

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293117** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.01.12

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.14

(54) **ОБЪЕКТ BRASSICA MON94100 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/746,158**

(32) **2018.10.16**

(33) **US**

(62) **202191052; 2019.10.14**

(71) Заявитель:
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК
(US)

(72) Изобретатель:

**Эллис Кристина, Го Ширли Кс.,
Леклер Шерри, Пэн Миншэн, Вайе
Дженис Р. (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В изобретении предложены рекомбинантные молекулы ДНК, которые являются уникальными для объекта Brassica MON94100 и трансгенных растений Brassica, частей растений Brassica, семян Brassica, клеток Brassica и сельскохозяйственных продуктов, содержащих объект Brassica MON94100, а также способы применения и обнаружения объекта Brassica MON94100. Трансгенные растения Brassica, содержащие объект Brassica MON94100, проявляют толерантность к дикамбе.

A1

202293117

202293117

A1

ОБЪЕКТ BRASSICA MON94100 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**5 ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/746158, поданной 16 октября 2018 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 [002] Перечень последовательностей, содержащийся в файле, названном «MONS450WO_ST25», имеющем размер 16483 байт (согласно измерениям в MS-Windows) и созданном 12 сентября 2019 г., подан в электронном виде и включен в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

15 [003] Изобретение относится к рекомбинантным молекулам ДНК объекта Brassica MON94100. Изобретение также относится к трансгенным растениям Brassica, их частям, семенам, клеткам и сельскохозяйственным продуктам, содержащим объект Brassica MON94100, а также к способам применения и обнаружения объекта Brassica MON94100. Трансгенные растения Brassica, их части, семена и клетки, содержащие
20 объект Brassica MON94100, проявляют толерантность к дикамбе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Культуры Brassica важны во многих регионах мира, и использование гербицидов для борьбы с сорняками в растениеводстве является хорошо зарекомендовавшим себя инструментом. Сорняки конкурируют с культурными
25 растениями за пространство, питательные вещества, воду и свет, и могут загрязнять урожай, что делает борьбу с сорняками важной задачей в сельском хозяйстве. Методы биотехнологии были использованы для получения трансгенного растения Brassica, которое обладает чертой толерантности к конкретному гербициду из-за экспрессии гетерологичного гена, также известного как трансген. Трансгенная толерантность к

гербицидам позволяет использовать гербицид в среде выращивания сельскохозяйственных культур без повреждения урожая, тем самым улучшая борьбу с сорняками и поддерживая урожайность сельскохозяйственных культур. Трансгенные признаки Brassica в отношении толерантности к глифосату и толерантности к глюфосинату являются примерами характеристик толерантности к гербицидам, которые широко используются в коммерческом производстве Brassica для борьбы с сорняками. Признак толерантности к гербицидам может использоваться отдельно или в сочетании с другими признаками, и комбинации признаков толерантности к гербицидам могут быть желательными для обеспечения вариантов борьбы с сорняками, которые повышают гибкость и выбор производителя и позволяют использовать несколько механизмов действия гербицидов для борьбы с проблемными сорняками. Комбинация признаков может быть достигнута путем объединения каждого индивидуального признака при скрещивании.

[005] Трансгенные признаки обусловлены присутствием в геноме трансгенного объекта, который представляет собой уникальную последовательность ДНК в конкретном месте хромосомы. Объект создается посредством одноразовой случайной вставки кассеты трансгенной экспрессии в одно конкретное место в геноме растения. Каждый объект является уникальным, и на экспрессию трансгена в трансгенном растении, части, семени или клетке и, следовательно, на эффективность трансгена для каждого объекта может влиять множество различных факторов, таких как элементы, используемые в кассете трансгенной экспрессии, взаимодействие этих элементов, геномное расположение трансгенной вставки и хромосомный контекст трансгенной вставки. Например, было замечено, что могут быть большие различия в общем уровне экспрессии трансгена или в пространственном или временном паттерне экспрессии трансгена между сходно продуцируемыми объектами. По этой причине необходимо произвести и протестировать сотни отдельных объектов, чтобы в конечном итоге определить один объект, пригодный для коммерческих сельскохозяйственных целей. Создание и выбор объекта с качествами, необходимыми для коммерческого растениеводства представляет собой научный процесс, включающий годы испытаний растений, молекулярной характеристики, полевых испытаний и анализа данных. Во-первых, кассета трансгенной экспрессии должна быть разработана, протестирована и оптимизирована для экспрессии конкретного трансгена в конкретной культуре. Затем необходимо произвести тысячи уникальных объектов и проанализировать их с помощью нескольких поколений растений, в различных полевых условиях и

генетическом фоне, чтобы выбрать уникальный, превосходный объект для коммерческого использования. Такой объект, однажды идентифицированный как имеющий желаемую экспрессию трансгена и молекулярные характеристики, может быть использован для внедрения признака в другие генетические фоны Brassica с использованием методов селекции растений для получения ряда различных сортов Brassica, которые содержат новый признак в сочетании с другими желательными качествами, такими как нативные признаки, высокоурожайная зародышевая плазма, устойчивость к болезням, признаки для производства гибридных семян и другие трансгенные признаки толерантности к гербицидам.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Изобретение относится к рекомбинантным молекулам ДНК, содержащим 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 рекомбинантной ДНК получена из растения, семени или клетки, содержащей объект Brassica MON94100, репрезентативный образец семян, содержащий объект, депонирован в АТСС под номером доступа РТА-125182. В другом варианте осуществления молекула рекомбинантной ДНК находится в растении, клетке, семени или части растения, содержащих объект Brassica MON94100, репрезентативный образец семян, содержащих объект, депонирован в АТСС как РТА-125182. В другом варианте осуществления молекула рекомбинантной ДНК является ампликоном для диагностики присутствия объекта Brassica MON94100.

[007] В изобретении предложена молекула ДНК, имеющая достаточную длину смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве ДНК-зонда, специфичного для SEQ ID NO: 10 в образце ДНК, полученной из растения Brassica, семени Brassica или клетки Brassica. В одном варианте осуществления ДНК-зонд включает SEQ ID NO: 13.

[008] Изобретение относится к паре молекул ДНК, содержащей первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем каждая первая и вторая молекулы ДНК содержат фрагмент SEQ ID NO: 10 и действуют как праймеры ДНК при совместном использовании в реакции амплификации с ДНК, содержащий объект Brassica MON94100 для создания ампликона, диагностического для объекта Brassica

MON94100 в образце. В одном варианте осуществления праймеры ДНК включает SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

[009] В изобретении предложен способ обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце ДНК, полученном из растения Brassica, семени Brassica или клетки Brassica, причем способ включает: приведение образца в контакт с ДНК-зондом; воздействие на образец и ДНК-зонд жестких условий гибридизации; и обнаружение гибридизации ДНК-зонда с молекулой ДНК в образце, при этом гибридизация ДНК-зонда с молекулой ДНК указывает на присутствие объекта Brassica MON94100 в образце ДНК.

[0010] В изобретении предложен способ обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце ДНК, полученном из растения Brassica, семени Brassica или клетки Brassica, причем способ включает: приведение образца в контакт с парой молекул ДНК, которые функционируют как праймеры ДНК; 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 образца Brassica MON94100 в образце.

[0011] В изобретении предлагается способ обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце, полученном из растения Brassica, семени Brassica или клетки Brassica, который включает: приведение образца в контакт по меньшей мере с одним антителом, специфичным для белка, кодируемого объектом Brassica MON94100; и обнаружение связывания антитела с белком в образце, причем связывание антитела с белком указывает на присутствие объекта Brassica MON94100 в образце.

[0012] В изобретении предложены набор для обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100, содержащий ДНК-зонд, специфичный для SEQ ID NO: 10, пару праймеров ДНК, которые создают ампликон, диагностический для объекта Brassica MON94100, или антитело, специфичное для белка, кодируемого объектом Brassica MON94100.

[0013] В изобретении предложены растение, семя, клетка, часть растения или товарный продукт, 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 толерантны к дикамбе.

[0014] В изобретении предложен способ борьбы с сорняками на участке, включающий посадку растений Brassica, содержащих объект Brassica MON94100, и применение эффективного количества дикамбы для борьбы с сорняками на участке без повреждения Brassica. В одном варианте осуществления эффективное количество дикамбы составляет от около 0,1 фунта к.э./акр до около 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода. В одном варианте осуществления эффективное количество дикамбы составляет от около 0,5 фунтов к.э./акр до около 2 фунта к.э./акр в течение вегетационного периода.

[0015] В изобретении предложен способ борьбы с самосевом Brassica, содержащим объект Brassica MON94100, на участке, включающий нанесение гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного гербицида, отличного от дикамбы, причем нанесение гербицида предотвращает рост растений Brassica, содержащих объект Brassica MON94100. В одном варианте осуществления гербицид выбирают из группы, состоящей из 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты), бромоксинила (3,5-дибром-4-гидроксibenзонитрила) и МСРА амина (4-хлор-2-метилфеноксисукусной кислоты).

[0016] В изобретении предложен способ получения растения, толерантного к дикамбе, включающий: скрещивание растения, содержащего объект Brassica MON94100, с самим собой или со вторым растением для получения семени; и идентификацию семени-потомка, которое содержит объект Brassica MON94100. В одном варианте осуществления идентификацию семени-потомка, которое содержит объект Brassica MON94100, осуществляют путем выращивания семени-потомка для получения растений-потомков; обработки растений-потомков эффективным количеством дикамбы; и выбора растения-потомка, толерантного к дикамбе. В одном варианте осуществления идентификацию семени-потомка, которое содержит объект Brassica MON94100, осуществляют путем обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце, полученном из семени-потомка. В одном варианте осуществления идентификацию семени-потомка, которое содержит объект Brassica MON94100, осуществляют путем обнаружения присутствия по меньшей мере одного белка, кодируемого объектом Brassica MON94100, в образце, полученном из семени-потомка.

[0017] В данном изобретении также предложен способ определения зиготности растения в отношении объекта Brassica MON94100, включающий: приведение в контакт образца, содержащего ДНК, полученную из растения, с набором праймеров, способных создать первый ампликон, диагностический для присутствия образца Brassica MON94100, и второй ампликон, диагностический для геномной ДНК Brassica дикого типа, не содержащий объект Brassica MON94100; осуществление реакции амплификации нуклеиновой кислоты; обнаружение первого и второго ампликонов, причем присутствие обоих ампликонов указывает на то, что образец является гетерозиготным по объекту Brassica MON94100, а присутствие только первого ампликона указывает на то, что образец является гомозиготным по объекту Brassica MON94100. В одном варианте осуществления набор праймеров включает SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

[0018] В изобретении предложен способ увеличения толерантности к дикамбе у растения Brassica, включающий получение конструкции ДНК, содержащей кассету экспрессии, которая содержит функционально связанные (а) промотор из *вируса хлоротической полосатости арахиса*, (б) лидерную последовательность из *вируса гравировки табака*, (с) транзитный пептид хлоропласта рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из *Pisum sativum*, (d) кодирующую последовательность дикамбамонооксигеназы из *Stenotrophomonas maltophilia* и (е) 3' НТО из *Medicago truncatula*; и вставку конструкции ДНК в геном клетки Brassica; регенерацию клетки Brassica в растение Brassica; и отбор растения Brassica, содержащего конструкцию ДНК. В одном варианте осуществления отбор осуществляют посредством обработки растения Brassica эффективным количеством дикамбы. В одном варианте осуществления растение Brassica, семя Brassica или клетки Brassica, толерантные к дикамбе, полученные способом, причем растение Brassica, семена Brassica или клетка Brassica содержат конструкцию ДНК. В другом варианте осуществления растение Brassica, семя Brassica или клетки Brassica, полученные способом, содержат SEQ ID NO: 10.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] На фиг. 1 представлена последовательность объекта Brassica MON94100. 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, помеченные

SQ51321 (SEQ ID NO:11) и SQ13805 (SEQ ID NO:12) представляют собой приблизительное положение пары праймеров, которые можно использовать для обнаружения объекта Brassica MON94100; а горизонтальная линия помеченная PB4832 (SEQ ID NO:13) представляет собой приблизительное положение ДНК-зонда, который можно использовать для обнаружения объекта Brassica MON94100.

[0020] На фиг. 2 представлена кассета экспрессии объекта Brassica MON94100 относительно SEQ ID NO: 9 с генетическими элементами, помеченными, как описано в таблице 1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 [0021] SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность ДНК длиной тридцать нуклеотидов, представляющую 5'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 1 соответствует положениям нуклеотидов с 986 по 1015 SEQ ID NO: 10.

15 [0022] SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность ДНК длиной тридцать нуклеотидов, представляющую 3'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 2 соответствует положениям нуклеотидов с 3899 по 3928 SEQ ID NO: 10.

20 [0023] SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность ДНК длиной шестьдесят нуклеотидов, представляющую 5'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 3 соответствует положениям нуклеотидов с 971 по 1030 SEQ ID NO: 10.

25 [0024] SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность ДНК длиной шестьдесят нуклеотидов, представляющую 3'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 4 соответствует положениям нуклеотидов с 3884 по 3943 SEQ ID NO: 10.

[0025] SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность ДНК длиной сто нуклеотидов, представляющую 5'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 5 соответствует положениям нуклеотидов с 951 по 1050 SEQ ID NO: 10.

30 [0026] SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность ДНК длиной сто нуклеотидов, представляющую 3'-соединение геномной ДНК Brassica и вставки трансгена. SEQ ID NO: 6 соответствует положениям нуклеотидов с 3864 по 3963 SEQ ID NO: 10.

[0027] SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность ДНК длиной 1104 нуклеотидов, представляющую 1000 нуклеотидов 5'-фланкирующей геномной ДНК Brassica и 104 нуклеотида 5'-конца вставки трансгена.

5 [0028] SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность ДНК длиной 1281 нуклеотидов, представляющую 281 нуклеотид 3'-конца вставки трансгена и 1000 нуклеотидов 3'-фланкирующей геномной последовательность ДНК Brassica.

[0029] SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность ДНК длиной 2913 нуклеотидов, соответствующую трансгенной вставке объекта Brassica MON94100.

10 [0030] SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность ДНК длиной 4913 нуклеотидов, соответствующую объекту Brassica MON94100; последовательность содержит 5'-фланкирующую последовательность геномной ДНК от положений 1 до 1000, вставку трансгенной ДНК от положений 1001 до 3913 и 3'-фланкирующую последовательность геномной ДНК от положения 3914 до 4913.

15 [0031] SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность ДНК длиной 23 нуклеотида, соответствующую праймеру, обозначенному как SQ51321, и используемому для идентификации объекта ДНК Brassica MON94100 в образце; он соответствует положениям с 3953 по 3931 SEQ ID NO: 10.

20 [0032] SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность ДНК длиной 26 нуклеотидов, соответствующую праймеру, обозначенному как SQ13805, и используемому для идентификации объекта ДНК Brassica MON94100 в образце; он соответствует положениям с 3839 по 3864 SEQ ID NO: 10.

