сельскохозяйственная культура одного вида на поле с растениями другого вида, также известная как самосевное растение). Сорняки широко известны в данной области техники и отличаются в зависимости от географической местности, сезона, условий выращивания и времени. Перечни видов сорняков доступны в сельскохозяйственных и научных обществах и инициативах (таких как Американское научное общество по борьбе с сорняками, Канадское научное общество по борьбе с сорняками, Бразильское научное общество по борьбе с сорняками, Международное научное общество по борьбе с сорняками и Международное исследование устойчивых к гербициду сорняков), государственных органах (таких как Министерство сельского хозяйства США и Министерство окружающей среды и энергетики Австралии), а также промышленных и фермерских ассоциациях (таких как Национальная ассоциация кукурузоводов).

[0074] В изобретении предложены способы контроля роста сорняков на участке культивирования кукурузы путем применения по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из (i) ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, таких как хизалофоп и галоксифоп; (ii) синтетических ауксинов, таких как дикамба и 2,4-D; (iii) ингибиторов глутаминсинтетазы, таких как глюфосинат; и (iv) ингибитора 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) глифосата, причем семена или растения, содержащие объект кукурузы MON87429, культивируются на участке до, во время или после применения гербицида, и применение гербицида предотвращает или ингибирует рост сорняков, не нанося вреда растениям кукурузы. Участок выращивания растений может иметь или не иметь сорняков на момент применения гербицида. Гербицид(-ы), используемый в способах по изобретению, может применяться самостоятельно или в комбинации с одним или более гербицидов за урожайный сезон. Гербицид(-ы), используемый в способах по изобретению, может применяться в комбинации с одним или более гербицидов во временном аспекте (например, в виде баковой смеси или путем последовательного применения), в пространственном аспекте (например, в разные моменты времени в течение урожайного сезона, включая время до и после посадки семян кукурузы) или в обоих аспектах. Например, предложен способ контроля роста сорняков, который включает в себя посадку семени, содержащего объект кукурузы MON87429, на участке и применение за урожайный сезон гербицидно

эффективного количества одного или более из дикамбы, глюфосината, глифосата, 2,4-D или ФОП-гербицида самостоятельно или в любой комбинации с другим гербицидом с целью контроля роста сорняков на участке, не нанося вреда растениям, содержащим объект кукурузы MON87429. Подобное применение гербицида(-ов) может происходить перед посадкой (в любое время перед посадкой семени, содержащего объект кукурузы MON87429, включая с целью полного уничтожения, то есть применение к появляющимся или уже растущим сорнякам перед посадкой растений), перед всходом (в любое время после посадки семени, содержащего объект кукурузы MON87429, и перед всходом растений, содержащих объект кукурузы) или после всхода (в любое время после всхода растений, содержащих объект кукурузы MON87429). За урожайный сезон возможно несколько применений одного или более гербицидов или комбинации гербицидов вместе или по отдельности, например, два применения (например, применение перед посадкой и применение после всхода, или применение перед всходом и применение после всхода) или три или более применений (например, применение перед посадкой и два применения после всхода).

[0075] Применение гербицида при осуществлении способов по изобретению может осуществляться с рекомендованной коммерческой нормой внесения либо любой ее части или кратной величине, например, с двойной рекомендованной коммерческой нормой внесения. Нормы внесения гербицида могут быть выражены как кислотный эквивалент на фунт на акр (фунтов кэ/акр) или активный ингредиент на фунт на акр (фунтов аи/акр) в зависимости от гербицида и его состава. Применение гербицида может осуществляться с рекомендованной коммерческой нормой внесения либо любой ее части или кратной величине. Использование акров с нормами внесения гербицида, как предложено в настоящем документе, носит исключительно информативный характер; нормы внесения гербицидов в эквивалентных дозировках к любой из норм внесения, предложенных в настоящем документе, могут быть использованы на участках, больших или меньших по площади, чем акр. Применение гербицидов включает в себя по меньшей мере один гербицид, выбранный из группы, состоящей из (i) ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, таких как хизалофоп и галоксифоп; (ii) синтетических ауксинов, таких как дикамба и 2,4-D; (iii) ингибиторов глутаминсинтетазы, таких как глюфосинат; и (iv) ингибитора 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) глифосата. Участок выращивания растений может иметь или не иметь сорняков на момент применения гербицида. Гербицидно эффективное количество ФОП-гербицидов, которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,01 фунта аи/акр до около 1,0 фунта аи/акр за урожайный сезон (например, хизалофоп может применяться с нормой внесения от около 0,034 фунта аи/акр до около 0,083 фунта аи/акр, а галоксифоп может применяться с нормой внесения от около 0,018 фунта аи/акр до около 0,07 фунта аи/акр). Гербицидно эффективное количество синтетических ауксинов (феноксикислот), которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,1 фунта кэ/акр

до около 10 фунтов кэ/акр за урожайный сезон (например, 2,4-D может применяться с нормой внесения от около 0,75 фунта кэ/акр до около 1,0 фунта кэ/акр). Гербицидно эффективное количество синтетических ауксинов (пиридинилокси кислот), которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,05 фунта кэ/акр до около 5,0 фунтов кэ/акр за урожайный сезон (например, флуороксипир может применяться с нормой внесения от около 0,14 фунта кэ/акр до около 0,49 фунта кэ/акр). Гербицидно эффективное количество синтетических ауксинов (бензойной кислоты), которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,1 фунта кэ/акр вплоть до около 16 фунтов кэ/акр за урожайный сезон (например, дикамба может применяться с нормой внесения от около 0,5 фунта кэ/акр до около 2,0 фунта кэ/акр). Гербицидно эффективное количество ингибиторов глутаминсинтетазы, которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,1 фунта кэ/акр вплоть до около 10 фунтов кэ/акр за урожайный сезон (например, глюфосинат может применяться с нормой внесения от около 0,4 фунта аи/акр до около 1,59 фунта аи/акр). Гербицидно эффективное количество ингибиторов EPSPS, которое используется на участке с целью контроля роста сорняков, должно находиться в диапазоне от около 0,5 фунта кэ/акр до около 12 фунтов кэ/акр за урожайный сезон (например, глифосат может применяться с нормой внесения от около 0,75 фунта кэ/акр до около 2,25 фунта кэ/акр).

[0076] В изобретении предложены способы контроля самосевной кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429, на участке культивирования путем применения гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного циклогександионного (DIM) гербицида, такого как клетодим, сетоксидим и тралкоксидим, причем применение гербицида предотвращает рост кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429. Гербицидно эффективное количество DIM-гербицида, которое используется на участке с целью контроля самосевной кукурузы, должно находиться в диапазоне от около 0,03 фунта аи/акр до около 2,75 фунта аи/акр за урожайный сезон (например, клетодим может применяться с нормой внесения от около 0,0625 фунта аи/акр до около 0,125 фунта аи/акр, а сетоксидим может применяться с нормой внесения от около 0,188 фунта аи/акр до около 0,281 фунта аи/акр).

[0077] Предложены способы получения растений и семян, содержащих объект кукурузы MON87429. Растения могут быть выведены с помощью любого способа, известного в данной области, например, описание способов разведения, которые широко используются, можно найти у WR Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987). Растения могут быть самоопыленными (также называются «самооплодотворенными») или перекрестноопыленными (также называются «скрещенными»). Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, могут самоопыляться с получением чистой линии скрещивания растений, которые являются гомозиготными по объекту кукурузы MON87429. Самооплодотворение приводит к получению потомства, называемого

«инбредным», и может применяться для получения инбредных линий, которые являются генетически одинаковыми. Альтернативно, растения, содержащие объект кукурузы MON87429, могут перекрестно опыляться (скрещиваться с другим растением, которое является трансгенным или нетрансгенным) с получением сортового или гибридного семени. Семена и растения потомства, полученные способами по изобретению, содержат объект кукурузы MON87429. Один или более гербицидов, толерантность к которым обеспечивает объект кукурузы MON87429, может применяться для отбора потомства, которое содержит объект кукурузы MON87429. Альтернативно, потомство может быть проанализировано с помощью диагностических способов для отбора растений или семян, содержащих объект кукурузы MON87429. Потомство может представлять собой сортовые или гибридные растения; может быть выращено из семян, полученных от растения, содержащего объект кукурузы MON87429, или из семян, полученных от растения, оплодотворенного пыльцой растения, содержащего объект кукурузы MON87429; а также может быть гомозиготным или гетерозиготным по объекту кукурузы MON87429.

[0078] Предложены способы получения гибридного семени, используя объект кукурузы MON87429. Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, демонстрируют экспрессию толерантного к глифосату белка CP4-EPSPS во всех тканях, за исключением ткани мужских органов размножения. Это приводит к развитию толерантности к глифосату в вегетативных тканях и тканях женских органов размножения, а также к чувствительности к глифосату в тканях мужских органов размножения. Подобную чувствительность к глифосату можно использовать для индуцирования мужской стерильности путем соответствующего применения глифосата. Глифосат - это гербицид системного действия, который транслоцируется из источника в ткань корневища растений. Исходя из скорости метаболизма глифосата в кукурузе, его применение к растениям, содержащим объект кукурузы MON87429, до момента развития ткани мужских органов размножения может помешать образованию пыльцы, сбрасыванию пыльцы или выбрасыванию пыльников. Такая вызванная глифосатом мужская стерильность может использоваться для повышения эффективности выработки гибридных семян, например, путем исключения или снижения потребности физически «кастрировать» растение кукурузы, используемое в качестве женской особи при заданном скрещивании в процессе получения гибридных семян.

