



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118535** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)

**A01H 6/20** (2018.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A01H 1/00**

**C12N 15/11** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2013 00191**

(22) Дата подання заявки: **01.06.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **11.02.2019**

(31) Номер попередньої  
заявки відповідно до  
Паризької конвенції: **61/351,317**

(32) Дата подання  
попередньої заявки  
відповідно до  
Паризької конвенції: **04.06.2010**

(33) Код держави-учасниці  
Паризької конвенції,  
до якої подано  
попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **11.02.2013, Бюл.№ 3**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **11.02.2019, Бюл.№ 3**

(86) Номер та дата  
подання міжнародної  
заявки, поданої  
відповідно до  
Договору РСТ **PCT/US2011/038684,  
01.06.2011**

(72) Винахідник(и):

**Браун Ендрю Дж. (US),  
Бірс Джеймс Ф. (US),  
Коул Роберт Х. (US),  
Кроулі Джеймс Х. (US),  
Міклош Джон А. (US),  
Ріплі Роберт К. (US),  
Зайферт-Хіггінс Зімон (US),  
Се Цзялі (US)**

(73) Власник(и):

**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛС,  
800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO  
63167, United States of America (US)**

(74) Представник:

**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.  
№115**

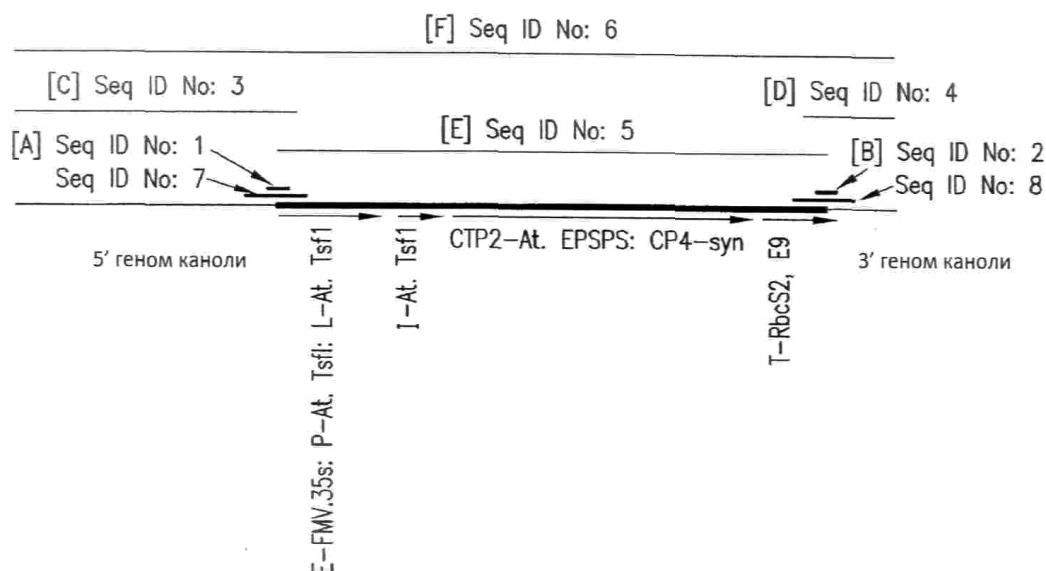
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

WO 2004072235 A2, 26.08.2004  
US 2006282915 A1, 14.12.2006  
WO 2007015945 A2, 08.22.2007  
WO 2010036946 A1, 01.04.2010  
WO 0236831 A2, 10.05.2002  
Dill Gerald M et al, "Glyphosate-resistant crops:  
adoption, use and future considerations", Pest  
Management Science, 04.2008, vol. 64, no. 4, P.  
326 - 331  
Green Jerry M, "Evolution of Glyphosate-Resistant  
Crop Technology", Weed Science, 01.2009, vol. 57,  
no. 1, ISSN 0043-1745, P. 108 - 117  
CaJacob, C.A., et al., "Engineering resistance to  
herbicides", CaJacob, C.A., et al., P. Christou and H.  
Klee, Handbook of plant biotechnology, J.  
Wiley&Sons, Ltd., 15.07.2004, P. 353 - 372  
CaJacob, C.A., et al., "Genetically modified  
herbicide resistant crops", CaJacob, C.A., et al., W.  
Krämer and U. Schirmer, Modern Crop Protection  
Compounds, Wiley.VCH, 01.01.2007, P. 283 - 316  
Averniers Isabel et al, "Event-specific plasmid  
standards and real-time PCR methods for transgenic  
Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73  
canola", Journal of Agricultural and Food Chemistry,  
American Chemical Society, US, 01.04.2005, vol.  
53, no. 8, P. 3041 - 3052  
Feng, P.C.C., et al., "Glyphosate-resistant crops:  
developing the next generation products", Feng,  
P.C.C., et al., Vijay K. Nandula, Glyphosate  
resistance in crops and weeds: history,  
development, and management, Wiley&Sons, Inc.,  
21.07.2010, P. 45 - 65