25 [0033] SEQ ID NO: 13 представляет собой последовательность ДНК длиной 16 нуклеотидов, соответствующую зонду, обозначенному как PB4832, и используемому для идентификации объекта ДНК Brassica MON94100 в образце; он соответствует положениям с 3869 по 3881 SEQ ID NO: 10.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 [0034] Следующие определения и способы предназначены для лучшего определения изобретения и для руководства специалистами в данной области техники при практическом применении изобретения. Если не указано иное, термины следует понимать в соответствии с их обычным использованием специалистами в соответствующей области техники.

[0035] Методы трансформации растений используются для случайной вставки чужеродной ДНК (также известной как трансгенная ДНК) в хромосому генома клетки

для получения генетически модифицированной клетки, также называемой «трансгенной» или «рекомбинантной» клеткой. С помощью этого метода трансформируются многие отдельные клетки, каждая из которых приводит к уникальному трансгенному объекту из-за случайной вставки чужеродной ДНК в геном.

5 Затем трансгенное растение регенерируют из каждой отдельной трансгенной клетки. В результате каждая клетка трансгенного растения содержит уникально встроенный трансгенный объект в качестве стабильной части своего генома. Затем это трансгенное растение можно использовать для получения растений-потомков, каждое из которых содержит уникальный трансгенный объект. Объект Brassica MON94100 был создан и

10 отобран посредством: (i) трансформации тысяч клеток Brassica с помощью конструкции ДНК, содержащей кассету трансгенной экспрессии (выбранной после конструирования и тестирования множества различных кассет экспрессии), (ii) регенерации популяция трансгенных растений, каждое из которых содержит уникальный трансгенный объект, и (iii) строгого многолетнего отбора объектов,

15 включающего тестирование и анализ молекулярных характеристик, эффективности толерантности к гербицидам и агрономических свойств в различных генетических фонах для тысяч объектов в десятках тысяч растений. Таким образом, был получен объект Brassica MON94100, который был выбран как уникально превосходное растение, пригодное для широкомасштабных сельскохозяйственных коммерческих

20 целей.

[0036] Акт встраивания трансгенной ДНК в геном растения Brassica осуществляется способами трансформации растений, известными в данной области техники, и приводит к созданию новой последовательности трансгенной геномной ДНК, известной как «трансгенный объект» или «объект». Последовательность ДНК

25 объекта состоит из вставленной чужеродной ДНК (называемой «трансгенной вставкой») и геномной ДНК, непосредственно примыкающей к трансгенной вставке или «фланкирующей» трансгенную вставку по обе стороны от места вставки (называемой «фланкирующая ДНК»). Последовательность ДНК объекта уникальна и специфична для данного объекта, и ее можно легко идентифицировать при сравнении с

30 другими последовательностями ДНК, такими как последовательность других объектов или нетрансформированная геномная ДНК Brassica. Объект Brassica MON94100 имеет новую и уникальную последовательность ДНК, представленную как SEQ ID NO: 10, которая содержит последовательность трансгенной вставки, представленную как SEQ ID NO: 9, и 5'- и 3'-фланкирующие последовательности ДНК, представленные в SEQ ID

NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно. Объект Brassica MON94100, таким образом, представляет собой молекулу ДНК, которая является неотъемлемой частью хромосомы трансгенных клеток и растений Brassica, содержащих объект, и как таковая является статической и может передаваться клеткам- и растениям-потомкам.

5 [0037] Данное изобретение также относится к потомству исходной трансформированной клетки и растения, которые содержат объект Brassica MON94100. Такое потомство может быть получено из культуры клеток и тканей, путем самоопыления растения Brassica, содержащего объект Brassica MON94100 или путем скрещивания растения Brassica, содержащего объект Brassica MON94100 и другого
10 растения, которое содержит или не содержит объект. Такое другое растение может быть трансгенным растением, содержащим тот же или другой объект(ы), или нетрансгенным растением, например, растением другого сорта. Объект Brassica MON94100 передается от первоначального родителя через каждое поколение к потомству.

15 [0038] В контексте данного документа термин «Brassica» означает растение, которое является представителем рода Brassica, и включает все сорта растений, которые могут быть скрещены с Brassica. Растения рода Brassica, пригодные при практическом применении способов по данному изобретению, включают, без ограничения, сорта *Brassica napus* (широко известные как рапс, а некоторые сорта
20 могут упоминаться как канола), *Brassica juncea*, *Brassica napobrassica*, *Brassica oleracea*, *Brassica carinata*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* и *Brassica campestris*, а также любые другие растения, относящиеся к роду *Brassica* которые пригодны для скрещивания с видами *Brassica*. Поскольку *Brassica napus* является аллотетраплоидом, полученным посредством скрещивания и сохранения обоих геномов *Brassica rapa*
25 (ранее *Brassica campestris*) и *Brassica oleracea*, растение *Brassica napus*, содержащее объект Brassica MON94100 может использоваться в методах разведения для интродукции объекта Brassica MON94100, и, таким образом, признака толерантности к дикамбе в другие растения рода *Brassica*. В контексте данного документа термин «канола» или «растение канола» относится к растению *Brassica*, которое можно
30 использовать для производства масла канола (т.е. масла, отвечающего определенному качеству, содержащего менее 2 % эруковой кислоты).

[0039] Изобретение относится к объекту Brassica MON94100, который обеспечивает клетки, растения и семена Brassica, содержащие данный объект, толерантностью к дикамбе. Объект Brassica MON94100 содержат кассету экспрессии

для экспрессии белка DMO. В контексте данного документа термин «кассета экспрессии» или «кассета» представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую комбинацию различных элементов, которые должны быть экспрессированы трансформированной клеткой. В таблице 1 представлен список элементов, содержащихся в SEQ ID NO: 9 и проиллюстрированных на Фигуре 2.

Таблица 1: Описание объекта Brassica MON94100

Элемент	Положение в SEQ ID NO: 10	Описание
5'-фланкирующая ДНК	1-1000	Последовательность ДНК, фланкирующая 5'-конец трансгенной вставки
Правая пограничная область	1001-1070	Область ДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , содержащая правую пограничную последовательность, используемую для переноса T-ДНК
Промежуточная последовательность	1071-1104	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
P-PCSV	1105-1537	Промотор полноразмерного транскрипта <i>вируса хлоротической полосатости арахиса (PCSV)</i> , который управляет транскрипцией в растительных клетках
Промежуточная последовательность	1538-1557	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
L-TEV	1558-1689	Лидерная последовательность 5' НТО из РНК <i>вируса гравировки табака (TEV)</i> , которая участвует в регуляции экспрессии генов
Промежуточная последовательность	1690	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
TS-Ps.RbcS	1691-1933	Транзитный пептид хлоропласта рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (RuBisCO) из <i>Pisum sativum</i>
Промежуточная последовательность	1934-1942	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
CS-STEmA.DMO	1943-2965	Кодон оптимизированная последовательность, кодирующая вариант дикамбамонооксигеназы (DMO) из <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , которая обеспечивает толерантность к дикамбе
Промежуточная последовательность	2966-3034	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
T-Mt.AC	3035-3534	Последовательность 3' НТО из <i>Medicago truncatula</i>
Промежуточная последовательность	3535-3632	Последовательность, используемая при клонировании ДНК
Левая пограничная область	3633-3913	Область ДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , содержащая левую пограничную последовательность, используемую для переноса T-ДНК

Элемент	Положение в SEQ ID NO: 10	Описание
3'-фланкирующая ДНК	3914-4913	Последовательность ДНК, фланкирующая 3'-конец трансгенной вставки

[0040] В контексте данного документа термин «рекомбинантный» относится к неприродной ДНК, белку или организму, которые обычно не встречаются в природе и которые были созданы посредством вмешательства человека. В контексте данного документа «рекомбинантная молекула ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не могут встречаться вместе в естественных условиях, и является результатом вмешательства человека, например, молекула ДНК, которая состоит из комбинации по меньшей мере двух молекул ДНК, гетерологичных друг другу, такая как молекула ДНК, которая содержит трансген и геномную ДНК растения, граничащую с трансгеном. Примером рекомбинантной молекулы ДНК является молекула ДНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10. В контексте данного документа «рекомбинантное растение» означает растение, которое обычно не существует в природе, является результатом вмешательства человека и содержит молекулу трансгенной ДНК. В результате такого геномного изменения рекомбинантное растение является чем-то новым и заметно отличается от родственного растения дикого типа. Примером рекомбинантного растения является растение Brassica, содержащее объект Brassica MON94100.

[0041] В контексте данного документа термин «трансген» относится к молекуле ДНК, искусственно включенной в геном организма в результате вмешательства человека, например, методами трансформации растений. Трансген может быть гетерологичным организму. В контексте данного документа термин «трансгенная вставка» относится к чужеродной ДНК, вставленной методами трансформации растений в геном Brassica для получения объекта Brassica MON94100. Последовательность трансгенной вставки объекта Brassica MON94100 представлена как SEQ ID NO: 9. Термин «трансгенный» относится к содержащему трансген, например, «трансгенное растение» относится к растению, содержащему трансген.

[0042] В контексте данного документа термин «гетерологичный» относится к первой молекуле, обычно не связанной со второй молекулой или организмом в природе. Например, молекула ДНК может быть от первого вида и вставлена в геном

второго вида. Таким образом, молекула ДНК будет гетерологичной по отношению к геному и организму.

[0043] В контексте данного документа термин «химерная» относится к одиночной молекуле ДНК, полученной путем слияния первой молекулы ДНК со второй молекулой ДНК, где ни первая, ни вторая молекула ДНК обычно не встречаются в этой конфигурации, слитыми с другой. Таким образом, химерная молекула ДНК представляет собой новую молекулу ДНК, обычно не встречающуюся в природе. Примером химерной молекулы ДНК является молекула ДНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-10.

[0044] В контексте данного документа термин «ДМО» или «дикамбамоноксигеназа» относится к белку, который катализирует дезактивацию дикамбы посредством реакции O-деметилирования до негербицидного соединения 3,5-дихлорсалициловой кислоты. Дикамбамоноксигеназа была первоначально выделена из *Stenotrophomonas maltophilia*, микроорганизма, который обычно встречается в ризосфере почвы. Иллюстративные последовательности молекул нуклеиновых кислот, кодирующих дикамбамоноксигеназы, и белковые последовательности, кодируемые этими молекулами нуклеиновых кислот, известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 7884262.

[0045] В контексте данного документа термин «выделенный» относится к отделению молекулы от других молекул, которые обычно связаны с ней в своем родном или естественном состоянии. Таким образом, термин «выделенный» может относиться к молекуле ДНК, которая была отделена от другой молекулы (молекул) ДНК, которая связана с ней в своем естественном или природном состоянии. Такая молекула ДНК может находиться в рекомбинантном состоянии, например как рекомбинантная молекула ДНК. Таким образом, молекула ДНК, удаленная из ее естественного состояния и слитая с другой молекулой ДНК, с которой она обычно не связана, будет выделенной молекулой ДНК. Такая выделенная молекула ДНК может возникнуть в результате использования методов биотехнологии, таких как изготовление рекомбинантной ДНК или интеграции чужой молекулы ДНК в хромосому клетки, растения или семени.

[0046] Данное изобретение относится к молекулам ДНК и их соответствующим последовательностям ДНК. В контексте данного документа термины «ДНК» и «молекула ДНК» относятся к молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Молекула ДНК может иметь геномное или синтетическое происхождение и обычно

рассматривается от 5' (против хода транскрипции) конца до 3' (по ходу транскрипции) конца. В контексте данного документа 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), Приложение 2, Таблицы 1 и 3. По соглашению, последовательности ДНК изобретения и их фрагменты раскрыты со ссылкой только на одну цепь из двух цепей комплементарной последовательности ДНК. По смыслу и намерению комплементарные последовательности представленных в данном документе последовательностей (последовательности комплементарной цепи), также называемые в данной области техники как обратные комплементарные последовательности, находятся в пределах объема данного изобретения и включены в объем заявленной формулы изобретения. Таким образом, используемые в данном документе ссылки на SEQ ID NO: 1-10 и их фрагменты включают и относятся к последовательности комплементарной цепи и ее фрагментам.

[0047] В контексте данного документа термин «фрагмент» относится к меньшей части целого. Например, фрагменты SEQ ID NO: 10 будет включать последовательности, которые составляют 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 полной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0048] Последовательность ДНК трансгенной вставки объекта Brassica MON94100 представлена как SEQ ID NO: 9. Последовательность ДНК трансгенной вставки и геномной ДНК Brassica, фланкирующей каждую сторону трансгенной вставки, представлена как SEQ ID NO: 10. Последовательности ДНК части фланкирующей ДНК и 5'-конца трансгенной вставки представлены как 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 как SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 8.

[0049] Последовательность ДНК области, охватывающей связь с помощью связывания фосфодиэфирной связи одного конца трансгенной вставки с фланкирующей геномной ДНК Brassica, упоминается в данном документе как «соединение». Соединение представляет собой точку соединения трансгенной вставки и фланкирующей ДНК как одной непрерывной молекулы. Одно соединение находится на 5'-конце трансгенной вставки, а другое - на 3'-конце трансгенной вставки, называются в данном документе 5' и 3' соединениями, соответственно. «Последовательность соединения» относится к последовательности ДНК любой длины, которая охватывает 5'-или 3'-соединения объекта. Последовательности соединения объекта Brassica MON94100 очевидны для специалиста в данной области техники с использованием SEQ ID NO: 10. Примеры последовательностей соединений объекта Brassica MON94100 представлены как SEQ ID NO: 1-8. На фиг. 1 показано физическое расположение SEQ ID NO: 1-10 в направлении от 5' до 3'. Последовательности соединения объекта Brassica MON94100 могут присутствовать как часть генома растения, семени или клетки, содержащих объект Brassica MON94100. Идентификация любой одной или более последовательностей SEQ ID NO: 1-8 или 10 в образце растения, части растения, семени или клетки указывает на то, что ДНК была получена из Brassica, содержащей объект Brassica MON94100, и является диагностическим признаком присутствия объекта Brassica MON94100.

[0050] Растения, семена, клетки, части растений и товарные продукты по данному изобретению можно использовать для обнаружения молекул ДНК или белков, указывающих на присутствие объекта Brassica MON94100. Предлагаются иллюстративные молекулы ДНК, которые можно использовать в качестве праймеров или зондов для обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце. Такие праймеры или зонды специфичны для последовательности нуклеиновой кислоты-мишени и, как таковые, полезны для идентификации объекта Brassica MON94100

описанными в данном документе способами. Обнаружение присутствия объекта Brassica MON94100 может быть выполнено с использованием способов, известных в данной области техники, таких как термическая амплификация нуклеиновой кислоты или методы гибридизации нуклеиновой кислоты (такие как нозерн-блоттинг и Саузерн-блоттинг).