[0079] В изобретении предложен способ получения гибридного семени, включающий в себя (а) выращивание растения, содержащего объект кукурузы MON87429, (b) применение к растению эффективного количества глифосата с целью индуцировать мужскую стерильность, причем применение гербицида происходит до или во время развития тканей мужских органов размножения растения, вызывая, таким образом, у растения мужскую стерильность; (с) оплодотворение растения пыльцой второго растения и (d) сбор гибридных семян с растения. В одном варианте осуществления глифосат применяют до или во время развития в эффективном количестве от около 0,25 фунта кэ/акр до около 11,0 фунтов кэ/акр в совокупности за одно или более применений. В другом варианте осуществления стадия оплодотворения может происходить путем пассивного

оплодотворения (например, опыления ветром) или с помощью других способов, таких как механическое опыление, опыление вручную или их комбинации. Применение гербицида может происходить за один или более раз до или во время развития тканей мужских органов размножения, например, на стадии, выбранной из группы, состоящей из стадий V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 и V14 развития растения кукурузы, и может препятствовать по меньшей мере образованию пыльцы, сбрасыванию пыльцы или выбрасыванию пыльников. Мужская стерильность может быть частичной или полной. В одном варианте осуществления эффективное количество глифосата будет составлять от около 0,5 фунта кэ/акр до около 2,5 фунта кэ/акр в совокупности (за одно применение или разделенное на два или более применений) и применяться на стадиях с V4 по V8 или вплоть до 100 единиц степени роста (growing degree units - GDU) до цветения.

[0080] Растения, потомство, семена, клетки и части растения по изобретению могут также содержать один или более дополнительных признаков кукурузы или трансгенных объектов, в частности, введенных путем скрещивания растения кукурузы, содержащего объект кукурузы MON87429, с другим растением кукурузы, содержащим дополнительные признаки или трансгенные объекты. Такие признаки или трансгенные объекты включают в себя без ограничения повышенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность водопользования, повышенную урожайность, повышенную засухоустойчивость, повышенное качество семян, повышенную пищевую ценность, производство гибридных семян и толерантность к гербицидам, при этом признак оценивается по отношению к растению кукурузы, не обладающему подобным трансгенным признаком. Трансгенные объекты кукурузы известны специалисту в данной области техники; например, перечень таких признаков предлагается Службой инспекции здоровья животных и растений (Animal and Plant Health Inspection Service - APHIS) Министерства сельского хозяйства США (United States Department of Agriculture - USDA), и его можно найти у них на веб-сайте по адресу [www.aphis.usda.gov](http://www.aphis.usda.gov). Таким образом, два или более трансгенных объектов могут быть объединены в растении или семени потомства путем скрещивания двух родительских растений, каждое из которых содержит один или более трансгенных объектов, сбора семян потомства и отбора семян или растений потомства, которые содержат два или более трансгенных объектов; данные стадии затем можно повторять до тех пор, пока не будет получена желаемая комбинация трансгенных объектов в потомстве. Возвратное скрещивание к родительскому растению и ауткроссинг с нетрансгенным растением также предполагаются, как и вегетативное размножение.

[0081] Было сделано депонирование репрезентативного образца семени, содержащего объект кукурузы MON87429, в соответствии с Будапештским договором в Американской коллекции типовых культур (ATCC®) по адресу 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, США, Zip Code 20110. Номер указания патентного депонирования ATCC (номер доступа) для семян, содержащих объект кукурузы MON87429, - РТА-124635, а дата депонирования - 12 января 2018 г. Депонирование будет храниться в депозитории в течение 30 лет, или 5 лет с момента последнего запроса, или в течение срока действия

патента в зависимости от того, что будет дольше.

[0082] Как используется в настоящем документе, термин «содержащий» означает «включающий в себя без ограничения».

#### ПРИМЕРЫ

[0083] Следующие примеры включены с целью более полно описать изобретение. Приводится обобщение создания и тестирования тридцати пяти экспрессионных конструкций, получения свыше пятнадцати тысяч уникальных объектов, а также анализа сотен тысяч отдельных растений за семь лет с помощью строгих молекулярных, агрономических и полевых испытаний, необходимых для создания и конечного отбора объекта кукурузы MON87429.

[0084] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в конкретных раскрытых примерах может быть выполнено множество модификаций, и все же может быть получен аналогичный результат. Некоторые агенты, которые являются как химически, так и физиологически связанными, могут быть замещены агентами, описанными в настоящем документе, в то же время достигая таких же или аналогичных результатов. Все подобные замещения и модификации, очевидные специалистам в данной области техники, считаются находящимися в пределах объема изобретения.

Пример 1. Тестирование экспрессионных кассет, разработка конструкций и тестирование растений R0

[0085] Данный пример описывает разработку и тестирование тридцати пяти различных конструкций в растениях кукурузы. Каждая конструкция содержала четыре экспрессионные кассеты, каждая экспрессионная кассета использовалась для экспрессии разного трансгена. Данное тестирование проводилось с целью отбора наилучшей конструкции для использования с целью экспрессии всех четырех трансгенов в кукурузе. Каждая конструкция обладала уникальной конфигурацией, различаясь по ориентации и экспрессионным элементам экспрессионных кассет.

[0086] Различные отдельные экспрессионные кассеты с разными комбинациями экспрессионных элементов и трансгенами были сконструированы, клонированы в векторы трансформации растений и протестированы на эффективность признаков в растениях кукурузы для создания пула наилучших отдельных экспрессионных кассет. Используя этот пул отдельных экспрессионных кассет, 35 различных конструкций были созданы таким образом, что каждая из них содержала четыре экспрессионные кассеты (каждая экспрессионная кассета содержала трансген для PAT, DMO, CP4-EPSPS или FT) и могла быть использована для тестирования четырехсторонней комбинации различных экспрессионных кассет. Комбинации экспрессионных кассет различались по экспрессионным элементам, кодирующей белок последовательности и ориентации. Это привело к тестированию двух экспрессионных кассет PAT, 6 экспрессионных кассет DMO, 5 экспрессионных кассет FT, 18 экспрессионных кассет CP4-EPSPS.

[0087] 35 конструкций, содержащих четыре экспрессионные кассеты, клонировали в векторы трансформации растений и эти векторы использовали для *Agrobacterium-*

опосредованной трансформации незрелых эмбрионов кукурузы LH244, используя способы, известные в данной области техники, с получением 15 326 уникальных объектов трансформации, каждый из которых получали путем случайного введения трансгенной вставки в геном кукурузы. Растения R0 затем регенерировали из трансгенных клеток и имеющие корни растения с нормальными фенотипическими характеристиками переносили в почву для выращивания и последующей оценки.

[0088] 15 326 растений R0 анализировали на предмет присутствия одной копии трансгенной вставки и отсутствия последовательности векторного остова. Растения с одной копией вставки переходили далее для тестирования эффективности толерантности к гербицидам. Растения R0 с одной копией оценивали в теплице на толерантность к хизалофопу (0,16 фунта аи/акр гербицида Assure II®), а затем к баковой смеси глюфосината (0,98 фунта кэ/акр гербицида Ignite® 280), дикамбы (2,0 фунта кэ/акр гербицида Clarity®) или 2,4-D (2,0 фунта кэ/акр гербицида 2,4-D Amine 4®) (или любой их комбинации), распыляемых на стадии роста V1/V2. Растения, которые были повреждены >30%, отбрасывали.

[0089] Из первоначальных 15 326 уникальных объектов трансформации, полученных с помощью 35 векторов трансформации, 1945 уникальных объектов отобрали после анализа числа копий и данных распыления гербицидов. Данные представлены в таблице 2. Растения R0 для отобранных объектов самоопылялись с получением семени R1 или скрещивались с получением семени F1, которое переходило к полевым испытаниям первого сезона.

**Таблица 2. Эффективность инбредных растений после полевых испытаний первого сезона**

<b>Конструкция</b>	<b>Объекты R0</b>	<b>Объекты, которые прошли дальше</b>
HT4-1	515	39
HT4-2	263	30
HT4-3	158	53
HT4-4	340	79
HT4-5	97	20
HT4-6	121	24
HT4-7	49	10
HT4-8	88	16
HT4-9	853	112
HT4-10	366	55
HT4-11	600	78
HT4-12	729	73

HT4-13	459	63
HT4-14	1026	151
HT4-15	224	44
HT4-16	1877	76
HT4-17	365	39
HT4-18	127	24
HT4-19	94	27
HT4-20	23	4
HT4-21	409	74
HT4-25	123	13
HT4-26	57	3
HT4-27	76	1
HT4-29	118	5
HT4-30	177	24
HT4-31	311	18
HT4-32	913	123
HT4-34	884	124
HT4-36	1364	185
HT4-37	1019	179
HT4-38	1021	129
HT4-39	98	15
HT4-50	250	26
HT4-51	132	9
Всего	15326	1945

Пример 2. Полевые испытания первого сезона

[0090] Полевые испытания проводили в течение многих лет для объектов, которые прошли дальше после анализа R0 по каждой из 35 конструкций, а затем анализировали свойства каждого растения в отношении каждой конструкции в течение первого сезона полевых испытаний в совокупности. Таким образом, каждая конструкция была представлена многими уникальными объектами. Это позволило протестировать большее количество конструкций в полевых испытаниях первого сезона, при этом только конструкции с наилучшими свойствами проходили дальше после испытаний первого сезона. Отдельные полевые испытания первого сезона проводили для растений R2 (гомозиготные по каждому объекту) в отношении (1) эффективности толерантности к глюфосинату+дикамбе, хизалофопу и 2,4-D у инбредных растений, (2) эффективности системы гибридизации Раундап (Roundup Hybridization System - RHS) и (3) испытания

повышением нормы внесения гербицидов на толерантность к более высоким нормам внесения применяемых гербицидов хизалофоп, 2,4-D, глюфосината и дикамбы.