UA 118535 C2

**(54) РЕКОМБІНАНТНА МОЛЕКУЛА ДНК, ЩО НАДАЄ РОСЛИНІ BRASSICA СТІЙКОСТІ ДО ГЛІФОСАТУ****(57) Реферат:**

Винахід стосується рекомбінантної молекули ДНК, яка включає: полінуклеотидну молекулу з послідовністю, вибраною із групи, що складається із SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8; полінуклеотидну молекулу з нуклеотидною послідовністю, яка щонайменше на 95 % ідентична повнорозмірній послідовності SEQ ID NO: 6; або полінуклеотидну молекулу з послідовністю, комплементарною (а) або (б), де вказана рекомбінантна молекула ДНК вказує на присутність явища MON 87427. Винахід також стосується полінуклеотидного зонда для діагностики присутності явища MON 88302, способу визначення присутності молекули ДНК, одержаної з явища MON 88302, пари молекул ДНК для одержання амплікону, що є діагностичною ознакою для явища MON 88302, набору для визначення ДНК, рослини, насіння, клітини або частини рослини, що містять явище MON 88302, способу вирощування рослин, що містять явище MON 88302 та способу визначення зиготності явища MON 88302 рослини або насіння.



Фіг. 1

## ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка претендує на пріоритет, заявлений у попередній заявці на патент США № 61/351317 від 4 червня 2012, включеній сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання.

## ВКЛЮЧЕННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

5 Перелік послідовностей знаходиться у файлі під назвою «MONS291WO\_ST25.txt» розміром 21 кілобайт (відповідно до оцінки Microsoft Windows®), що був створений 31 травня 2011 р., представлений в електронному вигляді і включений сюди за допомогою посилання.

## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

10 Винахід стосується галузі біотехнології і сільського господарства і, зокрема, галузі трансгенних сільськогосподарських культур.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Рослини роду капусти відіграють важливу роль у світовому господарстві. Відносно даних культур можуть використовуватися способи біотехнології для одержання рослин з поліпшеними ознаками, такими як толерантність до гербіцидів. Толерантність до гербіцидів може бути досягнута у трансгенних рослин шляхом експресії трансгена, здатного забезпечувати таку толерантність. Експресія трансгена у рослини може бути піддана впливу комбінацій таких факторів як регуляторні елементи, використовувані у трансгенній касеті, розташування хромосоми в трансгенній вкладці та близькість ендегенних регуляторних елементів до сайту інтеграції. Наприклад, було виявлено, що існує широка варіація загального рівня експресії трансгена або просторової або тимчасової схеми експресії трансгена між подібними явищами. Через цю причину може виявитися необхідним вироблення і тестування сотень окремих явищ трансформації у рослин для кінцевої ідентифікації одного явища, використовуваного з комерційною метою у сільському господарстві. Таке явище, яке буде ідентифіковане як таке, що має необхідну трансгенну експресію і молекулярні характеристики, може потім використовуватися для інтрогресії ознаки в іншу генетичну систему з використанням способів рослинництва. Підсумкове потомство буде містити трансгенне явище і, отже, буде мати характеристики трансгенної експресії такої ознаки оригінального трансформанта. Це може використовуватися для одержання цілого числа варіацій різних культур, які містять поліпшену ознаку і підходящим чином адаптовані до специфічних локальних умов росту.