5 [0051] «Праймер» представляет собой молекулу ДНК, которая предназначена для использования в методах отжига или гибридизации, которые включают реакцию амплификации. Реакция амплификации представляет собой реакцию *in vitro*, при которой матричная ДНК амплифицируется с образованием ампликона. В контексте
10 данного документа термин «ампликон» представляет собой молекулу ДНК, синтезированную с использованием методов амплификации. Ампликоны по данному изобретению имеют последовательность ДНК, содержащую одну или более из SEQ ID NO: 1-10 или их фрагментов. Пара праймеров может использоваться с матричной ДНК, такой как образец геномной ДНК Brassica, в реакции амплификации, такой как
15 полимеразная цепная реакция (ПЦР), для получения ампликона, причем полученный ампликон будет иметь последовательность ДНК, соответствующую последовательности матричной ДНК, расположенной между двумя сайтами, в которых праймеры гибридизуются с матрицей. Праймер обычно предназначен для гибридизации с комплементарной цепью ДНК-мишени с образованием гибрида между
20 праймером и цепью ДНК-мишени. Наличие праймера - это точка распознавания полимеразой, в которой начинается увеличение праймера с использованием в качестве шаблона цепи ДНК-мишени. Пары праймеров относятся к использованию двух праймеров, связывающих противоположные цепи двухцепочечного нуклеотидного сегмента, для амплификации нуклеотидного сегмента между ними. Примеры
25 последовательностей праймеров представлены как SEQ ID NO: 11 (SQ51321) и SEQ ID NO: 12 (SQ13805). Пара праймеров, представленная как SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, применима в качестве первой молекулы ДНК и второй молекулы ДНК, причем первая молекула ДНК представляет собой фрагмент последовательности ДНК трансгенной вставки SEQ ID NO: 10, а вторая молекула ДНК представляет собой
30 фрагмент фланкирующей последовательности ДНК SEQ ID NO: 10, и каждая из них имеет достаточную длину для функционирования в качестве праймеров ДНК при совместном использовании в реакции амплификации с ДНК, содержащей объект Brassica MON94100, для получения диагностического ампликона объекта Brassica MON94100 в образце. Пары праймеров по данному изобретению в некоторых

вариантах осуществления также могут быть определены как содержащие первую и вторую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК представляет собой фрагмент части генома Brassica в SEQ ID NO: 10, а вторая молекула ДНК представляет собой фрагмент трансгенной части SEQ ID NO: 10, и каждая имеет достаточную длину для функционирования в качестве праймеров ДНК при совместном использовании в реакции амплификации с ДНК, содержащей объект Brassica MON94100, для получения диагностического ампликона объекта Brassica MON94100 в образце.

[0052] «Зонд» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая является комплементарной цепи нуклеиновой кислоты-мишени и пригодной в методах обнаружения гибридизации. Зонды по данному изобретению включают не только дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые кислоты, но также полиамиды и другие материалы зондов, которые специфически связываются с последовательностью ДНК-мишени, и обнаружение такого связывания может быть полезно для обнаружения присутствия или отсутствия последовательности ДНК-мишени. Зонд может быть присоединен к обычной детектируемой метке или репортерной молекуле, такой как радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент. Иллюстративная последовательность ДНК, используемая в качестве зонда для обнаружения объекта MON94100 Brassica, представлена как SEQ ID NO: 13 (PB4832).

[0053] Способы конструирования и использования праймеров и зондов хорошо известны в данной области техники. Молекулы ДНК, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 1-10, применимы в качестве праймеров и зондов для обнаружения объекта Brassica MON94100 и могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники с использованием представленных в данном документе последовательностей.

[0054] Зонды и праймеры по изобретению могут иметь полную идентичность последовательности с последовательностью-мишенью, хотя праймеры и зонды, отличающиеся от последовательности-мишени, которые сохраняют способность к гибридизации преимущественно с последовательностями-мишенями, могут быть разработаны обычными методами. Для того чтобы молекула нуклеиновой кислоты служила праймером или зондом, она должна быть достаточно комплементарной в последовательности, чтобы иметь возможность образовывать стабильную двухцепочечную структуру при конкретных используемых концентрациях растворителя и соли. Для идентификации присутствия трансгенной ДНК из объекта Brassica MON94100 в образце можно использовать любой обычный метод гибридизации или амплификации нуклеиновых кислот. Зонды и праймеры обычно

имеют длину 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 или более. Такие зонды и праймеры специфически гибридизуются с последовательностью-мишенью ДНК в жестких условиях гибридизации. Жесткие условия гибридизации известны в данной области техники и описаны, например, в MR Green and J Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012). В контексте данного документа две молекулы нуклеиновой кислоты способны специфически гибридизоваться друг с другом, если две молекулы способны образовывать антипараллельную двухцепочечную структуру нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты представляет собой «комплемент» другой молекулы нуклеиновой кислоты, если она проявляет полную комплементарность. В контексте данного документа две молекулы демонстрируют «полную комплементарность», если при выравнивании каждый нуклеотид первой молекулы комплементарен каждому нуклеотиду второй молекулы. Две молекулы являются «минимально комплементарными», если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной стабильностью, чтобы позволить им оставаться отожженными друг с другом, по меньшей мере, в обычных условиях «низкой жесткости». Подобным образом, две молекулы являются «комплементарными», если они могут гибридизоваться друг с другом с достаточной стабильностью, чтобы позволить им оставаться отожженными друг с другом, в обычных условиях «высокой жесткости». Следовательно, отклонения от полной комплементарности допустимы, если такие отклонения не полностью исключают способность молекул образовывать двухцепочечную структуру.

[0055] Соответствующие жесткие условия, которые способствуют гибридизации ДНК, например, $6,0 \times$ хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при около $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ с последующей промывкой $2,0 \times$ SSC при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, известны специалистам в данной области техники или могут быть найдены в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Например, концентрация соли на стадии промывки может быть выбрана от низкой жесткости около $2,0 \times$ SSC при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ до высокой жесткости около $0,2 \times$ SSC при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кроме того, температура на стадии промывки может быть повышена от условий низкой строгости при комнатной температуре, около $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, до условий высокой строгости при около $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. И температура, и концентрация соли могут изменяться, либо температура или

концентрация соли могут поддерживаться постоянными, в то время как другая переменная изменяется.

[0056] Предложены белки, которые можно использовать для получения антител для обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце. Такие антитела специфичны для одного или более белков, кодируемых объектом Brassica MON94100. Последовательность ДНК, кодирующая такие белки, представлена в SEQ ID NO: 10, а начальные и конечные положения кодирующей последовательности указаны в таблице 1. Последовательность ДНК, кодирующая каждый белок, и белок, кодируемый последовательностью, пригодны для получения антител для обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 описанными в данном документе способами. Обнаружение присутствия объекта Brassica MON94100 может быть выполнено с использованием любых методов обнаружения белка, известных в данной области техники, таких как вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), прикрепление антитела к детектируемой метке или репортерной молекуле (такой как радиоактивный изотоп, лиганд, хемилюминесцентный агент или фермент) или ферментативное действие на репортерную молекулу. Один метод предусматривает приведение в контакт образца с антителом, которое связывается с белком DMO, кодируемым объектом Brassica MON94100, а затем обнаружение присутствия или отсутствия связывания антитела. Связывание такого антитела является диагностическим признаком присутствия одного или более белков, кодируемых объектом Brassica MON94100.

[0057] Предложены наборы для обнаружения белков и нуклеиновых кислот для обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100. Варианты таких наборов также могут быть разработаны с использованием описанных в данном документе композиций и способов, а также методов, хорошо известных в области обнаружения белков и нуклеиновых кислот. Наборы для обнаружения белков и нуклеиновых кислот могут применяться в методах селекции с растениями, содержащими объект Brassica MON94100. Такие наборы содержат праймеры или зонды, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 1-10 или антитела, специфичные для белка, кодируемого объектом Brassica MON94100, и могут содержать другие элементы, такие как один или более реакционных реагентов (таких как нуклеотиды, полимеразы, буферный раствор). Наборы могут также содержать положительные контроли, отрицательные контроли и протоколы использования.

[0058] В одном примере набор для обнаружения содержит по меньшей мере одну молекулу ДНК с достаточной длиной смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 10 для функционирования в качестве ДНК-зонда, пригодного для обнаружения присутствия или отсутствия объекта Brassica MON94100 в образце. Иллюстративная молекула ДНК, достаточная для применения в качестве зонда, представляет собой молекулу, содержащую последовательность, представленную как SEQ ID NO: 13. Другие зонды могут быть легко сконструированы специалистом в данной области техники. В другом примере набора для обнаружения содержит по меньшей мере одну пару праймеров, пригодную для получения ампликона, пригодного для обнаружения присутствия или отсутствия объекта Brassica MON94100 в образце. Такой метод может также включать секвенирование ампликона или его фрагмента. Иллюстративные молекулы ДНК, достаточные для применения в качестве пары праймеров, представляют собой молекулы, содержащие последовательности, представленные как SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. Другие пары праймеров могут быть легко разработаны специалистом в данной области техники. Наборы по изобретению могут также необязательно содержать реагенты для проведения описанных в данном документе реакций обнаружения или диагностики. В другом примере набора для обнаружения содержит по меньшей мере одно антитело, специфичное по меньшей мере к одному белку, кодируемому объектом Brassica MON94100. Например, в таком наборе может использоваться тест-полоска с латеральной диффузией, содержащая реагенты, активируемые, когда кончик полоски контактирует с водным раствором. Иллюстративные белки, достаточные для использования в продукции антител, представляют собой белки, кодируемые последовательностью, представленной как SEQ ID NO: 10, или любым ее фрагментом.

[0059] В данном изобретение предложены растения, потомство, семена, клетки и части растений Brassica, содержащие объект Brassica MON94100, и товарные продукты, полученные с их использованием. Растения, потомство, семена, клетки, части растений и товарные продукты по изобретению содержат детектируемое количество ДНК, имеющей по меньшей мере одну из последовательностей, представленных как SEQ ID NO: 1-8 и SEQ ID NO: 10.

[0060] Растения, потомство, семена, клетки и части растений по данному изобретению также могут содержать один или более дополнительных желаемых признаков. Такие желаемые признаки могут быть трансгенными признаками, природными признаками или признаками, полученными другими методами, такими как

редактирование генома или другие традиционные методы мутагенеза. Желаемые признаки могут быть объединены с объектом Brassica MON94100, например, путем скрещивания растения Brassica, содержащего объект Brassica MON94100, с другим растением Brassica, содержащим дополнительный признак(и). Такие признаки включают, помимо прочего, повышенную устойчивость к насекомым, улучшенное растрескивание стручков или семян, улучшенное качество масла, повышенную эффективность использования воды, повышенную урожайность, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян, улучшенное питательное качество, получение гибридных семян и повышенную толерантность к гербицидам, при которых признак измеряется по отношению к растению Brassica, не имеющему такого трансгенного признака.

[0061] Растения по данному изобретению можно использовать для получения потомства, содержащего объект Brassica MON94100. В контексте данного документа «потомство» включает любое растение, семя и клетку, содержащие объект Brassica MON94100, унаследованную от растения-предка, на что указывает растение, содержащее молекулу ДНК, имеющую по меньшей мере одну последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-8 и SEQ ID NO: 10. Растения, семена и клетки могут быть гомозиготными или гетерозиготными по объекту Brassica MON94100. Растения-потомки могут быть выращены из семян, полученных от растения Brassica, содержащего объект Brassica MON94100, или из семян, полученных от растения Brassica, опыленного пыльцой, содержащей объект Brassica MON94100.

[0062] В контексте данного документа термин «часть растения» по данному изобретению представляет собой любую часть растения, содержащую объект Brassica MON94100. Части растения включают, без ограничения, образцы тканей, пыльцу, семяпочки, стручки, семена, цветы, корни, стебли, волокна и листья целиком или частично. Части растения могут быть жизнеспособными или нежизнеспособными.

[0063] В данном изобретении предложен товарный продукт, который получают из растений, содержащих объект Brassica MON94100. Товарные продукты по изобретению содержат обнаруживаемое количество ДНК, содержащее последовательность ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10. В контексте данного документа термин «товарный продукт» относится к любой композиции или продукту, которые содержат материал растения, семени, клетки или части растения, содержащих объект Brassica MON94100. Товарные продукты включают, без ограничения, обработанные семена, зерно, части растений, шрот и

масло. Товарные продукты могут представлять собой неживой растительный материал, то есть неживой материал, полученный из растения, семени, клетки или части растения, содержащих объект Brassica MON94100. Товарный продукт по изобретению будет содержать определяемое количество ДНК, соответствующей объекту Brassica MON94100. Обнаружение одной или более таких ДНК в образце можно использовать для определения содержания или источника товарного продукта. Можно использовать любой стандартный метод обнаружения молекул ДНК, включая раскрытые в данном документе способы обнаружения.

[0064] В контексте данного документа дикамба означает гербицидный активный ингредиент, имеющий химическое название 3,6-дихлор-2-метоксибензойная кислота и любую соль или сложные эфиры дикамбы, в том числе, без ограничения, натриевую соль дикамбы, дикамба-бутотил, дигликоламиновую соль дикамбы, диметиламиновую соль дикамбы, диметиламмонийную соль дикамбы, дикамба-диэтанолламмоний, N,N-Bis-(аминопропил)метиламиновую соль, дикамба-изопропиламмоний, дикамба-калий, дикамба-натрий и дикамба-троламин. Дикамба может использоваться в составе, содержащем один или более дополнительных гербицидов.

[0065] В контексте данного документа термин «толерантный к гербициду» или «толерантность к гербициду» или «толерантность» означает способность быть полностью или частично не затронутым присутствием или применением одного или более гербицидов, например, способность противостоять токсическим воздействиям гербицида при применении. Клетка, семя или растение являются «толерантными к гербициду» или имеют «улучшенную толерантность», если они могут поддерживать, по меньшей мере, частично нормальный рост или фенотип в присутствии одного или более гербицида(ов). Признак является признаком толерантности к гербициду, если его присутствие может придать повышенную толерантность к гербициду клетке, растению или семени по сравнению с контрольными клеткой, растением или семенем или ими же дикого типа. Культуры, имеющие признак толерантности к гербицидам, могут продолжать расти, и присутствие гербицида минимально влияет на них. Белок придает «толерантность к гербициду», если экспрессия белка может придавать повышенную толерантность к гербициду клетке, растению или семени по сравнению с контрольными клеткой, растением или семенем или ими же дикого типа. Примером белка толерантности к гербицидам является дикамбамонооксигеназа. Толерантность к гербицидам может быть полной или частичной нечувствительностью к определенному

гербициду и может выражаться в процентах (%) толерантности или нечувствительности к определенному гербициду.

[0066] В контексте данного документа термины «повреждение гербицидом» или «повреждение» относятся к повреждению растения из-за применения гербицида. «Степень повреждения» или «процент повреждения» относится к визуальной оценке повреждений, вызванных гербицидом. Для растения Brassica, содержащего объект Brassica MON94100, растение будет иметь меньше повреждений после применения дикамбы. Дикамба представляет собой синтетический ауксин, который может влиять на рост растений аналогично естественным ауксинам, таким как индол-3-уксусная кислота, но не регулируется растением метаболически. В результате ткани растений, обработанные дикамбой, будут продолжать расти, даже если рост отрицательно влияет на растение. Эпинастия листьев - это заметное изгибание или скручивание листьев в результате нарушения их роста и один из эффектов дикамбы, который полезен для визуальной оценки повреждения гербицидом.