[0091] Проводили скрининг эффективности инбредных растений с целью оценить толерантность к гербицидам глюфосинату+дикамбе, хизалофопу и 2,4-D. Обработка гербицидом включала в себя: применение баковой смеси глюфосината с нормой внесения 0,8 фунта аи/акр и дикамбы с нормой внесения 2,0 фунта кэ/акр; хизалофоп с нормой внесения 0,16 фунта аи/акр или 2,4-D с нормой внесения 2,0 фунта аи/акр. Участки визуально оценивали на повреждение культуры через 10-14 дней после обработки гербицидом по шкале 0-100, где «0» означал отсутствие повреждения культуры, а «100» - полное уничтожение культуры. Также оценивали следующие показатели: высота растения (PHT), высота колоса (EHT), дней до появления 50% нитей шелка (S50D), дней до появления 50% пыльцы (P50D), масса шелухи (SHW), натурная масса (TWT), влагосодержание (MST) и выход зерна (YLD). Все данные подвергались дисперсионному анализу и разделению средних значений при  $p < 0,05$ . Использовали общие средние значения для множества растений, содержащих один и тот же объект, а эффективность инбредных растений обобщали для глюфосината+дикамбы, хизалофоп и 2,4-D как превосходная (4), хорошая (3), удовлетворительная (2), низкая (1) или не применимо (н/п). Данные представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Эффективность инбредных растений после полевых испытаний первого сезона**

Конструкция	Глюфосинат/дикамба	Хизалофоп	2,4-D
HT4-1	4	4	4
HT4-2	4	4	4
HT4-3	4	4	4
HT4-4	4	4	4
HT4-5	4	4	4
HT4-6	4	4	4
HT4-7	4	4	4
HT4-8	4	4	4
HT4-9	4	4	4
HT4-10	4	4	4
HT4-11	4	4	4
HT4-12	4	4	4
HT4-13	4	4	4
HT4-14	4	4	4
HT4-15	4	4	4
HT4-16	4	4	4

HT4-17	4	4	4
HT4-18	4	4	3
HT4-19	4	4	4
HT4-20	4	4	4
HT4-21	4	4	4
HT4-25	4	4	4
HT4-26	н/п	н/п	н/п
HT4-27	н/п	н/п	н/п
HT4-29	4	4	4
HT4-30	4	4	4
HT4-31	4	4	4
HT4-32	4	4	4
HT4-34	4	4	4
HT4-36	4	4	4
HT4-37	4	4	4
HT4-38	4	4	4
HT4-39	4	4	4
HT4-50	4	4	4
HT4-51	4	4	4

[0092] Скрининг эффективности RHS у растений проводили с целью определить различия толерантности к глифосату и вызванной глифосатом стерильности метелки у инбредного материала. Для скрининга использовали однократную обработку гербицидом, которая включала в себя глифосат с нормой внесения 1,5 фунта кэ/акр, применяемого на стадии V2, с последующей нормой внесения 0,75 фунта кэ/акр приблизительно до стадии V8 (875 дней степени роста), а затем приблизительно до стадии V10 (1025 дней степени роста). Участки визуально оценивали на % повреждения культуры (CIPV2, CIPV8, CIPV10 и CIPVT) через 10-14 дней после применения гербицида по шкале от 0 до 100 и проводили конечную оценку повреждений на стадии VT (после появления метелок). Участки также визуально оценивали на % появления нитей шелка [(SES9A (S90) и SES9C (S90 плюс 4 дня) SES9E (S90 плюс 8 дней)] и % выбрасывания пыльников [(AES9A (S90), AES9C (S90 плюс 4 дня) и AES9E (S90 плюс 8 дней)] по аналогичной шкале от 0 до 100, где «0» означает отсутствие появления нитей шелка или выбрасывания пыльников, а «100» - полное появление нитей шелка или выбрасывание пыльников. Оценивали и другие агрономические параметры, как в случае скрининга эффективности инбредных растений. Использовали общие средние значения для множества растений, содержащих один и тот же объект, а оценку толерантности к глифосату, стерильности метелки и выхода обобщали как превосходная (4), хорошая (3), удовлетворительная (2), низкая (1) или не применимо (н/п).

Данные представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Эффективность RHS после полевых испытаний первого сезона**

<b>Конструкция</b>	<b>Толерантность к глифосату</b>	<b>Стерильность метелки</b>	<b>Выход</b>
HT4-1	4	2	н/п
HT4-2	4	2	н/п
HT4-3	2	2	н/п
HT4-4	4	2	н/п
HT4-5	2	2	н/п
HT4-6	2	2	н/п
HT4-7	4	2	н/п
HT4-8	4	2	н/п
HT4-9	2	2	н/п
HT4-10	2	2	н/п
HT4-11	2	2	н/п
HT4-12	4	2	н/п
HT4-13	4	2	н/п
HT4-14	4	4	4
HT4-15	4	2	н/п
HT4-16	3/2	4	1
HT4-17	4	2	н/п
HT4-18	2	2	н/п
HT4-19	1	н/п	н/п
HT4-20	1	н/п	н/п
HT4-21	4	2	н/п
HT4-25	2	2	н/п
HT4-26	н/п	н/п	н/п
HT4-27	н/п	н/п	н/п
HT4-29	1	н/п	н/п
HT4-30	4	2	н/п
HT4-31	2	2	н/п
HT4-32	4	4	4
HT4-34	4	4	4
HT4-36	4	2	н/п

HT4-37	4	2	н/п
HT4-38	4	2	н/п
HT4-39	4	2	н/п
HT4-50	2	2	н/п
HT4-51	2	2	н/п

[0093] Испытание повышением нормы внесения гербицида проводили для оценки толерантности культуры на уровне конструкции к более высоким нормам внесения применяемых гербицидов: хизалофоп, 2,4-D, глюфосинат и дикамбы следующим образом. Обработки хизалофопом включали в себя: 1) хизалофоп с нормой внесения 0,32 фунта аи/акр (4X) плюс 0,25% об./об. неионного поверхностно-активного вещества (NIS), применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 2) хизалофоп с нормой внесения 0,64 фунта аи/акр (8X) плюс 0,25% об./об. NIS, применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; или 3) хизалофоп с нормой внесения 1,28 фунта аи/акр (16X) плюс 0,25% об./об. NIS, применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8. Обработки 2,4-D включали в себя: 1) 2,4-D амин с нормой внесения 2 фунта аи/акр плюс 0,25% об./об. неионного поверхностно-активного вещества (NIS), применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 2) 2,4-D амин с нормой внесения 4 фунта аи/акр плюс 0,25% об./об. NIS, применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 3) 2,4-D амин с нормой внесения 8 фунтов аи/акр плюс 0,25% об./об. NIS, применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; или 4) 2,4-D амин с нормой внесения 16 фунтов аи/акр плюс 0,25% об./об. NIS, применяемые на стадиях VE-V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8. Обработки глюфосинатом включали в себя: 1) глюфосинат с нормой внесения 1,0 фунт аи/акр, применяемый на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 2) глюфосинат с нормой внесения 2,0 фунта аи/акр, применяемый на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 3) глюфосинат с нормой внесения 4,0 фунта аи/акр, применяемый на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; или 4) глюфосинат с нормой внесения 8,0 фунтов аи/акр, применяемый на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8. Обработки дикамбой включали в себя: 1) дикамба с нормой внесения 2,0 фунта, применяемая на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 2) дикамба с нормой внесения 4,0 фунта, применяемая на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 3) дикамба с нормой внесения 8,0 фунтов, применяемая на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8; 4) дикамба с нормой внесения 16 фунтов, применяемая на стадии V2, а затем на стадии V4, а затем на стадии V8. Участки визуально оценивали на повреждение культуры, и получали агрономические параметры, как в случае скрининга эффективности инбредных растений. Использовали общие средние значения для множества растений, содержащих один и тот же объект, а эффективность толерантности к гербицидам обобщали для каждого из четырех гербицидов как превосходная (4), хорошая (3), удовлетворительная (2), низкая (1) или не применимо (н/п). Данные представлены в

таблице 5.

**Таблица 5. Испытание повышением нормы внесения гербицида в рамках полевых испытаний первого сезона**

<b>Конструкция</b>	<b>Глюфосинат</b>	<b>Дикамба</b>	<b>Хизалофоп</b>	<b>2,4-D</b>
HT4-1	4	4	3	3
HT4-2	4	4	4	4
HT4-3	4	4	4	4
HT4-4	4	4	4	4
HT4-5	4	4	4	4
HT4-6	4	4	4	4
HT4-7	4	4	4	4
HT4-8	4	4	4	4
HT4-9	4	4	4	4
HT4-10	4	4	4	4
HT4-11	4	4	4	4
HT4-12	4	4	4	4
HT4-13	4	4	4	4
HT4-14	4	4	4	4
HT4-15	4	4	4	4
HT4-16	4	4	4	4
HT4-17	4	4	4	4
HT4-18	4	4	4	4
HT4-19	4	4	4	4
HT4-20	4	4	4	4
HT4-21	4	4	4	4
HT4-25	4	4	4	4
HT4-26	н/п	н/п	н/п	н/п
HT4-27	н/п	н/п	н/п	н/п
HT4-29	4	4	4	4
HT4-30	4	4	4	4
HT4-31	4	4	4	4
HT4-32	4	4	4	4
HT4-34	4	4	4	4
HT4-36	4	4	4	4

HT4-37	4	4	4	4
HT4-38	4	4	4	4
HT4-39	4	4	4	4
HT4-50	4	4	4	4
HT4-51	4	4	4	4

[0094] Данные по совокупным свойствам растений R2, полученных с каждой из 35 конструкций, компилировали и анализировали в отношении (1) испытания эффективности инбредных растений на толерантность к глюфосинату+дикамбе, хизалофопу и 2,4-D, (2) испытания эффективности RHS на толерантность к глифосату, стерильность метелки и выход, а также (3) испытания повышением нормы внесения гербицидов на толерантность к более высоким нормам внесения применяемых гербицидов хизалофопы, 2,4-D, глюфосината и дикамбы. Используя эти данные, из 35 протестированных конструкций отобрали 3 конструкции (HT4-14, HT4-32 и HT4-34) для дальнейшего исследования. Объекты для этих 3 конструкций затем переходили к полевым испытаниям второго сезона.