## СУТНІСТЬ ВІНАХОДУ

30 Винахід описує трансгенні рослини і насіння, що включають явище MON 88302, репрезентативний зразок насіння, що був розміщений в Американській колекції типових культур (ATCC) з номером доступу РТА-10955. Рослини, що включають явище, мають комерційно прийнятну толерантність до застосування гербіциду гліфосату. Винахід описує потомство рослин, частини рослин і клітини, що містять явище; рекомбінантні молекули ДНК, що стосуються явища, і способи використання таких молекул; товарні продукти, отримані з або які включають явище; і способи використання явища.

40 Винахід описує рослину, насіння, клітину, потомство рослини або частину рослини, що включають явище, а також продукти, отримані з рослини, клітини, частини рослини або насіння, що включають явище. Таким чином, винахід описує рослину, насіння, клітину, потомство рослини, частину рослини або отриманий з неї продукт, що включають молекулу ДНК із нуклеотидною послідовністю, вибраною із групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8 та їх фрагментів. Винахід описує рослину, насіння, клітину, потомство рослини або частину рослини, що включають молекулу рекомбінантної ДНК, які виробляють амплікон, що включає молекулу ДНК згідно винаходу, наприклад, у способі ампліфікації ДНК.

45 Винахід описує молекули ДНК, що викликають явище. Молекули ДНК можуть включати нуклеотидні послідовності, що представляють або отримані із поєднання трансгенної вставки і фланкуючої геномної ДНК явища MON 88302, і/або ділянку геномної ДНК, що фланкує вставлену ДНК, і/або ділянку інтегрованої трансгенної ДНК, що фланкує сайт вставки, і/або ділянку такої інтегрованої касети трансгенної експресії, і/або прилягаючу послідовність кожної з таких ділянок. Винахід також описує молекули ДНК, використовувані в якості праймерів і зондів для діагностики явища. Описані рослини, клітини, частини рослини, продукти, потомство і насіння, що включають такі молекули.

55 Винахід описує способи, композиції і набори, використовувані для визначення присутності ДНК, отриманої в результаті явища. Винахід описує спосіб визначення явища шляхом контакту зразка, що містить ДНК, з набором праймерів при використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК, якщо явище продукує амплікон, діагностичний для явища, що дозволяє в ході реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти одержати амплікон і, у підсумку, визначити амплікон. Винахід також описує спосіб визначення явища шляхом контакту зразка,

що включає ДНК, із зондом, що, при використанні в реакції гібридизації з геномною ДНК із явища, гібридизується в молекулу ДНК, специфічну для явища, із проведенням реакції гібридизації і визначення гібридизації зонда з молекулою ДНК. Набори, що включають способи і композиції згідно винаходу, використовуються для визначення присутності ДНК, отриманої в результаті явища.

Винахід описує спосіб контролю бур'янистої рослинності при вирощуванні рослин, що включають явище (тобто вирощуванні насіння, що включає явища), з наступним застосуванням ефективною дози гліфосату, здатного контролювати ріст бур'янистої рослинності без поразки рослин, що включають явище.

Винахід описує способи одержання рослини і/або насіння з толерантністю до гербіциду гліфосату шляхом схрещування рослини, толерантної до гліфосату і яка містить явище або яка містить послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8, із другою рослиною, що дозволяє одержати насіння, виростити насіння з одержанням потомства рослин, обробити потомство рослин гліфосатом і вибрати потомство рослини, що містить явища і толерантної до гліфосату. Винахід описує способи одержання рослини і/або насіння з толерантністю до гербіциду гліфосату шляхом самозапилення рослини, толерантної до гліфосату і яка містить явище або яка містить послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8, що дозволяє одержати насіння, виростити насіння з одержанням потомства рослин, обробити потомство рослин гліфосатом і вибрати потомство рослини, що включає явища і толерантної до гліфосату.

Винахід описує способи визначення зиготності рослини або насіння, що включають явище, шляхом контакту зразка, що включає ДНК, з набором першого праймера, який, при використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК із явища MON 88302, дозволяє одержати діагностичний амплікон для явища, а реакція ампліфікації нуклеїнової кислоти дозволяє одержати амплікон, визначити амплікон, зробити контакт зразка з набором другого праймера, який, при використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК з рослин, дозволяє одержати другий амплікон, що включає нативну геномну ДНК, гомологічну геномній ділянці трансгенної вставки, ідентифікованої як явище MON 88302, що дозволяє провести реакцію ампліфікації нуклеїнової кислоти з одержанням другого амплікона, визначити другий амплікон і порівняти перший і другий амплікони у зразку, при цьому присутність обох ампліконів свідчить про те, що відповідний зразок і, отже, рослина або насіння гетерозиготні відносно трансгенної вставки.