[0067] В контексте данного документа термин «сорняк» означает любое нежелательное растение. Растение может быть признано в целом нежелательным для целей сельского хозяйства или садоводства (например, виды рода *Amaranthus*) или может считаться нежелательным в определенной ситуации (например, культура одного вида на поле с другими видами, также известная как самосев). Сорняки широко известны в данной области техники и различаются в зависимости от географии, сезона, среды произрастания и времени. Списки видов сорняков доступны в сельскохозяйственных и научных обществах (таких как Американское общество по изучению сорняков и Канадское общество по изучению сорняков), государственных учреждениях (таких как Министерство сельского хозяйства США), а также промышленных и фермерских ассоциациях (например, Канадском совете по каноле).

[0068] В изобретении предложены способы борьбы с сорняками на участке выращивания Brassica путем применения дикамбы, при этом семена или растения, содержащие объект Brassica MON94100, высаживают на участке до, во время или после применения гербицида, а применение гербицида предотвращает или подавляет рост сорняков и не повреждает растения Brassica. Участок выращивания растений может содержать или не содержать семена или растения сорняков во время применения гербицида. Дикамбу, используемую в способах по данному изобретению, можно применять отдельно или в комбинации с одним или более гербицидами в течение вегетационного периода. Гербицид(ы), используемый(е) в способах по данному

изобретению, можно применять в комбинации с одним или более гербицидами временно (например, в виде смеси в резервуарах или в последовательных применениях), пространственно (например, в разное время в течение вегетационного периода, включая до и после посадки семян Brassica), или используя обе схемы.

5 Например, предложен способ борьбы с сорняками, который состоит из посадки семян, содержащих объект Brassica MON94100, на участке и применения гербицидно эффективного количества дикамбы в течение вегетационного периода, отдельно или в любой комбинации с другим гербицидом, с целью борьбы с сорняками на участке без повреждения растения, содержащего объект Brassica MON94100. Такое применение
10 может быть предпосадочным (в любое время до посева семян, содержащих объект Brassica MON94100, в том числе для целей сплошного действия, то есть нанесения на появляющиеся или существующие сорняки до посева семян), довсходовым (в любое время после посева семян, содержащих объект Brassica MON94100, и до появления всходов растений, содержащих объект Brassica MON94100) или после появления
15 всходов (в любое время после появления всходов растений, содержащих объект Brassica MON94100). Многократные применения дикамбы или комбинации дикамбы и одного или более других гербицидов вместе или по отдельности могут использоваться в течение вегетационного периода, например, два применения (например, предпосадочная обработка и послевсходовая обработка, или довсходовая обработка и
20 послевсходовая обработка) или три или более обработки (например, предпосадочная обработка и две послевсходовые обработки).

[0069] Применение гербицидов при практическом применении способов изобретения может производиться в рекомендованной коммерческой норме или в любой ее доле или кратной, например, в два раза превышающей рекомендованную
25 коммерческую норму. Нормы применения гербицидов могут быть выражены как кислотный эквивалент на фунт на акр (фунт к.э./акр) или активный ингредиент на фунт на акр (фунт действующего вещества на акр), в зависимости от гербицида и состава. Гербицидно эффективное количество дикамбы для использования на участке для борьбы с сорняками должно составлять от около 0,1 фунта к.э./акр до около 16 фунтов
30 к.э./акр в течение вегетационного периода (например, дикамба может применяться в количестве от около 0,5 фунтов к.э./акр до около 2,0 фунтов к.э./акр).

[0070] Изобретение относится к способам борьбы с самосевом Brassica, содержащим объект Brassica MON94100, на участке культивирования растений, посредством применения гербицидно-эффективного количества другого гербицида,

такого как синтетический ауксин, выбранный из группы, состоящей из 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты), бромоксирила (3,5-дибромо-4-гидроксibenзонитрила) и МСРА амина (4-хлор-2-метилфенокси укусной кислоты), причем применение гербицида предотвращает рост растений Brassica, содержащих объект Brassica MON94100. Гербицидно эффективное количество гербицида 2,4-D для использования на участке для борьбы с самосевом Brassica должно составлять от около 0,1 фунта к.э./акр до около 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода (например, 2,4-D может применяться в количестве от около 0,5 фунтов к.э./акр до около 2,0 фунтов к.э./акр). Гербицидно эффективное количество гербицида бромоксирила для использования на участке для борьбы с самосевом Brassica должно составлять от около 0,1 фунта к.э./акр до около 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода (например, бромоксирил может применяться в количестве от около 0,5 фунтов к.э./акр до около 2,0 фунтов к.э./акр). Гербицидно эффективное количество гербицида амина МСРА для использования на участке для борьбы с самосевом Brassica должно составлять от около 0,1 фунта к.э./акр до около 16 фунтов к.э./акр в течение вегетационного периода (например, МСРА амин может применяться в количестве от около 0,5 фунтов к.э./акр до около 2,0 фунтов к.э./акр).

[0071] Приведены способы получения растений и семян, содержащих объект Brassica MON94100. Растения можно разводить с использованием любого метода, известного в данной области техники, например, описания обычно используемых методов селекции можно найти в WR Fehr, в *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987). Растения могут быть самоопыляемыми (также известными как «самоопыленные») или перекрестноопыляемыми (также известными как «скрещенные»). Растения, содержащие объект Brassica MON94100, могут быть самоопыляемыми, чтобы получить истинную селекционную линию растений, гомозиготных по объекту Brassica MON94100. В результате самоопыления получается потомство, известное как «инбредное», и оно может использоваться для получения генетически однородных инбредных линий. В качестве альтернативы, растения, содержащие объект Brassica MON94100, можно подвергать перекрестному опылению (скрещивать с другим трансгенным или нетрансгенным растением) для получения сортовых или гибридных семян. Растения и семена-потомки, полученные способами по изобретению, содержат объект Brassica MON94100. Применение одного или более гербицидов, в отношении которых объект Brassica MON94100 придает толерантность, можно использовать для

отбора потомства, которое содержит объект Brassica MON94100. В качестве альтернативы, потомство может быть проанализировано с использованием диагностических методов для отбора растений или семян, содержащих объект Brassica MON94100. Потомство может быть сортовыми или гибридными растениями; могут
5 быть выращены из семян, полученных от растения, содержащего объект Brassica MON94100, или из семян, полученных от растения, опыленного пыльцой растения, содержащего объект Brassica MON94100; и может быть гомозиготным или гетерозиготным по объекту Brassica MON94100.

[0072] Растения, потомство, семена, клетки и части растений по изобретению
10 могут также содержать один или более дополнительных признаков Brassica или трансгенных объектов. Такая дополнительные признаки или трансгенные объекты включают, без ограничения, улучшенную устойчивость к насекомым, повышенную эффективность использования воды, повышенную урожайность, повышенную устойчивость к засухе, повышенное качество семян, улучшенное питательное качества,
15 получение гибридных семян, мужскую стерильность, и повышенную толерантность к гербицидам, при которых признак измеряется по отношению к растению Brassica, не имеющему такого трансгенного признака. Трансгенные объекты Brassica известны специалисту в данной области техники; например, список таких признаков предоставляется Службой инспекции здоровья животных и растений (APHIS)
20 Министерства сельского хозяйства США (USDA). Два или более трансгенных объекта могут быть объединены в семя или растении-потомке путем скрещивания двух родительских растений, каждое из которых содержит один или более трансгенных объектов, сбора семян-потомков и отбора семян или растений-потомков, которые содержат два или более трансгенных объекта; затем эти шаги можно повторять до тех
25 пор, пока не будет достигнута желаемая комбинация трансгенных объектов в потомстве. Также предполагается возвратное скрещивание с родительским растением и ауткроссинг с нетрансгенным растением, а также вегетативное размножение.

[0073] Депонирование репрезентативного образца семян, содержащих объект Brassica MON94100, было осуществлено в соответствии с Будапештским договором в
30 патентном депозитории Американской коллекции типовых культур (ATCC®) с адресом 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 (USA). Условный номер в ATCC (номер доступа) для семян, содержащих объект Brassica MON94100 - РТА-125182, а дата депонирования - 21 августа 2018 г. Депозит будет храниться в

депозитарии в течение 30 лет, или 5 лет после последнего запроса, или в течение срока действия патента, в зависимости от того, что позднее.

[0074] В контексте данного документа термин «содержащий» означает «включая, но не ограничиваясь этим».

5

ПРИМЕРЫ

[0075] Следующие ниже примеры включены для более полного описания изобретения. Описано конструирование и тестирование шести различных экспрессионных конструкций, получение 2775 уникальных трансформантов и анализ миллионов отдельных растений за пять лет посредством строгих молекулярных, агрономических и полевых испытаний, необходимых для создания и окончательного отбора объекта Brassica MON94100.

[0076] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в конкретных раскрытых примерах могут быть осуществлены модификации, и при этом будет получен аналогичный результат. Определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены агентами, описанными в данном документе, при достижении тех же или подобных результатов. Все такие замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются входящими в объем данного изобретения.

Пример 1: Проектирование экспрессионной конструкции, создание объектов и тестирование растений R0 и R1

[0077] В этом примере описывается дизайн шести различных экспрессионных конструкций для толерантности к дикамбе, получение тысяч уникальных объектов Brassica с использованием растительных векторов, содержащих эти конструкции, а также анализ и тестирование полученных трансгенных растений Brassica в двух поколениях (R0 и R1).

[0078] Шесть экспрессионных конструкций были сконструированы и клонированы в векторы трансформации растений. Были разработаны четыре конструкции одиночных экспрессионных кассет (DT-1, DT-2, DT-3 и DT-4), каждая из которых имеет уникальную комбинацию элементов экспрессии и функционально связанных трансгенов DMO, что позволяет тестировать три разных промотора, три разных СТР и два разных варианта DMO у растений Brassica. Были разработаны две конструкции двойных экспрессионных кассет (DT-5 и DT-6), каждая из которых имеет

30

уникальную комбинацию элементов экспрессии и функционально связанных трансгенов DMO, что позволяет тестировать два разных промотора, два разных СТР и два разных варианта трансгена DMO в комбинации с той же кассетой экспрессии CP4-EPSPS. Конструкции показаны в таблице 2. Шесть экспрессионных конструкций затем клонировали в векторы трансформации растений.

Таблица 2: Конфигурации для экспрессионных конструкций

Конструкция	кассета 1 (DMO)			кассета 2 (CP4)		
	Промотор	Интересующий ген	3' НТО	Промотор	Интересующий ген	3' НТО
DT-1	PCSV	Ps.RbcS/DMOс	Mt.AC			
DT-2	P-1	СТР-1/DMOс	Mt.AC			
DT-3	P-2	СТР-2/DMOw	Mt.AC			
DT-4	P-2+E	СТР-2/DMOw	Mt.AC			
DT-5	P-2+E	СТР-2/DMOw	Mt.AC	P-3	СТР-3/CP4	UTR-1
DT-6	PCSV	Ps.RbcS/DMOс	Mt.AC	P-3	СТР-3/CP4	UTR-1

[0079] Шесть векторов трансформации растений использовали для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации линии-восстановителя фертильности *Brassica napus* сорта 65037 (заявка на права заводчиков Канады 06-5517) с использованием способов, известных в данной области техники, для получения 2775 уникальных трансформантов. Каждое трансформант получали путем случайной вставки трансгена в геном *Brassica* в уникальном месте. Затем растения R0 регенерировали из трансгенных клеток, а укоренившиеся растения с нормальными фенотипическими характеристиками переносили в почву для роста и дальнейшей оценки.

[0080] 2775 растений R0 анализировали на присутствие единственной интактной копии трансгенной вставки и отсутствие каркасной последовательности вектора. В результате этого первоначального молекулярного анализа 201 уникальный объект был определен как объект самого высокого качества для продвижения.

[0081] Отобранные растения, представляющие конструкции DT-1, DT-2 и DT-3, использовали для тестирования эффективности признака R0 (толерантность к дикамбе) в теплице. Дикамбу применяли при норме распыления либо 1,0 фунт к.э./акр гербицида Clarity® (2-кратная норма), либо 2,0 фунта к.э./акр гербицида Clarity (4-кратная норма) на стадии роста V3. Повреждение растений, вызванное дикамбой, оценивали визуально, основываясь на оценке эпинастии растений (изгиб или скручивание листа), снижения роста, хлороз и некроз. Растения с повреждениями более 20 % были

отбракованы. Растения R0 для конструкций DT-1 и DT-3 продемонстрировали толерантность (менее 20 % повреждений) к двукратной норме опрыскивания теплиц, но все растения R0 для конструкции DT-2 показали повреждение дикамбой более чем на 20 % к двукратной норме. Анализ этих данных привел к решению не
5 усовершенствовать никаких объектов, произведенных с помощью конструкции DT-2.

[0082] Комбинируя данные молекулярного анализа и тестирование толерантности к дикамбе R0, из начальных 2775 уникальных трансформантов, полученных с использованием шести векторов трансформации, было отобрано 206 уникальных объектов для усовершенствования. Растения R0 для выбранных объектов
10 самоопыляли с получением гомозиготных семян для тестирования R1.

[0083] Тепличные испытания на толерантность к дикамбе были проведены с растениями R1 для 169 уникальных объектов. Дикамбу применяли с нормой опрыскивания 1120 г к.э./га гербицида Clarity (двукратная норма) на стадии роста V3. Для двухкассетных объектов (производимых с использованием DT-5 или DT-6)
15 дикамбу применяли в виде баковой смеси с глифосатом при нормах распыления 3600 г к.э./га Roundup® (двукратная норма). Вызванное дикамбой повреждение растений оценивали, как описано выше. Приоритет для развития растений был отдан на основании симптомов низкой концентрации дикамбы.

[0084] Растения R1 продемонстрировали средний уровень повреждения 7,48 % для конструкции DT-1; 72,66 % для конструкции DT-3; 20,7 % для конструкции DT-5; и 33,4 % для конструкции DT-6. Однако индивидуальные объекты с повреждением менее 20 % были усовершенствованы, только если повреждение не было эпинастическим. В результате было выбрано 9 объектов из конструкции DT-1, 17 объектов из конструкции DT-5 и 9 объектов из конструкции DT-6 в дополнение к одному объекту из
25 конструкции DT-4.

[0085] Тридцать шесть (36) уникальных объектов были отобраны для продвижения к полевым испытаниям F1 на основе анализа данных начального молекулярного анализа (для количества копий, неповрежденной вставки и отсутствия каркаса вектора) и тепличной оценки толерантности R0 и R1 к гербициду. Данные для
30 этого приведены в таблице 3. Растения R1 для выбранных объектов были перекрестно опылены с обычными растениями для получения семян.

Таблица 3: Количество уникальных объектов в растениях R0 и R1

Конструкция	Кол-во уникальных объектов	Объекты, полученные на основе молекулярного анализа и тестов эффективности R0	Объекты, полученные на основе тестов эффективности R1
DT-1	558	17	9
DT-2	459	0	0
DT-3	537	28	0
DT-4	18	1	1
DT-5	579	51	17
DT-6	624	109	9
Всего	2775	184	36

Пример 2: Полевые испытания в первом сезоне

[0086] В этом примере описываются полевые испытания в первом сезоне растений, содержащих каждый из 36 уникальных объектов, полученных при анализе R1. Для каждого уникального объекта в полевых испытаниях первого сезона тысячи растений были протестированы в поле в течение двух лет в 8–13 различных местах на предмет эффективности (толерантность к дикамбе), агрономических показателей и урожайности. Эти данные были проанализированы для сравнения эффективности каждого объекта в полевых условиях на всех растениях и во всех местах. Затем данные полевых испытаний первого сезона были использованы для выбора лучших объектов для перехода на полевые испытания второго сезона.