#### Пример 3. Молекулярный анализ

[0095] Молекулярный анализ проводили одновременно с полевыми испытаниями для объектов, которые прошли дальше. Амплификацию и секвенирование ДНК использовали для подтверждения последовательности вставки, числа копий вставки и отсутствия остова во вставке. В геноме кукурузы картировали сайт вставки для каждого объекта. Анализ методом нозерн-блоттинга проводили для обнаружения и измерения транскриптов мРНК генов *pat*, *dmo*, *ft\_t* и *cp4-epsps*. N-концевое секвенирование белков PAT, DMO, FT\_T и CP4-EPSPS, очищенных из трансгенных растений, проводили для подтверждения последовательности рекомбинантного белка. Анализ методом вестерн-блоттинга с целью обнаружения белков PAT, DMO, FT\_T и CP4-EPSPS проводили для образцов трансгенных растений. Углубленный анализ методом саузерн-блоттинга проводили для геномной ДНК, полученной от растений R1, с целью подтверждения числа копий и отсутствия остова.

#### Пример 4. Последующие полевые испытания

[0096] Последующие полевые испытания (полевые испытания второго сезона и последующих сезонов) проводили в течение многих лет для объектов, которые прошли дальше после полевых испытаний первого сезона конструкций HT4-14, HT4-32 и HT4-34. Свойства многих отдельных растений по каждому объекту в каждом полевом испытании анализировали в совокупности. Таким образом, каждый объект был представлен многими уникальными растениями. Это позволило проанализировать свойства каждого объекта во многих условиях, в различных локациях и географических местностях, а также в отношении различных характеристик.

[0097] Полевые испытания проводили для инбредных растений (гомозиготных по объекту) и гибридных растений (гемизиготных по объекту) с целью оценить (1) эффективность признаков толерантности к коммерческим нормам внесения глюфосината,

дикамбы, хизалофоп и 2,4-D, (2) агрономические свойства, (3) эффективность системы гибридизации Раундап (RHS) на толерантность к глифосату, а также (4) испытание повышением нормы внесения гербицидов на толерантность к более высоким нормам внесения применяемых гербицидов хизалофоп, 2,4-D, глюфосината и дикамбы.

[0098] В ходе полевых испытаний 1 сезона 30 объектов протестировали для конструкции НТ4-14, 41 объект протестировали для конструкции НТ4-32, а 21 объект протестировали для конструкции НТ4-34. Используя сводные данные этих испытаний, были отобраны объекты для дальнейшего исследования. В ходе полевых испытаний 2 сезона 15 объектов протестировали для конструкции НТ4-14, 38 объектов протестировали для конструкции НТ4-32, а 38 объектов протестировали для конструкции НТ4-34 (эта цифра включала в себя некоторые объекты, которые не были протестированы в рамках полевых испытаний 1 сезона из-за нехватки семян в этом сезоне). Объекты для конструкции НТ4-14 были охарактеризованы с помощью молекулярного анализа, как описано в примере 3, и эти данные также использовали для отбора объектов. Сводные данные этих испытаний и углубленную молекулярную характеристику объектов для конструкции НТ4-14 использовали для отбора 3 объектов для дальнейшего исследования для конструкции НТ4-14. Сводные данные этих испытаний использовали для отбора 24 объектов для дальнейшего исследования для конструкции НТ4-32, а также для принятия решения о прекращении дальнейших испытаний для любых объектов для конструкции НТ4-34. В ходе полевых испытаний 3 сезона протестировали 3 объекта для конструкции НТ4-14 и 24 объекта для конструкции НТ4-34. Сводные данные этих испытаний использовали для отбора 2 объектов для дальнейшего исследования для конструкции НТ4-14, а также для принятия решения о прекращении дальнейших испытаний для любых объектов для конструкции НТ4-32. Полевые испытания 4 сезона использовали для сравнения конечных двух объектов в большом количестве локаций, при различных условиях, а также в гибридной и инбредной идиоплазме, чтобы получить данные, необходимые для отбора лучшего объекта. В таблице 6 представлено количество уникальных объектов, протестированных для каждой конструкции в ходе полевых испытаний, которые проводились в каждом сезоне.

**Таблица 6. Резюме последующих полевых испытаний**

Этап	НТ4-14	НТ4-32	НТ4-34
Полевой сезон 1	30	41	21
Полевой сезон 2	15	38	38
Полевой сезон 3	3	24	0
Полевой сезон 4	2	0	0
Отбор окончательных объектов	1	0	0

[0099] Полевые испытания агрономических свойств проводились в тот же сезон, что и полевые испытания эффективности признака. Во всех полевых испытаниях использовался полностью рандомизированный блочный дизайн, и они проводились в

различных локациях. Полевые испытания проводились в локациях Северной Америки и Южной Америки. Как для полевых испытаний эффективности, так и для полевых испытаний агрономических свойств в течение всего сезона полевых испытаний ставили агрономическую оценку, а в конце сезона определяли выход (эффективный выход или агрономический выход). Полевые испытания эффективности проводили для оценки повреждения культуры в течение 10-14 дней после применения гербицида. Целевой оценкой повреждения культуры для дальнейшего исследования объекта был показатель менее 10%. Для полевых испытаний агрономических свойств участки сохраняли свободными от сорняков, и ни один из испытуемых гербицидов не применяли за урожайный сезон. Полевые испытания агрономических свойств гибридных растений включали в себя контроли в виде сопоставимого гибридного растения (гибридный контроль), полученного с помощью таких же родительских линий кукурузы, которые использовались для получения трансгенного гибридного скрещивания, однако не содержащего трансгенный объект. Инбредные контроли представляли собой сопоставимые с трансгенными инбредными линиями инбредные растения.

[00100] Для сравнения данных полевых испытаний проводили метаанализ, используя совокупность данных полевых испытаний всех растений за несколько сезонов, в нескольких локациях. В качестве примера, в таблице 7 проиллюстрировано число репликаций за несколько сезонов, для которых повторяли наблюдение по двум отобраным объектам НТ4-14, а также общее число отдельных растений, протестированных в рамках каждого испытания для каждого объекта.

**Таблица 7. Репликации полевых испытаний**

<b>Этап</b>	<b>Объект</b>	<b>Всего репликаций</b>	<b>Всего растений</b>
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	235	16 450
Полевой сезон 1	MON87429	235	16 450
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	100	7 000
Полевой сезон 2	MON87429	100	7 000
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	529	37 030
Полевой сезон 3	MON87429	513	35 910
Полевой сезон 4	ОБЪЕКТ 2	228	15 960
Полевой сезон 4	MON87429	228	15 960
Полевой сезон 4	ОБЪЕКТ 2	56	3 920
Полевой сезон 4	MON87429	2465	172 550

[00101] Метаанализ нескольких полевых испытаний эффективности гибридных растений проводили для сравнения показателей повреждения гибридных растений. В качестве примера, в таблице 8 представлена оценка повреждения за несколько сезонов по двум отобраным объектам НТ4-14, полученная на стадии V8 (при этом анализ на стадии

V8 охватывает совокупное повреждение после применения гербицида на стадиях V2, V4, V6 и V8), причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, как и растения, содержащие объект 2, хорошо проявили себя в ходе этих испытаний.

**Таблица 8. Метаанализ оценки повреждения в полевых испытаниях эффективности гибридных растений**

Этап	Объект	Повреждения V8	НЗР ( $P < 0,05$ )
Полевой сезон 1	MON87429	1,3	2,1
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	1,1	2,1
Полевой сезон 2	MON87429	1,7	3,1
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	2,6	3,1
Полевой сезон 3	MON87429	0,08	3,4
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	0,13	3,4

[00102] Метаанализ нескольких полевых испытаний эффективности гибридных растений выполнили для сравнения выхода в виде бушелей/акр. В качестве примера, в таблице 9 представлен выход для гибридных растений за несколько сезонов по двум отобраным объектам НТ4-14, причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, как и растения, содержащие объект 2, хорошо проявили себя в ходе этих испытаний.

**Таблица 9. Метаанализ выхода в полевых испытаниях эффективности гибридных растений**

Этап	Объект	Выход (бушелей/акр)	НЗР ( $p < 0,05$ )
Полевой сезон 1	MON87429	222	12
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	222	12
Полевой сезон 2	MON87429	197	15,4
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	197	15,4
Полевой сезон 3	MON87429	210,9	9,1
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	211,5	9,1

[00103] Полевые испытания повышением нормы внесения гербицидов, применяемых в более высоких по сравнению с коммерческими нормами внесения, проводили для гибридных и инбредных растений, содержащих один трансгенный объект. Гербициды глюфосинат (в диапазоне от 1,6 до 6,4 фунтов аи/акр), дикамба (в диапазоне от 2,0 до 16 фунтов аи/акр), хизалофоп (в диапазоне от 0,32 до 1,28 фунта аи/акр), 2,4-D (в диапазоне от 2,0 до 8,0 фунтов аи/акр) и глифосат (с нормой внесения 3,0 фунта кз/акр) применяли в ходе полевых испытаний для тестирования повышением нормы внесения

эффективности признака толерантности к гербицидам. В конце сезона гибридные растения полевых испытаний повышением нормы внесения гербицидов собирали и определяли выход (бушелей/акр). В качестве примера, в таблице 10 представлены данные по выходу гибридных и инбредных растений в разных испытаниях для двух отобранных объектов НТ4-14, причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, как и растения, содержащие объект 2, хорошо проявили себя в ходе испытаний выхода гибридных и инбредных растений для всех обработок гербицидами. Результаты свидетельствуют о том, что дальнейшие полевые испытания позволили определить преимущество объекта кукурузы MON87429 перед объектом 2 с точки зрения выхода инбредных растений.