Зазначені вище та інші аспекти винаходу будуть більш очевидні під час розгляду представленого нижче детального опису.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1: діаграма представляє явище MON 88302; [A] відповідає відносному положенню з'єднуючої ділянки 5'; [B] відповідає відносному положенню з'єднуючої ділянки 3'; [C] відповідає відносному положенню фланкуючої ділянки і фрагмента 5'-кінця вставленої трансгенної ДНК; [D] відповідає відносному положенню 3'-фланкуючої ділянки і фрагмента 3'-кінця вставленої трансгенної ДНК; [E] представляє касету трансгенної експресії; і [F] представляє суміжну послідовність геномних фланкуючих послідовностей *Brassica napus* і касету трансгенної експресії.

Фігура 2: представляє врожай зерна з явищем RT73 у порівнянні з MON 88302 при застосуванні гліфосату на стадіях розвитку листка від четвертої до шостої. RT73 позначається як RR1.

Фігура 3: представляє врожай зерна з явищем RT73 у порівнянні з MON 88302 при застосуванні гліфосату на стадії появи першої квітки. RT73 позначається як RR1.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 – послідовність із шістдесятьох нуклеотидів, що представляє 5'-з'єднуючу послідовність між геномною ДНК *Brassica napus* та інтегрованою касетою трансгенної експресії. Така нуклеотидна послідовність відповідає положенням 762-821 SEQ ID NO: 3 ([C], див. Фігуру 1) і положенням 762-821 SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 2 – послідовність із шістдесятьох нуклеотидів, що представляє 3'-з'єднуючу послідовність між геномною ДНК *Brassica napus* та інтегрованою касетою експресії. Така нуклеотидна послідовність відповідає положенням 313-372 SEQ ID NO: 4 ([D], див. Фігуру 1) і положенням 5189-5248 SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 3 - 5'-фланкуюча послідовність вставленої ДНК із явищем MON 88302, включаючи ділянку трансгенної ДНК. Нуклеотидні положення 762-821 SEQ ID NO: 3 відповідають нуклеотидним положенням 1-60 SEQ ID NO: 1; нуклеотидні положення 742-841

SEQ ID NO: 3 відповідають нуклеотидним положенням 1-100 SEQ ID NO: 7, і нуклеотидні положення 792-956 SEQ ID NO: 3 відповідають нуклеотидним положенням 1-165 SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 4 - 3'-фланкуюча послідовність вставленої ДНК із явищем MON 88302, включаючи ділянку трансгенної ДНК. Нуклеотидні положення 313-372 SEQ ID NO: 4 відповідають нуклеотидним положенням 1-60 SEQ ID NO: 2; нуклеотидні положення 293-392 SEQ ID NO: 4 відповідають нуклеотидним положенням 1-100 SEQ ID NO: 8, і нуклеотидні положення 1-342 SEQ ID NO: 4 відповідають нуклеотидним положенням 4086-4427 SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 5 - послідовність інтегрованої касети трансгенної експресії, що несе толерантність до гербіциду гліфосату. SEQ ID NO: 5 відповідає нуклеотидним положенням 792-5218 SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 6 - нуклеотидна послідовність, що представляє суміжну 5'-фланкуючу послідовність вставленої ДНК із явищем MON 88302 (SEQ ID NO: 3), послідовність інтегрованої касети експресії (SEQ ID NO: 5) і 3'-фланкуючу послідовність вставленої ДНК із явищем MON 88302 (SEQ ID NO: 4).

SEQ ID NO: 7 – послідовність зі 100 нуклеотидів, що представляє 5'-з'єднуючу послідовність між геномною ДНК *Brassica napus* та інтегрованою касетою трансгенної експресії. Така нуклеотидна послідовність відповідає положенням 742-841 SEQ ID NO: 3 ([C], див. Фігуру 1) і положенням 742-841 SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 8 – послідовність зі 100 нуклеотидів, що представляє 3'-з'єднуючу послідовність між геномною ДНК *Brassica napus* та інтегрованою касетою експресії. Така нуклеотидна послідовність відповідає положенням 293-392 SEQ ID NO: 4 ([D], див. Фігуру 1) і положенням 5169-5268 SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 9 - праймер SQ20901, використовуваний для ідентифікації явища MON 88302. Праймер SQ20901 є комплементарним для вставленої касети експресії у ділянці, близькій до 3'-межі трансгенної вставки. Амплікон, отриманий з використанням комбінації праймерів SQ20901 і SQ23770 (SEQ ID NO: 10), є позитивним результатом на присутність явища MON 88302.