[0087] Гибридные растения F1 для полевых испытаний получали путем перекрестного опыления женской родительской линии *Brassica napus* с растениями R1 или R2 для выбранных объектов с получением гибридных семян F1 (гемизиготных по данному объекту). В течение каждого из двух лет, в течение которых проводились полевые испытания первого сезона, различные родительские женские особи линии *Brassica napus* подвергались перекрестному опылению растениями R1 для выбранных объектов с получением гибридных семян F1. Женская родительская линия также была перекрестно опылена с нетрансгенным растением из того же генетического фона, что и линия R1, для использования в качестве контроля. Эта стратегия обеспечивала тестирование объектов в различных родительских линиях женских растений и использование соответствующего контроля для сравнений.

[0088] В ходе тестирования первого сезона для полевых испытаний было отобрано 36 уникальных объектов из исходных 2775 объектов. Эти 36 объектов представляют лучшие объекты из четырех различных экспрессионных конструкций: девять объектов для конструкции DT-1, один объект для конструкции DT-4, семнадцать объектов для конструкции DT-5 и девять объектов для конструкции DT-6. Испытания первого сезона проводили в течение двух лет, но для каждого случая полевые испытания агрономической эффективности первого сезона проводились одновременно (в течение одного сезона) с полевыми испытаниями эффективности признаков первого сезона. Во всех полевых испытаниях использовалась рандомизированная полноблочная схема эксперимента, и они проводились в 8–13 различных местах в Северной Америке.

[0089] В испытаниях эффективности признаков первого сезона гибридные растения F1 оценивали на толерантность к дикамбе. Были протестированы два применения дикамбы на объектах для всех следующих вариантов: обработка 1 (TRT1) включала предвсходовую обработку 2,4 кг к.э./га (двукратную коммерческую норму) BANVEL® II и послевсходовую обработку на стадии трех листьев (V3) 1,2 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма) BANVEL® II; Обработка 2 (TRT2) включала предвсходовую обработку 2,4 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма), послевсходовую обработку BANVEL® II при V3 1,2 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма) BANVEL® II и послевсходовую обработку на стадии первого цветка 1,2 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма) BANVEL® II. Через семь суток после каждого применения (V3 или первый цветок, соответственно) процент повреждения растений, вызванный гербицидом, оценивали визуально, основываясь на оценке эпинастии растений (изгиб или скручивание листа), замедления роста, хлороз и некроз. Агрономические баллы собирались в течение всего сезона полевых испытаний. В конце сезона определяли урожайность в фунтах/акр (фунт/акр).

[0090] Были собраны данные об эффективности признаков из полевых испытаний первого сезона. Для каждого уникального объекта был проанализирован мета-анализ совокупных данных по всем местам и всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признаков первого сезона для сравнения рейтингов повреждения гибридов. В таблице 4 представлена средняя оценка повреждения для каждого объекта для двух схем обработки дикамбой во всех местах (НД указывает на отсутствие данных по обработке). Мета-анализ полевых испытаний эффективности признака в течение каждого сезона показал, что в среднем растения из всех объектов имели низкое повреждение, вызванное дикамбой, но объекты из конструкций DT-1 и

DT-4 продемонстрировали исключительно хорошие результаты с более низкими оценками повреждения.

Таблица 4: Мета-анализ оценки повреждения по результатам полевых испытаний эффективности признаков первого сезона

Конструкция	Объект	TRT1 % повреждения	TRT1 Стд. ошибка	TRT2 % повреждения	TRT2 Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-1	MON94100	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	170060	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	169242	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	169934	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	170631	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	169703	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	169250	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	169954	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-1	170020	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-4	68403	< 1 %	НД	< 1 %	НД	3	11	~49500
DT-5	26258	НД	НД	3,59	1,63	3	8	~36000
DT-5	40784	НД	НД	2,92	1,56	3	8	~36000
DT-5	40804	НД	НД	2,36	1,56	3	8	~36000
DT-5	40807	НД	НД	2,81	1,59	3	8	~36000
DT-5	40810	НД	НД	2,31	1,56	3	8	~36000
DT-5	40819	НД	НД	1,88	1,56	3	8	~36000
DT-5	40834	НД	НД	3,33	1,56	3	8	~36000
DT-5	40847	НД	НД	3,96	1,56	3	8	~36000
DT-5	43118	НД	НД	2,69	1,56	3	8	~36000
DT-5	43166	НД	НД	2,92	1,56	3	8	~36000
DT-5	43167	НД	НД	3,14	1,56	3	8	~36000
DT-5	43185	НД	НД	2,94	1,57	3	8	~36000
DT-5	43206	НД	НД	2,41	1,61	3	8	~36000
DT-5	43237	НД	НД	2,28	1,56	3	8	~36000
DT-5	43296	НД	НД	2,08	1,56	3	8	~36000
DT-5	43299	НД	НД	3,75	1,56	3	8	~36000
DT-5	43325	НД	НД	2,08	1,56	3	8	~36000
DT-6	61734	НД	НД	1,88	1,56	3	8	~36000
DT-6	61737	НД	НД	2,29	1,56	3	8	~36000
DT-6	61757	НД	НД	2,71	1,56	3	8	~36000
DT-6	75997	НД	НД	1,97	1,58	3	8	~36000

Конструкция	Объект	TRT1 % повреждения	TRT1 Стд. ошибка	TRT2 % повреждения	TRT2 Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-6	76023	НД	НД	2,58	1,60	3	8	~36000
DT-6	83521	НД	НД	2,29	1,56	3	8	~36000
DT-6	83528	НД	НД	2,00	1,61	3	8	~36000
DT-6	83535	НД	НД	2,50	1,56	3	8	~36000
DT-6	83613	НД	НД	2,08	1,57	3	8	~36000

[0091] Были собраны данные по урожайности из полевых испытаний эффективности признаков первого сезона. Для каждого уникального события был выполнен мета-анализ совокупных данных об урожайности по всем участкам и по всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признаков первого сезона для сравнения. В таблице 5 представлены средние показатели урожайности в фунтах/акр (фунты/акр) для каждого объекта для двух схем обработки дикамбой во всех местах (НД означает, что данные по обработке отсутствуют). Мета-анализ урожайности для полевых испытаний эффективности признака в течение каждого сезона показал, что в среднем растения из всех объектов давали урожай, сравнимый с необработанными контрольными растениями. Мета-анализ скомпилированных данных для растений, содержащих объекты из конструкции DT-6, продемонстрировал в среднем заметно более низкий урожай, чем у растений, содержащих объекты из конструкции DT-5.

Таблица 5: Мета-анализ урожайности по результатам полевых испытаний эффективности черт первого сезона

Конструкция	Объект	Без Обра- ботки	TRT1	TRT2	Стд. ошиб- ка	Пов- тор- ности	Место	Всего семян
DT-1	MON94100	2842,4	2938,1	2872,9	125,0	3	11	~49500
DT-1	170060	2921,3	2871,0	2839,4	125,0	3	11	~49500
DT-1	169242	2807,9	2855,8	2909,9	125,0	3	11	~49500
DT-1	169934	2869,2	2842,6	2874,5	125,0	3	11	~49500
DT-1	170631	2838,1	2819,6	2857,5	125,0	3	11	~49500
DT-1	169703	2808,9	2833,8	2879,0	125,0	3	11	~49500
DT-1	169250	2759,2	2790,4	2845,0	125,0	3	11	~49500
DT-1	169954	2743,3	2660,7	2690,8	125,0	3	11	~49500
DT-1	170020	2754,3	2743,9	2737,3	125,0	3	11	~49500
DT-4	68403	2480,4	2331,9	2524,7	125,0	3	11	~49500
DT-5	26258	2441,5	НД	2543,7	201,8	3	8	~36000
DT-5	40784	2504,0	НД	2492,7	199,6	3	8	~36000
DT-5	40804	2496,7	НД	2554,6	200,2	3	8	~36000

Конструкция	Объект	Без Обра- ботки	TRT1	TRT2	Стд. ошиб- ка	Пов- тор- ности	Место	Всего семян
DT-5	40807	2458,0	НД	2539,3	200,9	3	8	~36000
DT-5	40810	2503,8	НД	2557,0	199,9	3	8	~36000
DT-5	40819	2442,6	НД	2617,8	199,6	3	8	~36000
DT-5	40834	2529,3	НД	2623,6	199,9	3	8	~36000
DT-5	40847	2496,0	НД	2513,6	199,6	3	8	~36000
DT-5	43118	2451,0	НД	2567,3	199,6	3	8	~36000
DT-5	43166	2411,2	НД	2517,0	199,6	3	8	~36000
DT-5	43167	2515,6	НД	2550,5	199,6	3	8	~36000
DT-5	43185	2478,5	НД	2528,4	200,6	3	8	~36000
DT-5	43206	2426,8	НД	2570,1	201,8	3	8	~36000
DT-5	43237	2317,5	НД	2503,8	199,6	3	8	~36000
DT-5	43296	2536,0	НД	2544,6	199,6	3	8	~36000
DT-5	43299	2396,9	НД	2601,3	199,6	3	8	~36000
DT-5	43325	2618,5	НД	2554,6	199,6	3	8	~36000
DT-6	61734	2381,7	НД	2577,1	199,6	3	8	~36000
DT-6	61737	2484,6	НД	2557,8	199,6	3	8	~36000
DT-6	61757	2471,8	НД	2477,4	199,6	3	8	~36000
DT-6	75997	2527,7	НД	2482,6	200,6	3	8	~36000
DT-6	76023	2501,8	НД	2528,9	201,8	3	8	~36000
DT-6	83521	2486,7	НД	2526,5	199,6	3	8	~36000
DT-6	83528	2589,1	НД	2515,5	201,3	3	8	~36000
DT-6	83535	2415,4	НД	2627,3	199,6	3	8	~36000
DT-6	83613	2486,6	НД	2549,2	200,2	3	8	~36000

[0092] В испытаниях агрономической эффективности первого сезона гибридные растения F1 оценивали в отношении агрономических характеристик и урожайности. Участки поддерживались свободными от сорняков, и тестируемый гербицид (дикамба или дикамба и глифосат) не применялся в течение вегетационного периода. Для всех объектов проводили агрономическую оценку: ранняя активность роста, дружность всходов, дата появления первого цветка, дата окончания цветения, высота растения, дата созревания, фактическая масса собранного зерна, процент влажности зерна, дата сбора урожая и, если применимо, устойчивость, осыпание колосьев, заболеваемость *Sclerotinia* и давление насекомых и заболеваний. Агрономические баллы собирались в течение всего сезона полевых испытаний. В конце сезона определялась агрономическая урожайность в фунтах/акр (фунт/акр).

[0093] Были собраны данные по урожайности из полевых испытаний агрономической эффективности первого сезона. Для каждого уникального объекта был проведен мета-анализ совокупных данных урожайности по всем участкам и по всем

отдельным растениям для агрономических полевых испытаний первого сезона для сравнения. В таблице 6 представлена средняя урожайность в фунтах на акр (фунт/акр) для каждого объектах во всех местах. Мета-анализ урожайности для агрономических полевых испытаний в течение каждого сезона показал, что в среднем растения из всех событий давали урожай, сравнимый с необработанными контрольными растениями, за исключением объекта 68403 из конструкции DT-4 и объектов 43166 и 43237 из конструкцию DT-5, которые имели заметно меньший урожай. Четыре объекта из конструкции DT-1 имели заметно более низкий агрономический урожай, чем другие пять объектов из конструкции DT-1.

10 **Таблица 6: Мета-анализ урожайности по результатам агрономических полевых испытаний первого сезона**

Конструкция	Объект	Контрольный урожай	Стд. ошибка	Объект Выход	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-1	MON94100	3112,63	238,21	3044,03	235,80	4	13	~78000
DT-1	170060	3112,63	238,30	3040,19	235,80	4	13	~78000
DT-1	169242	3112,63	238,30	3096,13	235,80	4	13	~78000
DT-1	169934	3112,63	238,12	3024,22	235,80	4	13	~78000
DT-1	170631	3112,63	238,21	3023,24	235,80	4	13	~78000
DT-1	169703	3112,63	238,30	2975,86	235,80	4	13	~78000
DT-1	169250	3112,63	238,39	2957,04	235,80	4	13	~78000
DT-1	169954	3112,63	238,12	2942,50	235,80	4	13	~78000
DT-1	170020	3112,63	238,30	2920,91	235,80	4	13	~78000
DT-4	68403	3112,63	238,12	2835,35	235,80	4	13	~78000
DT-5	26258	2625,86	156,04	2542,26	161,48	4	9	~54000
DT-5	40784	2625,86	156,04	2519,60	161,75	4	9	~54000
DT-5	40804	2625,86	156,04	2452,60	161,48	4	9	~54000
DT-5	40807	2625,86	156,04	2577,59	162,11	4	9	~54000
DT-5	40810	2625,86	156,04	2561,00	161,75	4	9	~54000
DT-5	40819	2625,86	156,04	2674,75	161,75	4	9	~54000
DT-5	40834	2625,86	156,04	2597,13	161,48	4	9	~54000
DT-5	40847	2625,86	156,04	2562,87	161,48	4	9	~54000
DT-5	43118	2625,86	156,04	2586,34	161,48	4	9	~54000
DT-5	43166	2625,86	156,04	2461,79	161,48	4	9	~54000
DT-5	43167	2625,86	156,04	2526,65	161,75	4	9	~54000
DT-5	43185	2625,86	156,04	2552,44	161,48	4	9	~54000
DT-5	43206	2625,86	156,04	2465,98	161,48	4	9	~54000
DT-5	43237	2625,86	156,04	2436,54	161,75	4	9	~54000
DT-5	43296	2625,86	156,04	2569,12	161,48	4	9	~54000
DT-5	43299	2625,86	156,04	2555,65	161,75	4	9	~54000
DT-5	43325	2625,86	156,04	2507,47	162,11	4	9	~54000

Конструкция	Объект	Контрольный урожай	Стд. ошибка	Объект Выход	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-6	61734	2625,86	156,04	2615,07	161,48	4	9	~54000
DT-6	61737	2625,86	156,04	2599,27	162,11	4	9	~54000
DT-6	61757	2625,86	156,04	2596,95	161,48	4	9	~54000
DT-6	75997	2625,86	156,04	2603,56	161,48	4	9	~54000
DT-6	76023	2625,86	156,04	2538,96	161,84	4	9	~54000
DT-6	83521	2625,86	156,04	2566,44	161,75	4	9	~54000
DT-6	83528	2625,86	156,04	2559,93	161,48	4	9	~54000
DT-6	83535	2625,86	156,04	2536,29	161,75	4	9	~54000
DT-6	83613	2625,86	156,04	2577,33	161,48	4	9	~54000

[0094] Данные, накопленные в полевых испытаниях с гибридными растениями, оценивающие (1) эффективность признака для коммерческих показателей толерантности к дикамбе и (2) агрономические характеристики были проанализированы для 36 объектов, протестированных для конструкций DT-1, DT-4, DT-5, и DT-6. Этот анализ для каждого объекта был объединен с результатами углубленной молекулярной характеристики, описанной в Примере 3, чтобы выбрать события для перехода на полевые испытания второго сезона.