**Таблица 10. Выход в ходе полевых испытаний эффективности повышением нормы внесения гербицидов для гибридных/инбредных растений**

Гербицид	Растение	Объект	Выход (бушелей/акр)	НЗР ( $p < 0,05$ )
Глюфосинат	Гибридное растение	MON87429	256	28,4
Глюфосинат	Гибридное растение	ОБЪЕКТ 2	240	28,4
Дикамба	Гибридное растение	MON87429	264	39,2
Дикамба	Гибридное растение	ОБЪЕКТ 2	256	39,2
Хизалофоп	Гибридное растение	MON87429	251	48,5
Хизалофоп	Гибридное растение	ОБЪЕКТ 2	257	48,5
2,4-D	Гибридное растение	MON87429	261	38,4
2,4-D	Гибридное растение	ОБЪЕКТ 2	254	38,4
Глифосат	Инбредное растение	MON87429	90,1	46
Глифосат	Инбредное растение	ОБЪЕКТ 2	67,2	46

[00104] Проводили полевые испытания агрономических свойств гибридных

растений, выполняли агрономические измерения в течение сезона и в конце сезона определяли агрономический выход. Метаанализ среди полевых испытаний агрономических свойств гибридных растений за несколько сезонов и в нескольких локациях использовали с целью сравнения выхода гибридного контроля и гибридных растений. В качестве примера, в таблице 11 представлены данные по выходу (бушелей/акр) для двух отобранных объектов НТ4-14, причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Растения, содержащие объект кукурузы MON87429, как и растения, содержащие объект 2, хорошо проявили себя в ходе этих испытаний, статистическая разница по выходу гибридных растений не была обнаружена для растений, содержащих любой из этих объектов, при сравнении с контрольными растениями.

**Таблица 11. Метаанализ выхода в полевых испытаниях агрономических свойств гибридных растений**

Этап	Объект	Выход (бушелей/акр)	НЗР ( $p < 0,05$ )
Полевой сезон 1	Контроль - отсутствует	222	9
Полевой сезон 1	MON87429	220	9
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	224	9
Полевой сезон 2	Контроль - отсутствует	224,6	13,7
Полевой сезон 2	MON87429	211	13,7
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	215	13,7
Полевой сезон 3	Контроль - отсутствует	213,6	9,7
Полевой сезон 3	MON87429	213,3	9,7
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	212,4	9,7

[00105] Полевые испытания эффективности инбредных растений проводили в отношении толерантности к глифосату и системы гибридизации Раундап (RHS) и в конце сезона определяли выход. Глифосат применяли с нормой внесения 1,5 фунта кэ/акр для контроля роста сорняков с последующими двумя применениями глифосата для достижения стерильности с нормой внесения 0,75 фунта кэ/акр приблизительно на стадии V8, а затем с нормой внесения 0,75 фунта кэ/акр приблизительно на стадии V10. Метаанализ среди полевых испытаний эффективности инбредных растений за несколько сезонов и в нескольких локациях использовали с целью сравнения выхода для растений. В качестве примера, в таблице 12 представлены данные по выходу (бушелей/акр) для двух отобранных объектов НТ4-14, причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Испытания полевого сезона 2 и полевого сезона 3 показали статистически значимое снижение выхода для растений, содержащих объект 2, по сравнению с растениями, содержащими объект MON87429. Эти данные указывают на лучший результат испытаний эффективности выхода инбредных растений, содержащих объект кукурузы MON87429.

**Таблица 12. Метаанализ выхода в полевых испытаниях эффективности инбредных растений, обработанных глифосатом**

Этап	Объект	Выход (бушелей/акр)	НЗР ( $p < 0,05$ )
Полевой сезон 1	MON8742 9	89,9	14,3
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	87,5	14,3
Полевой сезон 2	MON8742 9	119,6	18,0
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	99,0	18,0
Полевой сезон 3	MON8742 9	105,6	10,5
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	90,13	10,5

[00106] Проводили полевые испытания агрономических свойств инбредных растений и в конце сезона определяли выход для необработанных растений. Испытания включали в себя контроли инбредных линий, сопоставимые с трансгенными инбредными линиями. Метаанализ среди полевых испытаний агрономических свойств инбредных растений за несколько сезонов и в нескольких локациях проводили с целью сравнения выхода для спареного контроля и трансгенных инбредных растений. В качестве примера, в таблице 13 представлены данные по выходу (бушелей/акр) для двух отобранных объектов НТ4-14, причем статистически наименьшая значимая разница наблюдается при 95% доверительном уровне (НЗР при  $p < 0,05$ ). Статистической разницы по инбредному агрономическому выходу между контрольными растениями и растениями, содержащими объект кукурузы MON87429, обнаружено не было. Напротив, в испытаниях полевого сезона 3 наблюдалось статистически значимое снижение выхода для растений, содержащих объект 2, по сравнению с контрольными растениями и растениями, содержащими объект кукурузы MON87429. Эти данные указывают на лучший результат в испытаниях агрономического инбредного выхода для растений, содержащих объект кукурузы MON87429.

**Таблица 13. Метаанализ выхода в полевых испытаниях агрономических свойств инбредных растений**

Этап	Объект	Всего (бушелей/акр)	НЗР ( $p < 0,05$ )
Полевой сезон 1	Контроль - отсутствует	105,2	8,9

Полевой сезон 1	MON87429	104,1	8,9
Полевой сезон 1	ОБЪЕКТ 2	102,5	8,9
Полевой сезон 2	Контроль - отсутствует	103,7	15,3
Полевой сезон 2	MON87429	93,4	15,3
Полевой сезон 2	ОБЪЕКТ 2	91,4	15,3
Полевой сезон 3	Контроль - отсутствует	116,6	6,2
Полевой сезон 3	MON87429	112,8	6,2
Полевой сезон 3	ОБЪЕКТ 2	106,1	6,2

[00107] Испытания эффективности гибридных растений проводили в четырех локациях в Аргентине для оценки толерантности растений к глюфосинату, дикамбе, хизалофопу, галоксифопу, 2,4-D и глифосату. Растения, содержащие MON87429, скрещивали с растениями, содержащими как объект кукурузы MON88017, так и объект кукурузы MON89034, с получением потомства, содержащего все три объекта (MON87429 x MON88017 x MON89034). Обработки гербицидами включали в себя: 1) необработанный контроль; 2) глюфосинат с нормой внесения 0,448 кг аи/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 3) глюфосинат с нормой внесения 0,896 кг аи/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 4) дикамбу с нормой внесения 0,56 фунта кэ/акр, применяемую на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 5) дикамбу с нормой внесения 1,12 фунта кэ/акр, применяемую на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 6) хизалофоп с нормой внесения 0,09 кг кэ/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 7) хизалофоп с нормой внесения 0,18 кг кэ/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 8) галоксифоп с нормой внесения 0,1 кг кэ/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 9) галоксифоп с нормой внесения 0,2 кг кэ/га, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 10) 2,4-D с нормой внесения 1,12 фунта аи/акр, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; 11) 2,4-D с нормой внесения 2,24 фунта кэ/акр, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6; или 12) глифосат с нормой внесения 2,24 фунта кэ/акр, применяемый на стадии V2, а затем с аналогичной нормой внесения на стадии V6. Полученные данные включали в себя повреждение культуры через 10-14 дней после применения гербицида на стадиях V2 и V6, а также конечную оценку на стадии VT, количество дней до появления 50% пыльцы, количество дней до появления 50% нитей шелка, высоту растения, высоту колоса, массу шелухи, натурную массу, влагосодержание и выход зерна. Все данные подвергались дисперсионному анализу и разделению средних значений при  $p < 0,05$ .

[00108] Толерантность к гербицидам растений, содержащих MON87429 x MON88017 x MON89034, была превосходной (<10% повреждения культуры) по всем нормам внесения протестированных глифосата, глюфосината, дикамбы, хизалофопа, галоксиопа и 2,4-D. Нормы внесения гербицидов для обработки растений не повлияли на визуальную оценку повреждения культуры. Высота колоса при любой из обработок существенно не отличалась по сравнению со стандартной обработкой гербицидом 12 (глифосат с нормой внесения 2,24 фунта кэ/акр). Не наблюдалось значительного уменьшения высоты растений или натурной массы, повышения влажности зерна, задержки созревания (измеряемого как увеличение количества дней до появления 50% пыльцы или нитей шелка), снижения выхода зерна у растений, содержащих MON87429 x MON88017 x MON89034, при любой из обработок по сравнению с необработанными растениями. Гибридные растения, полученные путем скрещивания растения, содержащего MON87429, с растением, содержащим объект, обеспечивающий толерантность к глифосату в мужских тканях (такой как коммерчески доступные объекты кукурузы MON88017 или NK603), обладают превосходной вегетативной толерантностью к глифосату, глюфосинату, дикамбе, хизалофопу, галоксифопу и 2,4-D при применении с коммерчески заявленными нормами внесения.

[00109] В течение трех лет полевых испытаний проводили исследование контроля растений, содержащих объект кукурузы MON87429, используя клетодим. В этих испытаниях оценивались способы контроля самопроизвольного роста гербицидом DIM, применяемые к растениям, содержащим объект кукурузы MON87429. Растения обрабатывали клетодимом с коммерчески заявленными нормами внесения и наблюдали полный контроль растений, содержащих объект кукурузы MON87429.

[00110] Данные, полученные в результате молекулярного анализа и полевых испытаний инбредных и гибридных растений для оценки (1) эффективности признаков толерантности к коммерческим нормам внесения глюфосината, дикамбы, хизалофопа и 2,4-D, (2) агрономических свойств, (3) эффективности системы гибридизации Раундап (RHS) и толерантности к глифосату, а также (4) испытания повышением нормы внесения гербицидов на толерантность к более высоким нормам внесения применяемых гербицидов хизалофопа, 2,4-D, глюфосината и дикамбы, анализировали по всем объектам, протестированным для конструкций HT4-14, HT4-32 и HT4-34. Анализ совокупных данных продемонстрировал в целом лучшие показатели объекта кукурузы MON87429 по сравнению с другими объектами и привел к отбору этого объекта для коммерческого использования.

#### Пример 5. Молекулярная характеристика объекта кукурузы MON87429

[00111] Объект кукурузы MON87429 подвергали обширной молекулярной характеристике после отбора для коммерческого использования. Трансгенная вставка объекта кукурузы MON87429 содержит элементы и последовательности, описанные в таблице 1.

[00112] Проводили анализ последовательностей ДНК объекта кукурузы MON87429.

Проводили анализ методом саузерн-блоттинга для подтверждения, что растения, содержащие объект кукурузы MON87429, содержали одну неповрежденную копию всей трансгенной вставки без остова вектора трансформации. Фланкирующую ДНК секвенировали на 5' и 3' концах вставки, а соответствующие соединения определяли с помощью методик захвата последовательности, обогащения, секвенирования, обратной ПЦР и прогулки по геному. Последовательности фланкирующей ДНК для объекта кукурузы MON87429 сопоставляли с известной физической сборкой генома кукурузы. Информацию о последовательности сайта вставки использовали для биоинформационного анализа хромосомной локации объекта. Целостность сайта вставки определяли с помощью ПЦР среди аллеля дикого типа, используя праймеры, специфичные в отношении фланкирующих областей объекта кукурузы MON87429. Сайт вставки дикого типа использовали для сопоставления уникального сайта трансгенного интегрирования для объекта кукурузы MON87429 с эталонным геномом кукурузы. Чтобы гарантировать отсутствие внесения каких-либо изменений или мутаций в любую из областей трансгена в ходе трансформации, всю трансгенную вставку объекта кукурузы MON87429 выделяли из растения и секвенировали. Информация о последовательности для 5' соединения, 3' соединения и трансгенной вставки представлена в настоящем документе в виде SEQ ID NO:1-10.

[00113] Проводили РНК-анализ растений, содержащих конструкцию объекта кукурузы MON87429. Анализ методом нозерн-блоттинга проводили для общей РНК, выделенной из зерен растений, содержащих объект кукурузы MON87429. Он подтвердил размер транскрипта и количество продуктов мРНК *pat*, *dmo*, *ft\_t* и *cp4-epsps*. Уровни экспрессии РНК для CP4-EPSPS также измеряли с помощью ПЦР в режиме реального времени, используя образцы, полученные из ткани растений, содержащих объект кукурузы MON87429. Быструю амплификацию концов кДНК (RACE) использовали для идентификации продуктов расщепления CP4-EPSPS с целью подтвердить, что расщепление транскрипта CP4-EPSPS происходит только в метелках растений, содержащих объект кукурузы MON87429, и что это вызвано мужскими эндогенными малыми интерферирующими РНК (миРНК) специфичным к последовательности образом. Низкомолекулярный анализ методом нозерн-блоттинга проводили с целью продемонстрировать, что миРНК CP4-EPSPS, которые могут снизить толерантность к глифосату в ткани, отличной от ткани метелки, отсутствуют.

[00114] Проводили белковый анализ растений, содержащих конструкцию объекта кукурузы MON87429. Используя очищенные иммуноаффинным методом белковые экстракты из зерен, выполняли N-концевое секвенирование экспрессируемых белков PAT, DMO, FT\_T и CP4-EPSPS, чтобы подтвердить подлинную N-концевую аминокислотную последовательность. Анализ методом вестерн-блоттинга выполняли для белковых экстрактов из зерен, содержащих объект кукурузы MON87429, с целью подтвердить, что один белок ожидаемого размера вырабатывается для PAT, DMO, FT\_T и CP4-EPSPS, соответственно. ИФА использовали, чтобы определить содержание белков PAT, DMO, FT\_T

и CP4-EPSPS в листьях, семенах, корнях и пыльце растений.

Пример 6. Обнаружение объекта кукурузы MON87429

[00115] Обнаружение объекта кукурузы MON87429 в образце можно выполнить с помощью методик обнаружения ДНК, РНК или белков. Примеры способов обнаружения и материалы представлены ниже. Благодаря способам обнаружения можно установить присутствие или отсутствие объекта кукурузы MON87429 в образце. Обнаружение может указать на число геномных копий объекта кукурузы MON87429 (то есть гемизиготность, гомозиготность или гетерозиготность) в образце геномной ДНК.

[00116] Был разработан специфичный в отношении объекта способ термической амплификации по конечной точке Applied Biosystems™ TAQMAN® (Thermo Fisher Scientific) для идентификации объекта кукурузы MON87429 в образце. ДНК-праймеры и зонды, используемые в анализе по конечной точке, представляют собой праймеры SQ51062 (SEQ ID NO:11), SQ51053 (SEQ ID NO:12) и меченный зонд PB50370 6-FAM™ (SEQ ID NO:13). 6-FAM представляет собой флуоресцентный краситель производства Applied Biosystems (Foster City, CA), прикрепленный к ДНК-зонду. В случае зондов TAQMAN MGB™ 5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы *Taq* расщепляет зонд с 5'-конца между флуорофором и гасителем. При гибридизации с целевой цепочкой ДНК гаситель и флуорофор достаточно разделены, чтобы сгенерировать флуоресцентный сигнал, высвобождая, таким образом, флуоресценцию. SQ51062 и SQ51053 при использовании в подобных реакционных способах и вместе с PB50370 вырабатывают ампликон ДНК, который позволяет диагностировать объект кукурузы MON87429. Контроли в этом анализе должны включать в себя положительный контроль, содержащий объект кукурузы MON87429, отрицательный контроль, полученный от нетрансгенной кукурузы, и отрицательный контроль, который не содержит шаблона ДНК. Кроме того, контроль в реакции ПЦР оптимально должен включать в себя праймеры внутреннего контроля и зонд внутреннего контроля, специфичные в отношении гена с одной копией в геноме кукурузы. Эти анализы оптимизированы для использования с ПЦР-системой Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) на максимальной скорости, однако может использоваться и другое оборудование.

[00117] Пример условий, используемых в способах TAQMAN для обнаружения объекта кукурузы MON87429, является следующим. Этап 1. Вода 18 МОм, скорректированная относительно конечного объема 5 мкл. Этап 2. 2,28 мкл 2X универсального мастер-микса (дНТФ, фермент, буфер) до 1X конечной концентрации. Этап 3. 0,05 мкл объектового праймера-1 (SQ51062) и объектового праймера-2 (SQ51053) (ресуспендированных в воде 18 МОм до концентрации 100 мкМ для каждого праймера) до конечной концентрации 0,9 мкМ. Этап 4. 0,01 мкл объектового зонда PB50370 6-FAM MGB (ресуспендированного в воде 18 МОм до концентрации 100 мкМ) до конечной концентрации 0,2 мкМ. Этап 5. 0,05 мкл смеси праймера-1 внутреннего контроля и праймера-2 внутреннего контроля (ресуспендированных в воде 18 МОм до концентрации 100 мкМ для каждого праймера) до конечной концентрации 0,9 мкМ. Этап 6. 0,01 мкл зонда

внутреннего контроля VIC™ (ресуспендированного в воде 18 МОм до концентрации 100 мМ) до конечной концентрации 0,2 мкМ. Этап 7. 2,5 мкл экстрагированной ДНК (шаблон) для каждого образца с одним из следующего: (а) образцы листьев, которые подлежат анализу; (b) отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК); (с) отрицательный контрольный образец воды (без шаблона) и (d) положительный контрольный образец ДНК кукурузы, содержащей объект кукурузы MON87429. Этап 8. Условия в термоциклере: один цикл при 95°C в течение 20 секунд; сорок циклов при 95°C в течение 3 секунд, затем при 60°C в течение 20 секунд и последний цикл при 10°C.