Пример 3: Молекулярная характеристика

[0095] Этот пример описывает обширную молекулярную характеристику выбранных объектов, которая была проведена одновременно с полевыми испытаниями. Молекулярная характеристика каждого объекта использовалась, чтобы определить, следует ли выбрать объект для усовершенствования.

[0096] Анализ объектов ДНК и РНК проводили с использованием различных методик, известных в данной области техники. Саузерн-блот-анализ выполняли на геномной ДНК для подтверждения того, что трансгенные растения содержали единственную копию всей вставки трансгена без какого-либо каркаса вектора. Амплификацию и секвенирование ДНК использовали для подтверждения состава и неповрежденности последовательности вставки в трансгенной вставке для каждого объекта. ДНК, фланкирующая каждый конец трансгенной вставки (5' и 3' концы), секвенировали и определяли соответствующие соединения. Нозерн-анализ проводили для обнаружения и измерения транскриптов мРНК гена *dmo* и гена *cp4* (если применимо) в трансгенных растениях для каждого объекта.

[0097] Анализ белков растений, содержащих каждый объект, проводили с использованием методик, известных в данной области техники. N-концевое секвенирование белка DMO, очищенного из трансгенных растений, содержащих каждый объект, было выполнено для подтверждения последовательности рекомбинантного белка. Вестерн-блоттинг был проведен на экстрактах белков из растений, содержащих каждый объект, для подтверждения продуцирования белка DMO. Иммуноферментный анализ (ИФА) использовали для определения уровней белка DMO в листьях, семенах, корнях и пыльце растений.

[0098] Были проанализированы сайты встраивания каждого объекта в геноме. Фланкирующую последовательность использовали для биоинформатического анализа хромосомного местоположения объекта, и сайт вставки для каждого объекта был сопоставлен с общедоступным геномом *Brassica napus* (Boulos Chalhoub, et al. "Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome", Science, Vol 345 Issue 6199 (22 August 2014). Амплификацию ДНК по аллелю дикого типа в геноме проводили с использованием праймеров, специфичных для фланкирующих областей каждого объекта. Последовательность сайта инсерции дикого типа использовали для картирования уникального сайта интеграции трансгена для данного объекта с эталонным геномом *Brassica napus*.

[0099] Подробный анализ молекулярных характеристик для каждого объекта был объединен с данными об эффективности признака и агрономических характеристиках полевых испытаний первого сезона для каждого объекта. Используя эту объединенную информацию, было отобрано 13 уникальных объектов для продвижения из 36, протестированных в полевых испытаниях первого сезона. После анализа ни один из 9 объектов для конструкции DT-6 не был выбран для усовершенствования; 10 из 17 объектов от DT-5 не были усовершенствованы; и тринадцать уникальных объектов были отобраны для усовершенствования: пять объектов для конструкции DT-1, один объект для конструкции DT-4 и семь объектов для конструкции DT-5.

Пример 4: Полевые испытания второго сезона

[00100] В этом примере описываются полевые испытания растений второго сезона, содержащие каждый из 13 уникальных объектов, полученных из полевых испытаний первого сезона. Для каждого уникального объекта в полевых испытаниях второго сезона тысячи растений были испытаны в поле в течение двух лет в нескольких

местах на предмет эффективности (толерантности к дикамбе и глифосату), агрономических характеристик и урожайности. Эти данные были проанализированы для сравнения эффективности каждого объекта в полевых условиях на всех растениях и во всех местах. Затем данные полевых испытаний второго сезона были использованы для выбора лучших объектов для перехода к полевым испытаниям третьего сезона.

[00101] Гибридные растения F1 для полевых испытаний второго сезона получали путем перекрестного опыления женской родительской линии *Brassica napus* с растениями R2 для выбранных объектов с получением гибридных семян F1 (гемизиготных по данному объекту). Родительские женские линии, содержащие коммерческий объект толерантности к глифосату (обозначенный как RR), использовали для скрещивания с растениями R2, содержащими конструкции DT-1 и DT-4, с получением таким образом растений F1, толерантных как к дикамбе, так и к глифосату. Для каждого из двух лет, в течение которых проводились полевые испытания второго сезона, 1-3 различных родительских женских линии *Brassica napus* были перекрестно опылены растениями R2 для выбранных событий с получением гибридных семян F1. Женская родительская линия также была перекрестно опылена с нетрансгенным растением из того же генетического фона, что и линия R2, для использования в качестве контроля. Эта стратегия обеспечивала тестирование объектов в различных родительских линиях женских растений и использование соответствующего контроля для сравнений.

[00102] В тестировании второго сезона 13 уникальных объектов, выбранных для тестирования, представляли собой пять объектов для конструкции DT-1, один объект для конструкции DT-4 и семь объектов для конструкции DT-5. Испытания второго сезона проводились в течение двух лет, но для каждого случая полевые испытания агрономической эффективности второго сезона проводились одновременно (в течение одного сезона) с полевыми испытаниями эффективности признаков второго сезона. Во всех полевых испытаниях использовалась рандомизированная полноблочная схема эксперимента, и они проводились в 4–9 различных местах в Северной Америке.

[00103] Во втором сезоне испытаний эффективности признаков гибридные растения F1 оценивали на толерантность к дикамбе и глифосату. Растения обрабатывали послеуборочным внесением (в виде баковой смеси) 1,2 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма) дикамбы (BANVEL II) и 1,8 кг к.э./га глифосата (Roundup) на стадии V3 с последующим внесением 1,2 кг к.э./га (двукратная коммерческая норма) дикамбы (BANVEL II) и 1,8 кг к.э./га глифосата (Roundup) на

стадии первых цветков. Через семь суток после каждого применения (V3 или первый цветок, соответственно) процент повреждения растений, вызванный гербицидом, оценивали визуально, основываясь на оценке эпинастии растений (изгиб или скручивание листа), замедления роста, хлороз и некроз. Агронимические баллы собирались в течение всего сезона полевых испытаний. В конце сезона определяли урожайность в фунтах/акр (фунт/акр).

[00104] Были собраны данные об эффективности признаков из полевых испытаний второго сезона. Для каждого уникального объекта был проанализирован метаанализ совокупных данных по всем местам и всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признака для сравнения рейтингов повреждений гибридов. В таблице 7 представлена средняя оценка повреждений для каждого объекта для схемы обработки во всех местах. Мета-анализ полевых испытаний эффективности признака в течение каждого сезона показал, что в среднем растения из конструкций DT-1 и DT-4 продемонстрировали исключительно хорошие результаты с более низкими показателями повреждения гербицидами.

Таблица 7: Мета-анализ рейтинга повреждения по результатам полевых испытаний эффективности признаков второго сезона

Конструкция	Объект(ы)	% повреждения	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-1	RR x MON94100	6,67	1,65	3	4	~18000
DT-1	RR x 170060	7,9	1,75	3	4	~18000
DT-1	RR x 169242	11,05	1,83	3	4	~18000
DT-1	RR x 169934	6,49	1,61	3	4	~18000
DT-1	RR x 170631	7,09	1,80	3	4	~18000
DT-4	RR x 68403	9,65	1,82	3	8	~36000
DT-5	40807	16,9	2,41	3	9	~81000
DT-5	40810	16,72	2,40	3	9	~81000
DT-5	40819	16,92	2,43	3	9	~81000
DT-5	40834	17,71	2,43	3	9	~81000
DT-5	43185	17,47	2,39	3	9	~81000
DT-5	43296	17,84	2,39	3	9	~81000
DT-5	43325	17,31	2,39	3	9	~81000

[00105] Были собраны данные по урожайности полевых испытаний эффективности признаков второго сезона. Для каждого уникального объекта был проведен мета-анализ совокупных данных по урожайности по всем местам и по всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признаков второго сезона для сравнения. В таблице 8 представлены средние показатели урожайности в

фунтах/акр (фунты/акр) для опрысканных и не опрысканных растений (контроль) для каждого случая для схемы обработки во всех местах. Мета-анализ урожайности для полевых испытаний эффективности признака в течение каждого сезона показал, что в среднем растения, содержащие объект Brassica MON94100, имели самый высокий урожай по сравнению с растениями для других 12 объектов при опрыскивании дикамбой и глифосатом.

Таблица 8: Мета-анализ урожайности по результатам полевых испытаний эффективности признаков второго сезона

Конструкция	Объект(ы)	Контроль	Опрыскивание	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-1	RR x MON94100	2785,1	2829,4	141	3	4	~18000
DT-1	RR x 170060	2714,6	2350,9	148,4	3	4	~18000
DT-1	RR x 169242	2846,0	2658,3	154,3	3	4	~18000
DT-1	RR x 169934	2870,1	2736,4	137,3	3	4	~18000
DT-1	RR x 170631	2762,2	2731,4	148,9	3	4	~18000
DT-4	RR x 68403	2539,8	2464,1	199,9	3	8	~36000
DT-5	40807	2908,4	2457,9	230,5	3	6	~54000
DT-5	40810	2842,8	2443,0	230,2	3	6	~54000
DT-5	40819	2831,7	2328,2	230,3	3	6	~54000
DT-5	40834	2921,3	2447,9	230,3	3	6	~54000
DT-5	43185	2870,3	2429,5	230,1	3	6	~54000
DT-5	43296	2823,0	2425,8	230,1	3	6	~54000
DT-5	43325	2969,1	2533,8	230,1	3	6	~54000

[00106] В испытания агрономической продуктивности второго сезона гибридные растения F1 оценивали на агрономические характеристики и урожай, как описано в Примере 2. В конце сезона определяли агрономический урожай в фунтах/акр (фунт/акр). Были собраны данные по урожайности из полевых испытаний агрономической эффективности второго сезона. Для каждого уникального объекта был проведен мета-анализ совокупных данных урожайности по всем местам и по всем отдельным растениям для агрономических полевых испытаний второго сезона для сравнения. В таблице 9 представлена средняя урожайность в фунтах на акр (фунт/акр) для каждого объектах во всех местах. Мета-анализ урожайности для агрономических полевых испытаний в течение каждого сезона продемонстрировал, что в среднем растения из всех объектов имели урожай, сравнимый с контрольными растениями, за исключением заметно более низкого урожая для объекта 40819 для конструкции DT-5.

Таблица 9: Мета-анализ урожайности по результатам агрономических полевых испытаний второго сезона

Конструкция	Объект	Контрольный урожай	Стд. ошибка	Объект Выход	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-1	MON94100	2513,27	171,57	2453,28	172,49	4	9	~162,000
DT-1	170060	2513,27	171,57	2515,65	175,52	4	9	~162,000
DT-1	169242	2513,27	171,57	2501,70	171,97	4	9	~162,000
DT-1	169934	2513,27	171,57	2484,87	171,30	4	9	~162,000
DT-1	170631	2513,27	171,57	2453,91	173,71	4	9	~162,000
DT-1	169703	2513,27	171,57	2411,77	173,89	4	9	~162,000
DT-1	169250	2513,27	171,57	2493,73	175,22	4	9	~162,000
DT-1	169954	2513,27	171,57	2455,10	177,10	4	9	~162,000
DT-1	170020	2513,27	171,57	2457,30	187,83	4	9	~162,000
DT-4	68403	2585,18	156,04	2589,55	161,48	4	6	~54000
DT-5	40807	2647,04	386,40	2590,38	375,82	4	6	~72000
DT-5	40810	2647,04	386,40	2629,07	378,73	4	6	~72000
DT-5	40819	2647,04	386,40	2502,89	375,93	4	6	~72000
DT-5	40834	2647,04	386,40	2585,98	375,73	4	6	~72000
DT-5	43185	2647,04	386,40	2670,88	378,73	4	6	~72000
DT-5	43296	2647,04	386,40	2606,68	378,73	4	6	~72000
DT-5	43325	2647,04	386,40	2685,73	378,73	4	6	~72000

[00107] Данные, накопленные в результате молекулярного анализа и полевых испытаний с гибридными растениями, оценивающих (1) эффективность признаков для коммерческих показателей толерантности к дикамбе и глифосату и (2) агрономические характеристики, были проанализированы для 13 объектов, протестированных для конструкций DT-1, DT-4 и DT-5. Анализ эффективности признака, агрономических показателей и данных урожайности из полевых испытаний второго сезона для каждого объекта был объединен с результатами углубленной молекулярной характеристики, описанной в Примере 3, чтобы выбрать четыре уникальных объекта для тестирования в полевых испытаниях третьего сезона. Четыре уникальных объекта представляют собой два объекта для конструкции DT-1 и два объекта для конструкции DT-5.

Пример 5: Полевые испытания третьего сезона

[00108] В этом примере описываются полевые испытания растений третьего сезона, содержащие каждый из 4 уникальных объектов, полученных после полевых испытаний второго сезона. Для каждого уникального объекта в полевых испытаниях третьего сезона тысячи растений были протестированы в полевых условиях в течение двух лет в различных местах на предмет эффективности (толерантность к дикамбе),

агрономических характеристик и урожайности. Эти данные были проанализированы для сравнения эффективности каждого объекта в полевых условиях на всех растениях и во всех местах. Затем данные полевых испытаний третьего сезона были использованы для выбора лучшего объекта для коммерциализации.

5 [00109] Гибридные растения F1 для полевых испытаний третьего сезона были получены путем перекрестного опыления женской родительской линии *Brassica napus* с растениями R2 или R3 для выбранных объектов с получением гибридных семян F1 (гемизиготных по данному объекту). В течение каждого из двух лет, в течение которых проводились полевые испытания третьего сезона, 2-3 различных родительских женских
10 линии *Brassica napus* были перекрестно опылены растениями R1 для выбранных объектов для получения гибридных семян F1. Женская родительская линия также была перекрестно опылена с нетрансгенным растением из того же генетического фона, что и линия R2 или R3, для использования в качестве контроля. Эта стратегия обеспечивала тестирование объектов в различных родительских линиях женских растений и
15 использование соответствующего контроля для сравнений.

[00110] Испытания третьего сезона проводились в течение двух лет, но для каждого случая полевые испытания агрономической эффективности третьего сезона проводились одновременно (в течение одного сезона) с полевыми испытаниями эффективности признаков третьего сезона. Во всех полевых испытаниях
20 использовалась рандомизированная полноблочная схема эксперимента, и они проводились в 5–10 различных местах в Северной Америке.

[00111] В испытаниях эффективности признаков третьего сезона гибридные растения F1 оценивали на толерантность к дикамбе с использованием гербицида XtendiMax® и, как описано в Примере 2, и в конце сезона определяли урожай в
25 фунтах/акр (фунт/акр). Были собраны данные об эффективности признаков из полевых испытаний третьего сезона. Для каждого уникального объекта был проанализирован метаанализ совокупных данных по всем местам и всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признака для сравнения рейтингов повреждений гибридов. В таблице 10 представлена средняя оценка повреждений для каждого
30 объекта для схемы обработки во всех местах. Мета-анализ полевых испытаний эффективности признака в течение каждого сезона показал, что в среднем растения из конструкций DT-1 показали исключительно хорошие результаты с более низкими показателями повреждения гербицидом.