[00118] Анализ на зиготность разработан, чтобы определить, является ли растение, содержащее объект кукурузы MON87429, гетерозиготным или гомозиготным по объекту или аллелю дикого типа. Используя информацию о последовательности, представленную в настоящем документе, может быть разработан анализ реакции амплификации. Например, подобный ПЦР-анализ будет включать в себя дизайн из по меньшей мере трех праймеров: праймера-1, праймера-2 и праймера-3, где праймер-1 является специфичным по отношению к геномной ДНК кукурузы на 3' фланге объекта кукурузы MON87429; праймер-2 является специфичным по отношению к трансгенной вставке объекта кукурузы MON87429; а праймер-3 является специфичным по отношению к аллелю дикого типа. При использовании в виде пары праймеров в реакции амплификации праймер-1 и праймер-2 вырабатывают ПЦР-ампикон, специфичный в отношении объекта кукурузы MON87429. При использовании в виде пары праймеров в реакции амплификации праймер-1 и праймер-3 вырабатывают ПЦР-ампикон, специфичный в отношении аллеля дикого типа. В ПЦР-реакции, выполненной на геномной ДНК кукурузы, соответствующие ПЦР-ампиконы, полученные из праймера-1 и праймера-2, а также из праймера-1 и праймера-3, будут отличаться по последовательности и размеру ампликона. Когда три праймера включены в ПЦР-реакцию с ДНК, экстрагированной из растения, гомозиготного по объекту кукурузы MON87429, будет получен только ампикон праймера-1 и праймера-2 (специфичный в отношении вставки кукурузы MON87429). Когда три праймера включены в ПЦР-реакцию с ДНК, экстрагированной из растения, гетерозиготного по объекту кукурузы MON87429, будет получен как ампикон праймера-1 и праймера-2 (специфичный в отношении вставки кукурузы MON87429), так и ампикон праймера-1 и праймера-3 (специфичный в отношении аллеля дикого типа или отсутствия вставки кукурузы MON87429). Когда три праймера смешиваются вместе в ПЦР-реакции с ДНК, экстрагированной из растения, нулевого по объекту кукурузы MON87429 (то есть дикого типа), будет получен только ампикон праймера-1 и праймера-3 (специфичный в отношении аллеля дикого типа). Ампиконы, полученные с помощью ПЦР-реакции, могут быть идентифицированы или определены любым способом, известным в данной области техники.

[00119] Еще одним анализом на зиготность по объекту кукурузы MON87429 является тепловая реакция амплификации TAQMAN. В случае данного типа помимо праймеров, как было описано выше, анализ будет включать два флуоресцентно меченных зонда. Зонд-1 будет специфичным в отношении объекта кукурузы MON87429, а зонд-2 -

специфичным в отношении растения кукурузы, которое является нулевым по объекту кукурузы MON87429 (дикого типа), и при этом два зонда содержат разные флуоресцентные метки, например, 6-FAM-метку или VIC™-метку. При использовании в реакции TAQMAN праймер-1+праймер-2+зонд-1 сгенерируют первый флуоресцентный сигнал, специфичный в отношении объекта кукурузы MON87429, праймер-1+праймер-3+зонд-2 сгенерируют второй флуоресцентный сигнал, специфичный в отношении кукурузы дикого типа. Когда три праймера и два зонда включены в реакцию TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, гомозиготного по объекту кукурузы MON87429, будет сгенерирован только первый флуоресцентный сигнал (специфичный в отношении праймера-1+праймера-2+зонда-1). Когда три праймера включены в реакцию TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, гетерозиготного по объекту кукурузы MON87429, будет сгенерирован как первый флуоресцентный сигнал (специфичный в отношении праймера-1+праймера-2+зонда-1), так и второй флуоресцентный сигнал (специфичный в отношении праймера-1+праймера-3+зонда-2). Когда три праймера смешиваются вместе в реакции TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, нулевого по объекту кукурузы MON87429 (дикого типа), будет сгенерирован только второй флуоресцентный сигнал (специфичный в отношении праймера-1+праймера-3+зонда-2).

[00120] Другим способом обнаружения присутствия объекта кукурузы MON87429 в образце растения является анализ методом саузерн-блоттинга. Специалисту в данной области техники будет понятно, как сконструировать зонд(-ы) для гибридизации методом саузерн-блоттинга, специфичный в отношении объекта кукурузы MON87429, и второй зонд для гибридизации методом саузерн-блоттинга, специфичный в отношении растения кукурузы, нулевого по объекту кукурузы MON87429 (дикого типа). В ходе анализа методом саузерн-блоттинга сигнал, обнаруженный только от первого зонда для гибридизации методом саузерн-блоттинга, будет указывать на растение, гомозиготное по объекту кукурузы MON87429; сигнал, обнаруженный от первого зонда для гибридизации методом саузерн-блоттинга и второго зонда для гибридизации методом саузерн-блоттинга, будет указывать на растение, гетерозиготное по объекту кукурузы MON87429; а сигнал, обнаруженный только от второго зонда для гибридизации методом саузерн-блоттинга, будет указывать на то, что ДНК была экстрагирована из растения, нулевого по объекту кукурузы MON87429 (дикого типа).

[00121] Другой пример набора для обнаружения включает в себя по меньшей мере одно антитело, специфичное в отношении по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429. Например, в таком наборе может использоваться тест-полоска с технологией латеральной диффузии, содержащая реагенты, которые активируются при контакте кончика полоски с водным раствором. Примерами белков, которые могут использоваться для получения антител, являются белки, кодируемые последовательностью, представленной в виде SEQ ID NO:10, или любым ее фрагментом.

Способ обнаружения белка разработан для определения того, откуда был получен образец: от растения, семени, клетки или части растения, содержащих объект кукурузы

MON87429. По меньшей мере одно антитело, специфичное в отношении по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429, используется для обнаружения белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429, в образце. В наборе для обнаружения, содержащем одно или более антител, специфичных в отношении одного или более белков, кодируемых объектом кукурузы MON87429, может использоваться тест-полоска с технологией латеральной диффузии, содержащая реагенты, которые активируются при контакте кончика полоски с водным раствором. Образцы ткани кукурузы могут измельчать, а белок экстрагировать для анализа, используя воду или водный буфер (например, фосфатно-солевой буфер, содержащий детергент и бычий сывороточный альбумин). После центрифугирования водный супернатант анализируют с помощью ИФА в сэндвич-формате на тест-полоске с технологией латеральной диффузии, содержащей абсорбирующую прокладку. Обнаружение активируется путем погружения кончика тест-полоски в водный раствор, содержащий образец, который необходимо протестировать. Водный раствор поднимается вверх по тест-полоске благодаря капиллярному действию и солюбилизирует меченные золотом антитела на тест-полоске. Меченные золотом антитела являются специфичными в отношении по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом кукурузы MON87429, и будут связываться с эпитопом на белке в образце с образованием комплекса антитело-антиген. Комплекс меченого золотом антитела с антигеном затем поднимается вверх по тест-полоске к нитроцеллюлозной мембране. Мембрана содержит тестовую линию иммобилизованных антител, которые связываются со вторым отдельным эпитопом на белке, кодируемом объектом кукурузы MON87429, в результате чего на тест-полоске появляется видимая линия, если в образце присутствует белок, кодируемый объектом кукурузы MON87429.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

2. Конструкция ДНК, содержащая четыре экспрессионные кассеты, причем

a) первая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Erianthus ravennae*, (II) последовательность, кодирующую фосфинотрицин N-ацетилтрансферазу, и (III) 3'-НТО фруктозобисфосфат-альдолазы от *Setaria italica*;

b) вторая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Coix lacryma-jobi*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид альбиносного и бледно-зеленого б хлоропласта, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую дикамба-монооксигеназу, и (IV) 3'-НТО металлотионеин-подобного белка от *Oryza sativa*;

c) третья экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Arundo donax*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта малатдегидрогеназы, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую белок FT\_T, и (IV) 3'-НТО белка неверхушечной меристемы от *Oryza sativa*; и

d) четвертая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор и лидер CaMV 35S, (II) лидер хлорофилл a/b-связывающего белка от *Triticum aestivum*, (III) интрон актина 1 от *Oryza sativa*, (IV) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта ShkG, от *Arabidopsis thaliana*, (V) последовательность, кодирующую толерантную к глифосату 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, от штамма CP4 *Agrobacterium sp*, (VI) миРНК-мишень, специфичную к тканям мужских растений, от *Zea mays*, и (VII) 3'-НТО богатого глицином РНК-связывающего белка от *Oryza sativa*.

3. Растение или часть растения, содержащие молекулу ДНК, содержащую SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

4. Растение или часть растения по п. 3, отличающиеся тем, что растение или часть растения являются толерантными к хизалофопу, галоксифопу, дикамбе, 2,4-D, глюфосинату и глифосату.

5. Семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к по меньшей

мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

6. Клетка растения, содержащая молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

7. Товар, содержащий молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

8. Способ контроля роста сорняков на участке выращивания сельскохозяйственных культур, включающий:

а) посадку кукурузы, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, на участке выращивания сельскохозяйственных культур; и

б) применение к участку выращивания сельскохозяйственных культур, или любой его части, эффективного количества по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, для контроля роста сорняков на этом участке, не нанося при этом вреда кукурузе.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что применение эффективного количества по меньшей мере одного гербицида включает применение по меньшей мере двух или более гербицидов, выбранных из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS), за урожайный сезон.

10. Способ по п. 8, отличающийся тем, что применение эффективного количества по меньшей мере одного гербицида включает применение гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофопа, галоксифопа, дикамбы, 2,4-D, глюфосината и глифосата или любой их комбинации.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективное количество дикамбы составляет от около 0,56 кг кэ/га до около 2,24 кг кэ/га за урожайный сезон.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективное количество глюфосината

составляет от около 0,45 кг аи/га до около 1,78 кг аи/га за урожайный сезон.

13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективное количество 2,4-D составляет от около 0,84 кг кэ/га до около 1,12 кг кэ/га за урожайный сезон.

14. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективное количество хизалофопы составляет от около 0,038 кг аи/га до около 0,093 кг аи/га за урожайный сезон.

15. Способ по п. 10, отличающийся тем, что эффективное количество галоксифопа составляет от около 0,020 кг аи/га до около 0,078 кг аи/га за урожайный сезон.

16. Способ контроля самосеивной кукурузы, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, на участке, включающий применение гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного циклогександионного (DIM) гербицида, причем применение гербицида предотвращает рост кукурузы, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что применение гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного циклогександионного (DIM) гербицида включает применение циклогександионного (DIM) гербицида, выбранного из группы, состоящей из клетодима, сетоксидима и тралкоксидима.

18. Способ получения растения, которое является толерантным к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, причем способ включает:

а) скрещивание растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК, которая содержит SEQ ID NO:9, с самим собой или со вторым растением с получением семени; и

б) идентификацию семени потомства, которое содержит SEQ ID NO:9.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что идентификация семени потомства, которое содержит SEQ ID NO:9, включает:

а) проращивание семени потомства с получением растений потомства;

б) обработку растений потомства эффективным количеством по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофопы, галоксифопа, дикамбы, 2,4-D, глюфосината и глифосата или любой их комбинации; и

с) отбор растения потомства, которое является толерантным к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации.

20. Способ по п. 18, отличающийся тем, что идентификация семени потомства, которое содержит SEQ ID NO:9, включает обнаружение присутствия SEQ ID NO:9 в образце, полученном из семени потомства.

21. Способ по п. 18, отличающийся тем, что идентификация семени потомства, которое содержит SEQ ID NO:9, включает обнаружение присутствия по меньшей мере

одного белка, кодируемого SEQ ID NO:9, в образце, полученном из семени потомства.

22. Способ получения гибридного семени, включающий:

- a) выращивание растения, содержащего SEQ ID NO:9;
- b) применение эффективного количества глифосата до или во время развития тканей мужских органов размножения растения, вызывая, таким образом, у растения мужскую стерильность;
- c) оплодотворение растения пыльцой второго растения; и
- d) сбор гибридных семян с растения.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что применение эффективного количества глифосата включает применение глифосата до или во время развития в эффективном количестве от около 0,56 кг кэ/га до около 2,80 кг кэ/га.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что применение эффективного количества глифосата включает применение глифосата на стадии развития, выбранной из группы, состоящей из стадии V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 и V14 развития растения кукурузы.

25. Гибридное семя, полученное способом по п. 22, отличающееся тем, что гибридное семя содержит SEQ ID NO:9.

26. Способ повышения толерантности у растения кукурузы, которое является толерантным к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшкимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, причем способ включает:

a) получение конструкции ДНК, содержащей четыре экспрессионные кассеты, причем

i) первая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Erianthus ravennae*, (II) последовательность, кодирующую фосфинотрицин N-ацетилтрансферазу, и (III) 3'-НТО фруктозобисфосфат-альдолазы от *Setaria italica*;

ii) вторая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Coix lacryma-jobi*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид альбиносного и бледно-зеленого б хлоропласта, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую дикамба-монооксигеназу, и (IV) 3'-НТО металлотioneин-подобного белка от *Oryza sativa*;

iii) третья экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор, лидер и интрон убиквитина от *Arundo donax*, (II) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта малатдегидрогеназы, от *Arabidopsis thaliana*, (III) последовательность, кодирующую белок FT\_T, и (IV) 3'-НТО белка неверхушечной меристемы от *Oryza sativa*; и

iv) четвертая экспрессионная кассета содержит в функциональной связи (I) промотор и лидер CaMV 35S, (II) лидер хлорофилл a/b-связывающего белка от *Triticum aestivum*, (III) интрон актина 1 от *Oryza sativa*, (IV) последовательность, кодирующую транзитный пептид хлоропласта ShkG, от *Arabidopsis thaliana*, (V) последовательность, кодирующую толерантную к глифосату 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазу, от штамма CP4 *Agrobacterium sp.*, (VI) миРНК-мишень, специфичную к тканям мужских растений, от *Zea mays*, и (VII) 3'-НТО богатого глицином РНК-связывающего белка от *Oryza sativa*;

b) вставку конструкции ДНК в геном клетки кукурузы;

c) регенерацию клетки кукурузы в растение кукурузы и

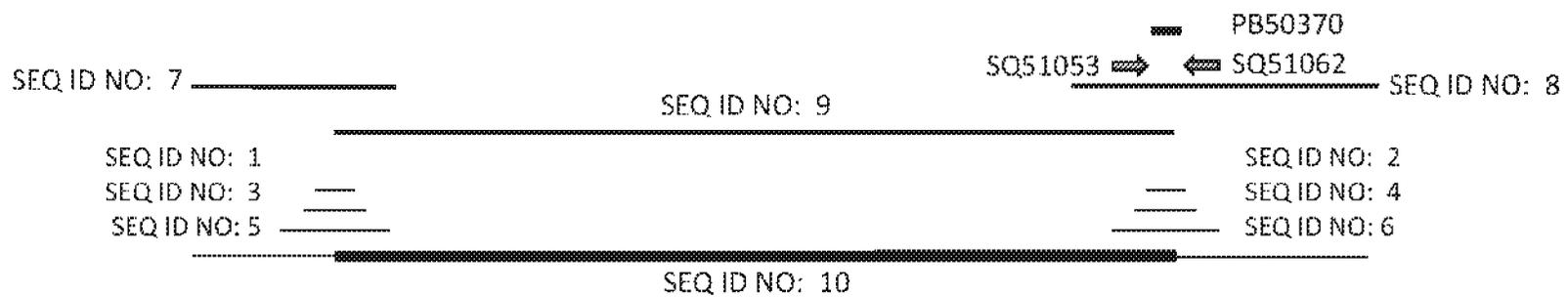
d) отбор растения кукурузы, содержащего конструкцию ДНК.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что отбор включает обработку растения кукурузы эффективным количеством по меньшей мере одного гербицида, выбранного из группы, состоящей из хизалофоп, галоксифоп, дикамбы, 2,4-D, глюфосината и глифосата.

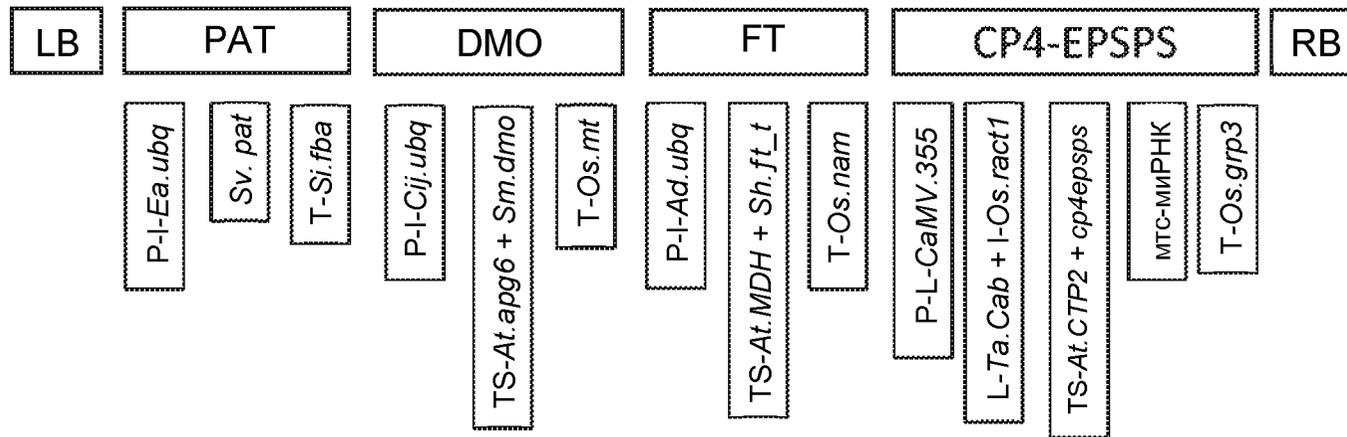
28. Растение кукурузы или семя кукурузы, которые включают толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, и получены способом по п. 26, где растение кукурузы или семя кукурузы содержат конструкцию ДНК.

29. Клетка кукурузы, которая включает толерантность к по меньшей мере одному гербициду, выбранному из группы, состоящей из ингибиторов ацетил-КоА-карбоксилазы (АСС) в арилоксифенокси пропионатной (ФОП) группе, синтетических ауксинов, ингибиторов глутаминсинтетазы и ингибиторов 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтазы (EPSPS) или любой их комбинации, и получена способом по п. 26, где клетка кукурузы содержит конструкцию ДНК.

По доверенности



Фигура 1



Фигура 2



Тестирование кассет PAT и

Тестирование кассет

Тестирование кассет CP4-EPSPS/мтс-

Тестирование конструкции четырех

Трансформация

Тепличное тестирование

Полевые испытания первого сезона

Последующие полевые испытания

Молекулярная

Фигура

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:  
**202290193**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C12N 15/82, 15/63, 5/04, C07K 2/00, 4/10, A01H 1/06, 5/00, 1/02, 1/023

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2012/0246763 A1 (FLASINSKI STANISLAW) 27.09.2012, формула, примеры 1-15, параграфы [0062], [0063], [0069] [0071]	1-29
Y	PREUSS Sasha B. et al. Expression of the Arabidopsis thaliana BBX32 Gene in Soybean Increases Grain Yield. PLoS ONE, 2012, Volume 7, Issue 2	1-29
Y	RU 2251270 C2 (АВЕНТИС КРОПСАЙЕНС ГМБХ) 10.05.2005, формула, реферат, таблицы 1-55	11-15, 23

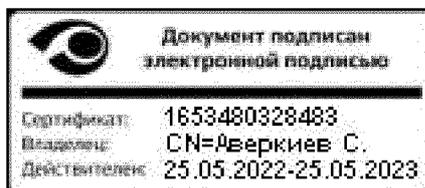
последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 02 августа 2022 (02.08.2022)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202290193**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 15/82 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
C07K 2/00 (2006.01)  
C07K 4/10 (2006.01)  
A01H 1/06 (2006.01)  
A01H 5/00 (2018.01)  
A01H 1/02 (2006.01)