Таблица 10: Мета-анализ рейтинга повреждений по результатам полевых испытаний эффективности признаков третьего сезона

Конструкция	Объект	TRT1 % повреждений	TRT1 Стд. ошибка	TRT2 % повреждения	TRT2 Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-5	43296	НД	НД	1,03	1,12	3	9	~121500
DT-5	43325	НД	НД	1,11	1,12	3	9	~121500
DT-1	MON94100	0,13	0,22	0,23	0,06	4	10	~120000
DT-1	170060	0,02	0,21	0,25	0,07	4	10	~120000

[00112] Были собраны данные по урожайности из полевых испытаний эффективности признаков третьего сезона. Для каждого уникального объекта для сравнения был проведен мета-анализ совокупных данных по урожайности по всем местам и по всем отдельным растениям для полевых испытаний эффективности признаков третьего сезона. В таблице 11 представлены средние показатели урожайности в фунтах/акр (фунты/акр) для каждого объекта для двух схем обработки дикамбе во всех местах (НД означает, что данные по обработке отсутствуют). Мета-анализ урожайности для полевых испытаний на эффективность признака продемонстрировал, что в среднем растения из всех объектов имели урожай, сравнимый с необработанными контрольными растениями.

Таблица 11: Мета-анализ урожайности по результатам полевых испытаний эффективности признаков третьего сезона

Конструкция	Объект	Без Обработки	TRT1	TRT2	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-5	43296	3902,7	НД	3742,3	287,6	3	5	~67500
DT-5	43325	3948,2	НД	4125,9	292,7	3	5	~67500
DT-1	MON94100	3795,2	3849,9	3764,4	202,3	4	10	~120000
DT-1	170060	3771,9	3942,8	3887,5	204,2	4	10	~120000

[00113] В испытаниях агрономических характеристик третьего сезона гибридные растения F1 оценивали на агрономические характеристики и урожай, как описано в Примере 2, и в конце сезона определяли агрономический урожай в фунтах/акр (фунт/акр). Были собраны данные об урожайности из полевых испытаний агрономической эффективности третьего сезона. Для каждого уникального объекта для сравнения был проанализирован мета-анализ совокупных данных по урожайности по всем участкам и по всем отдельным растениям для агрономических полевых испытаний

третьего сезона. В таблице 12 представлена средняя урожайность в фунтах на акр (фунт/акр) для каждого объекта во всех местах. Мета-анализ урожайности для агрономических полевых испытаний показал, что в среднем растения из всех опытов давали урожай, сравнимый с необработанными контрольными растениями, без статистически значимой разницы.

Таблица 12: Мета-анализ урожайности по результатам третьего сезона агрономических полевых испытаний

Конструкция	Объект	Контрольный урожай	Стд. ошибка	Объект Выход	Стд. ошибка	Повторности	Место	Всего семян
DT-5	43296	3864,59	490,07	3717,83	493,24	4	5	~90000
DT-5	43325	3999,59	490,12	3857,2	490,34	4	5	~90000
DT-1	MON94100	3818,3	277,82	3787,57	279,88	6	10	~180000
DT-1	170060	3818,3	277,82	3952,31	280,28	6	10	~180000

[00114] Данные, полученные в результате молекулярного анализа и полевых испытаний третьего сезона, были проанализированы для четырех объектов. Данные анализа эффективности признака, агрономических показателей и урожайности полевых испытаний третьего сезона для каждого объекта объединяли с результатами углубленной молекулярной характеристики, описанной в Примере 3, для оценки объектов. Кроме того, была рассмотрена желательность признака толерантности к дикамбе, которая молекулярно не связана с другим признаком толерантности к гербицидам. Конфигурация единственной кассеты экспрессии толерантности к дикамбе обеспечивает повышенную гибкость и выбор для фермеров в борьбе с самосевом, борьбе с сорняками, агрономии и севообороте. Два объекта, представляющие конструкцию DT-1, были продвинуты для мета-анализа составных данных трех сезонов полевых испытаний.

Пример 6: Мета-анализ составных данных полевых испытаний

[00115] В этом примере описывается мета-анализ всех данных полевых испытаний для двух последних объектов. Это позволило более детально сравнить характеристики и влияние на урожайность в полевых условиях у гибридных растений за многие годы, в десятках мест и сотнях тысяч растений.

[00116] Мета-анализ эффективности признака был проведен путем сбора данных для первого и третьего сезонов во всех местах для двух выбранных объектов из конструкции DT-1. Это позволило более детально сравнить рейтинги повреждения

гибридов. В таблице 13 представлена средняя оценка повреждений для каждого объекта для каждого вида лечения. Мета-анализ полевых испытаний эффективности признака продемонстрировал, что оба объекта для конструкции DT-1 имели исключительно низкие рейтинги повреждения гербицидом для обеих обработок.

5 **Таблица 13: Составлен мета-анализ рейтинга травматизма по результатам полевых испытаний эффективности признаков**

Объект	Обработка	Рейтинг повреждения	Стд. ошибка
MON94100	TRT1	0,28	0,25
MON94100	TRT2	0,52	0,25
170060	TRT1	0,37	0,2
170060	TRT2	0,43	0,2

[00117] Мета-анализ всех данных урожайности из полевых испытаний эффективности признака был проведен путем компиляции данных первого и третьего сезонов во всех местах для двух выбранных объектов из конструкции DT-1. В таблице 10 14 представлено среднее изменение урожайности в фунтах на акр (фунт/акр) (рассчитанное как разница в урожайности между опрысканными и неопрысканными растениями, содержащими один и тот же объект) в фунтах/акр для каждого объекта для каждой обработки. Мета-анализ урожайности полевых испытаний эффективности признака показал, что объект MON94100 продемонстрировал исключительно хорошие результаты, что привело к более высокому урожаю в среднем в обоих вариантах обработки, чем объект 170060. Эти данные имеют решающее значение при выборе элитного коммерческого объекта и демонстрируют выдающуюся производительность растений, содержащих объект Brassica MON94100, в полевых условиях при внесении 15 дикамбы.

20

Таблица 14: Составлен мета-анализ урожайности полевых испытаний эффективности признаков

Объект	Обработка	Изменение урожайности	Стд. ошибка
MON94100	TRT1	82,75	59,76
MON94100	TRT2	23,18	59,56
170060	TRT1	62,13	67,64
170060	TRT2	17,98	67,69

[00118] Мета-анализ всех данных урожайности из агрономических полевых испытаний был проведен путем компиляции данных за все три сезона по всем местам 25

для двух выбранных объектов из конструкции DT-1 и контрольных растений. Это позволило более детально сравнить данные по урожайности в отсутствие применения дикамбы. В таблице 15 представлена средняя урожайность в фунтах/акр для каждого объекта для каждой обработки. Мета-анализ данных урожайности из агрономических полевых исследований показал, что MON94100 и 170060 обеспечивали урожай, сравнимый с контрольными растениями в условиях без опрыскивания, без статистической разницы в урожайности для растений, содержащих любой из этих объектов, по сравнению с контрольными растениями.

Таблица 15: Мета-анализ урожайности по результатам составных полевых агрономических испытаний

Объект	Год	Расчетная урожайность	Стд. ошибка
MON94100	Все годы	3035,34	168,22
170060	Все годы	3046,47	168,3
Контроль	Все годы	3083,59	167,49

[00119] Анализ совокупных данных продемонстрировал превосходство объекта Brassica MON94100 по сравнению с объектом 170060 в отношении толерантности к дикамбе и урожайности в условиях применения гербицидов и привел к выбору этого объекта как лучшего объекта, полезного для коммерческих целей.

Пример 7: Обнаружение объекта Brassica MON94100

[00120] В этом примере описывается обнаружение объекта Brassica MON94100. Обнаружение объекта Brassica MON94100 в образце может быть выполнено с использованием методов обнаружения ДНК, РНК или белков. Примеры способов обнаружения и материалов представлены ниже. Информация о последовательности ДНК для объекта Brassica MON94100 представлена в данном документе как SEQ ID NO: 1-10. Трансгенная вставка объекта Brassica MON94100 содержит элементы, описанные в таблице 1.

[00121] Обнаружение может использоваться для определения присутствия или отсутствия объекта Brassica MON94100 в образце и может указывать на количество геномных копий объекта Brassica MON94100 (то есть гемизиготных, гомозиготных или гетерозиготных) в образце геномной ДНК. Метод термической амплификации

специфической конечной точки объекта TAQMAN® Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific) был разработан для идентификации объекта Brassica MON94100 в образце. ДНК праймеры и зонд, используемые в анализе конечных точек, представляют собой праймеры SQ51321 (SEQ ID NO: 11), SQ13805 (SEQ ID NO: 12) и зонд PB4832, меченный 6-FAM™ (SEQ ID NO: 13). 6-FAM (6-карбоксихлорофлуоресцеин) представляет собой флуоресцентный краситель Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния), прикрепленный к ДНК-зонду. Для зондов TAQMAN MGB™ 5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы *Taq* расщепляет зонд на 5'-конце между флуорофором и гасителем. При гибридизации с целевой цепью ДНК гаситель и флуорофор достаточно разделены, чтобы произвести флуоресцентный сигнал, тем самым высвобождая флуоресценцию. SQ51321 и SQ13805 при использовании с этими методами реакции и PB4832 образуют ампликон ДНК, который является диагностическим для объекта Brassica MON94100. Контроли для этого анализа должны включать положительный контроль, содержащий объект Brassica MON94100, отрицательный контроль из нетрансгенного растения Brassica и отрицательный контроль, который не содержит ДНК-матрицы. Кроме того, контроль реакции ПЦР должен оптимально включать праймеры внутреннего контроля и зонд внутреннего контроля, специфичные для одной копии гена в геноме Brassica. Эти анализы оптимизированы для использования с системой ПЦР Applied Biosystems GeneAmp® 9700 (Thermo Fisher Scientific), работающей на максимальной скорости, но можно использовать другое оборудование.

[00122] Ниже приведен пример условий, используемых с методами TAQMAN для обнаружения объекта Brassica MON94100. Стадия 1: 18 МОм воды, доведенные до конечного объема 5 мкл. Стадия 2: 2,28 мкл 2X Universal Master Mix (дНТФ, фермент, буфер) до конечной концентрации 1X. Стадия 3: 0,05 мкл праймера-1 (SQ51321) и праймера-2 (SQ13805) (ресуспендировали в 18 МОм воды до концентрации 100 мкМ для каждого праймера) до конечной концентрации 0,9 мкМ. Стадия 4: 0,01 мкл зонда объекта 6-FAM MGB PB4832 (ресуспендировали в 18 МОм воды до концентрации 100 мкМ) до конечной концентрации 0,2 мкМ. Стадия 5: 0,05 мкл смеси праймера-1 внутреннего контроля и праймера-2 (ресуспендировали в 18 МОм воды до концентрации 100 мкМ для каждого праймера) до конечной концентрации 0,9 мкМ. Стадия 6: 0,01 мкл зонда VIC™ для внутреннего контроля (ресуспендирован в 18 МОм воды до концентрации 100 мкМ) до конечной концентрации 0,2 мкМ. Стадия 7: 2,5 мкл экстрагированной ДНК (матрицы) для каждого образца, каждый из которых включает: (а) образцы листьев для анализа; (б) отрицательный контроль (нетрансгенная ДНК); (с)

отрицательный контроль воды (без матрицы); и (d) положительный контроль Brassica, содержащий ДНК объекта Brassica MON94100. Стадия 8: Условия амплификатора следующие: один цикл при 95 °С в течение 20 секунд; сорок циклов 95 °С в течение 3 секунд, затем 60 °С в течение 20 секунд и заключительный цикл 10 °С.

5 [00123] Анализ зиготности разработан для определения того, является ли растение, содержащее объект Brassica MON94100, гетерозиготным или гомозиготным по объекту или аллелю дикого типа. Анализ реакции амплификации может быть разработан с использованием представленной в данном документе информации о последовательности. Например, такой анализ ПЦР может включать создание по 10 меньшей мере трех праймеров: праймера-1, праймера-2 и праймера-3, где праймер-1 специфичен для геномной ДНК Brassica на 3'-фланкирующей последовательности ДНК объекта Brassica MON94100; праймер-2 специфичен для трансгенной вставки объекта Brassica MON94100; а праймер-3 специфичен для аллеля дикого типа. При использовании в качестве пары праймеров в реакции амплификации праймер-1 с 15 праймером-2 будут обеспечивать ПЦР-ампликон, специфичный для объекта Brassica MON94100. При использовании в качестве пары праймеров в реакции амплификации праймер-1 с праймером-3 будет обеспечивать ПЦР-ампликон, специфичный для аллеля дикого типа. В реакции ПЦР, проводимой на геномной ДНК Brassica, соответствующие ампликоны ПЦР, полученные из праймера-1 и праймера-2, и ампликоны, полученные 20 из праймера-1 и праймера-3, будут отличаться по последовательности и размеру ампликона. Когда три праймера включены в реакцию ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, гомозиготного по объекту Brassica MON94100, будет образован только ампликон праймера-1 и праймера-2 (специфичный для вставки Brassica MON94100). Когда три праймера включаются в реакцию ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, гетерозиготного по объекту Brassica MON94100, ампликон праймера-1 и праймера-2 25 (специфичный для вставки Brassica MON94100), и ампликон праймера-1 и праймера-3 (специфичный для аллеля дикого типа или отсутствия вставки Brassica MON94100). Когда три праймера смешивают вместе в реакции ПЦР с ДНК, экстрагированной из растения, которое является нулевым по объекту Brassica MON94100 (то есть дикого 30 типа), будет создан только ампликон праймера-1 и праймера-3 (специфичный для аллеля дикого типа). Ампликоны, полученные с помощью реакции ПЦР, можно идентифицировать или различать с помощью любого метода, известного в данной области техники.

[00124] Другой анализ зиготности для объекта Brassica MON94100 - это реакция термической амплификации TAQMAN. Для этого типа анализа, в дополнение к праймерам, описанным выше, анализ должен включать применение двух флуоресцентно меченных зондов. Зонд-1 будет специфичен для объекта Brassica MON94100, а зонд-2 будет специфичен для растения Brassica, которое является нулевым по объекту Brassica MON94100 (дикого типа), и где два зонда содержат разные флуоресцентные метки, например 6-FAM-метка или VIC™-метка. При использовании в реакции TAQMAN праймер-1, и праймер-2, и зонд-1 будет обеспечивать первый флуоресцентный сигнал, специфичный для объекта Brassica MON94100, а праймер-1 и праймер-3, и зонд-2 будет обеспечивать второй флуоресцентный сигнал, специфичный для Brassica дикого типа. Когда три праймера и два зонда включены в реакцию TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, гомозиготного по объекту Brassica MON94100, будет генерироваться только первый флуоресцентный сигнал (специфичный для праймера-1 и праймера-2, и зонда-1). Когда три праймера включены в реакцию TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, гетерозиготного по объекту Brassica MON94100, как первый флуоресцентный сигнал (специфичный для праймера-1 и праймера-2, и зонда-1), так и второй флуоресцентный сигнал (специфический для праймера-1 и праймера-3, и зонда-2). Когда три праймера смешивают вместе в реакции TAQMAN с ДНК, экстрагированной из растения, которая является нулевой по объекту Brassica MON94100 (дикий тип), будет сгенерирован только второй флуоресцентный сигнал (специфичный для праймера-1 и праймера-3, и зонда-2).

[00125] Другой метод обнаружения присутствия объекта Brassica MON94100 в образце растений - анализ по Саузерну. Специалист в данной области техники поймет, как сконструировать зонд(ы) для Саузерн-гибридизации, специфичный для объекта Brassica MON94100, и второй зонд для Саузерн-гибридизации, специфичный для растения Brassica, которое является нулевым по объекту Brassica MON94100 (дикого типа). При анализе по Саузерну сигнал, обнаруженный только от первого зонда для гибридизации по Саузерну, будет указывать на растение, гомозиготное по объекту Brassica MON94100; сигнал, обнаруженный как от первого зонда гибридизации по Саузерну, так и от второго зонда гибридизации по Саузерну, будет указывать на растение, гетерозиготное по объекту Brassica MON94100; и сигнал, обнаруженный только от второго зонда гибридизации по Саузерну, будет указывать на то, что ДНК

была экстрагирована из растения, которое является нулевым по объекту Brassica MON94100 (дикого типа).

[00126] В другом примере набора для обнаружения содержит по меньшей мере одно антитело, специфичное по меньшей мере к одному белку, кодируемому объектом Brassica MON94100. Например, в таком наборе может использоваться тест-полоска с латеральной диффузией, содержащая реагенты, активируемые, когда кончик полоски контактирует с водным раствором. Иллюстративные белки, достаточные для использования в продукции антител, представляют собой белки, кодируемые последовательностью, представленной как SEQ ID NO: 10, или любым ее фрагментом.

10 [00127] Разработан метод обнаружения белка, позволяющий определить, взят ли образец из растения, семени, клетки или части растения, содержащей объект Brassica MON94100. По меньшей мере одно антитело, специфичное по меньшей мере к одному белку, кодируемому объектом Brassica MON94100, используется для обнаружения белка, кодируемого объектом Brassica MON94100, в образце. В наборе для обнаружения, содержащем одно или более антител, специфичных к одному или более белкам, кодируемым объектом Brassica MON94100, можно использовать тест-полоски для хроматографии, содержащие реагенты, активируемые, когда кончик полосы контактирует с водным раствором. Образцы ткани Brassica могут быть измельчены и белок экстрагирован для анализа с использованием воды или водного буфера (например, забуференного фосфатом физиологического раствора, содержащего детергент и бычий сывороточный альбумин). После центрифугирования водный супернатант анализируют методом сэндвич-ИФА на тест-полосках, содержащей впитывающую подушку. Обнаружение активируется путем погружения кончика полоски в водный раствор, содержащий исследуемый образец. Водный раствор переносится вверх по полоске за счет капиллярного эффекта и солюбилизирует меченые золотом антитела на полоске. Меченные золотом антитела специфичны по меньшей мере к одному белку, кодируемому объектом Brassica MON94100, и будут связываться с эпитопом на белке в образце с образованием комплекса антитело-антиген. Меченый золотом комплекс антитело-антиген затем переносится по полоске на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрана содержит тестовую линию имобилизованных антител, которые связываются со вторым отдельным эпитопом на белке, кодируемом объектом Brassica MON94100, вызывая появление видимой линии на тест-полоске, если в образце присутствует белок, кодируемый объектом Brassica MON94100.

Пример 8: контроль самосева

[00128] В этом примере описаны методы контроля растений, содержащих объект Brassica MON94100. Для контроля самосева может быть использован любой гербицид, к которому чувствительны растения, содержащие объект Brassica MON94100.

5 [00129] Иллюстративный гербицид для целей контроля самосева мог бы включать синтетический ауксиновый гербицид, отличный от дикамбы. Чувствительность растений, содержащих объект Brassica MON94100, к синтетическим ауксиновым гербицидам, отличным от дикамбы, дает фермерам возможность удалять из окружающей среды нежелательные толерантные к дикамбе растения Brassica (то
10 есть растения, содержащие объект Brassica MON94100). Такая среда может включать или не включать другие желательные культуры или растения Brassica, которые не содержат объект Brassica MON94100.

[00130] Растения, содержащие объект Brassica MON94100 и нетрансгенные растения той же зародышевой плазмы, что и контроль, выращивали в теплице в
15 соответствии с рандомизированным полноблочным дизайном. Растения опрыскивали на стадии V3 одним из четырех синтетических ауксиновых гербицидов: дикамба (XtendiMax®), 2,4-D амин 4 (диметиламиновая соль 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты), бромксинил (3,5-дибром-4-гидроксибензонитрил, Vuctril®) и МСРА амин (4-хлор-2-метилфеноксиуксусная кислота) в рандомизированном порядке. Степень
20 повреждения растений измеряли через 9 суток после обработки.

[00131] После опрыскивания дикамбой с коммерческой нормой (1X) растения, содержащие объект Brassica MON94100, не имели повреждений, а контрольные растения имели 21,3 % повреждений. Однако при опрыскивании тремя другими синтетическими ауксиновыми гербицидами (2,4-D амин, бромксинил и МСРА) с
25 нормой 1X или 2X обеих растений, содержащих объект Brassica MON94100, и контрольных растений продемонстрировало степень повреждения от 70 % до 90 %. Это подтвердило, что растения, содержащие объект Brassica MON94100, и контрольные растения аналогично реагируют на три ауксиновых гербицида. Данные приведены в таблице 16.

30 **Таблица 16: степень повреждения растений (%) после опрыскивания гербицидом**

Обработка	Концентрация	MON94100	Стд. ошибка для MON94100	Контроль	Стд. ошибка для контроля
Дикамба	600 г к.э./га (1X)	0,0	0	21,3	3,6
2,4-D амин 4	1064 г а.и./га (1X)	74,5	5,1	73,0	4,7

Обработка	Концентрация	MON94100	Стд. ошибка для MON94100	Контроль	Стд. ошибка для контроля
	2128 г а.и./га (2X)	83,5	2,4	82,0	2,5
Бромоксинил	280 г а.и./га (1X)	80,5	4,8	83,3	6,1
	560 г а.и./га (2X)	90,3	7,2	90,6	6,5
МСРА амин	840 г а.и./га (1X)	73,0	2,5	71,5	3,7
	1680 г а.и./га (2X)	86,5	3,3	85,0	1,6

[00132] Депонирование репрезентативного образца семян, содержащих объект Brassica MON94100, было осуществлено в соответствии с Будапештским договором в патентном депозитории Американской коллекции типовых культур (ATCC®) с адресом 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 (USA). Условный номер в ATCC (номер доступа) для семян, содержащих объект Brassica MON94100 - РТА-125182, а дата депонирования - 21 августа 2018 г. Депозит будет храниться в депозитории в течение 30 лет, или 5 лет после последнего запроса, или в течение срока действия патента, в зависимости от того, что позднее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

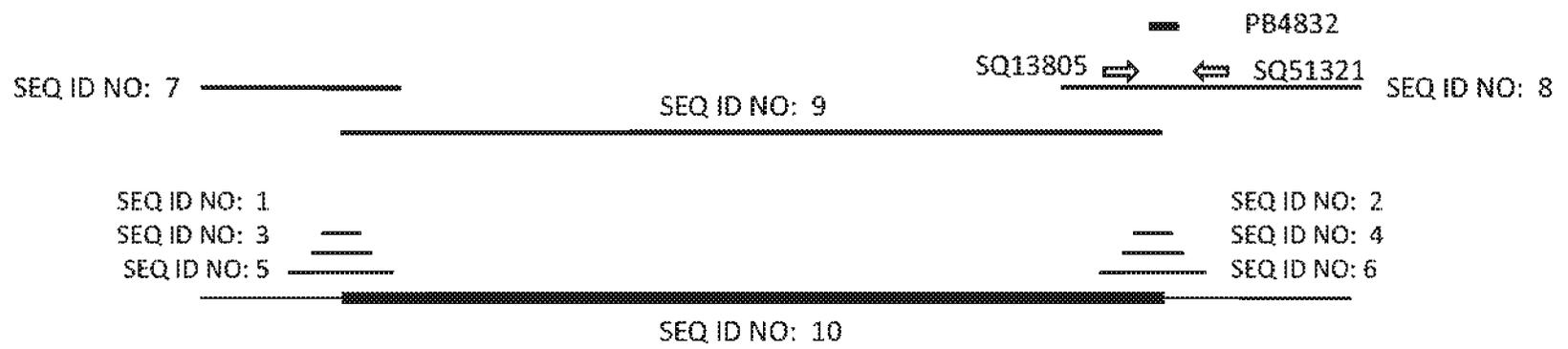
1. Молекула рекомбинантной ДНК, содержащая SEQ ID NO:9, где присутствие указанной молекулы ДНК указывает на толерантность к дикамбе.
5
2. Растение Brassica или часть растения, содержащие молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.
3. Растение Brassica или часть растения по п.2, где растение или часть растения устойчивы к дикамбе.
10
4. Семя, содержащее молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.
5. Растительная клетка, содержащая молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.
15
6. Товарный продукт, содержащий молекулу рекомбинантной ДНК по п.1.
7. Способ борьбы с сорняками на участке, включающий посадку Brassica, содержащую молекулу рекомбинантной ДНК по п.1, и применение эффективного количества дикамбы для борьбы с сорняками на участке без повреждения Brassica.
20
8. Способ по п.7, в котором эффективное количество дикамбы составляет от примерно 0,56 кг к.э./га до примерно 2,24 кг к.э./га дикамбы в течение вегетационного периода.
9. Способ борьбы с самопроизвольной растущей Brassica, содержащей молекулу рекомбинантной ДНК по п.1, на участке, включающий применение гербицидно эффективного количества по меньшей мере одного гербицида, отличного от дикамбы, где применение гербицида предотвращает рост Brassica, содержащего указанную молекулу рекомбинантной ДНК.
25
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что гербицид, отличный от дикамбы, выбран из группы, состоящей из 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты), бромксинила (3,5-дибром-4-гидроксибензонитрила) и МСРА амин (4-хлор-2-метилфеноксисукусная кислота).
30

11. Способ получения растения *Brassica*, устойчивого к дикамбе, включающий:
- а) скрещивание растения, содержащего молекулу рекомбинантной ДНК по п.1, с самой собой или со вторым растением для получения семян; а также
 - 5 б) идентификацию семян потомства, которые содержат SEQ ID NO:9.
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что идентификация семян потомства, содержащих SEQ ID NO:9, осуществляется путем
- I. выращивания семян потомства для получения растений-потомков;
 - 10 II. обработки растений-потомков эффективным количеством дикамбы; а также
 - III. выбора потомства растений, устойчивых к дикамбе.
13. Способ по п.11, отличающийся тем, что идентификация семян потомства, которые содержат SEQ ID NO:9, осуществляется путем обнаружения присутствия SEQ ID NO:9
- 15 в образце, полученном из семян потомства.
14. Способ по п.11, отличающийся тем, что идентификация семян потомства, которые содержат SEQ ID NO:9, осуществляется путем обнаружения присутствия по меньшей мере одного белка, кодируемого SEQ ID NO:9, в образце, полученном из семян
- 20 потомства.
15. Способ улучшения устойчивости растения *Brassica* к дикамбе, включающий:
- а) получение ДНК-конструкции, содержащей в функциональной связи (а) промотора из вируса *Peanut chlorotic streak*, (б) лидера из вируса *Tobacco etch*, (в) хлоропластного транзитного пептида рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы из *Pisum sativum*, (d) последовательности, кодирующую дикамбамонооксигеназу *Stenotrophomonas maltophilia* и (е) 3'-UTR из *Medicago truncatula*; а также
 - 25 б) встраивание конструкции ДНК в геном клетки *Brassica*;
 - с) регенерацию клетки *Brassica* в растение *Brassica*; а также
 - 30 г) отбор растения *Brassica*, содержащего конструкцию ДНК.
16. Способ по п.15, в котором отбор осуществляется путем обработки растения *Brassica* эффективным количеством дикамбы.

17. Растение Brassica, устойчивое к дикамбе, полученное способом по п.15, где растение Brassica содержит конструкцию ДНК.

5 18. Семя Brassica, полученное из растения по п.17, где семя Brassica содержит конструкцию ДНК.

19. Клетка растения Brassica по п.17, где клетка Brassica содержит конструкцию ДНК.



Фиг. 1

SEQ ID NO: 9

RB	<i>P-PCSV</i>	<i>L-TEV</i>	<i>TS-Ps.RbcS</i>	<i>CS-STEmα.DMO</i>	<i>T-Mt.AC</i>	LB
----	---------------	--------------	-------------------	---------------------	----------------	----

Фиг. 2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MONS:450WO		FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US19/56141	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14 October 2019 (14.10.2019)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 16 October 2018 (16.10.2018)	
Applicant MONSANTO TECHNOLOGY LLC			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed.
 a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant.
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/56141

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/56141

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- Please See within the Next Supplemental Page-

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I, Claims 1-24

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/56141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/82, 15/09; C12Q 1/68 (2020.01)

CPC - C12N 15/8201, 15/8216, 15/8274, 15/09; C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/034704 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC) 24 March 2011; page 5, lines 19-20; page 6, line 12; page 7, lines 9-24	1-24
A	WO 2016/173540 A1 (KANG, Y et al.) 03 November 2016; page 26; figure 2	1-24
A	WO 2012/071039 A1 (PIONER HI-BRED INTERNATIONAL, INC) 31 May 2012; claims 14, 24	1-24

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"D" document cited by the applicant in the international application	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 February 2020 (04.02.2020)	Date of mailing of the international search report 20 FEB 2020
--	--

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/56141

-Continued from Box III Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-24 are directed toward recombinant DNA molecules that are unique to Brassica Event MON94100 and transgenic Brassica plants, Brassica plant parts, Brassica seeds, Brassica cells, and agricultural products containing Brassica Event MON94100 as well as methods of using and detecting Brassica Event MON94100.

Group II, Claims 25-27 are directed toward a method of improving tolerance to dicamba in a Brassica plant comprising: a) obtaining a DNA construct comprising in operable linkage (a) a promoter from Peanut chlorotic streak virus, (b) a leader from Tobacco etch virus, (c) a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase chloroplast transit peptide from Pisum sativum, (d) a dicamba monooxygenase coding sequence from Stenotrophomonas maltophilia, and (e) a 3' UTR from Medicago truncatula; and b) inserting the DNA construct into the genome of a Brassica cell; c) regenerating the Brassica cell into a Brassica plant; and d) selecting a Brassica plant comprising the DNA construct.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include Brassica Event MON94100, not present in Group II; the special technical features of Group II include (a) a promoter from Peanut chlorotic streak virus, (b) a leader from Tobacco etch virus, (c) a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase chloroplast transit peptide from Pisum sativum, (d) a dicamba monooxygenase coding sequence from Stenotrophomonas maltophilia, and (e) a 3' UTR from Medicago truncatula, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: a Brassica plant that is tolerant to dicamba.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2012/071039 A1 (PIONER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) (hereinafter 'Pioneer').

Pioneer discloses a Brassica plant that is tolerant to dicamba (page 56, second paragraph).

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Pioneer reference, unity of invention is lacking.