SEQ ID NO: 10 є послідовністю праймера, вказаного як Праймер SQ23770 і використовуваного для ідентифікації явища MON 88302. Праймер SQ23770 є комплементарним 3'-фланкуючій ділянці вставленої касети експресії і близько розташований до межі вставленої трансгенної ДНК. Амплікон, отриманий з використанням комбінації праймерів SQ20901 (SEQ ID NO: 9) і SQ23770, є позитивним результатом на присутність явища MON 88302.

SEQ ID NO: 11 є послідовністю зонда, вказаного як Зонд PB10164 і використовуваного для ідентифікації явища MON 88302. Зонд є комплементарним 3'-фланкуючій ділянці вставленої касети експресії і близько розташований до межі вставленої трансгенної ДНК. Такий зонд представлений синтезованим олігонуклеотидом, міченим 6FAM<sup>TM</sup>. Випускання флуоресцюючого сигналу під час реакції ампліфікації з використанням праймерів SQ20901 і SQ23770 (SEQ ID NO: 9-10) у комбінації із зондом PB10164, міченим 6FAM<sup>TM</sup>, є ознакою явища MON 88302 під час аналізу TAQMAN<sup>®</sup>.

SEQ ID NO: 12 є послідовністю праймера, вказаного як Праймер SQ21948 і використовуваного для ідентифікації явища зиготності MON 88302.

SEQ ID NO: 13 є послідовністю праймера, вказаного як Праймер SQ24635 і використовуваного для ідентифікації зиготності *Brassica napus* дикого типу.

SEQ ID NO: 14 є послідовністю праймера, вказаного як Праймер SQ22176 і використовуваного для ідентифікації явища MON 88302 і зиготності *Brassica napus* дикого типу.

SEQ ID NO: 15 є послідовністю зонда (PB4213) для використання в аналізі зиготності явища MON 88302.

SEQ ID NO: 16 є послідовністю зонда (PB10787) для використання в аналізі зиготності *Brassica napus* дикого типу.

SEQ ID NO: 17 є послідовністю праймера, позначеною як Праймер SQ2563 і використовуваною як внутрішній контроль у ході аналізів TAQMAN<sup>®</sup>.

SEQ ID NO: 18 є послідовністю праймера, позначеною як Праймер SQ2564 і використовуваною як внутрішній контроль у ході аналізів TAQMAN<sup>®</sup>.

SEQ ID NO: 19 є послідовністю синтетичного олігонуклеотидного праймера (PB0751), міченого VIC<sup>TM</sup>, використовуваною як внутрішній контроль у ході аналізів TAQMAN<sup>®</sup>.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Представлені нижче визначення і способи приводяться для кращого розуміння даного винаходу і як посібник для фахівця в даній галузі у використанні даного винаходу. Якщо не зазначено інше, терміни мають загальноприйняте значення, яке стосується відповідної галузі науки.

У контексті даного винаходу термін «включати» означає «включати, але не обмежуватися».

Даний винахід описує трансгенне явище MON 88302. Термін «явище» у контексті даного винаходу означає молекули ДНК, отримані в результаті вставки трансгенної ДНК у геном рослини у зазначеному положенні в хромосомі. Явище MON 88302 означає молекули ДНК, отримані в результаті вставки трансгенної ДНК із послідовністю SEQ ID NO: 5 у зазначене положення генома *A Brassica napus* у групу зчеплення N4. У даному винаході також описуються рослини і насіння, що включають явище MON 88302. Насіння, що містить MON 88302, було включене в Американську колекцію типових культур (ATCC) під номером доступу PTA-10955. Рослини, що включають MON 88302, мають комерційно прийнятну толерантність до застосування гербіциду гліфосату.

Рослина, що включає явище, може відноситись до оригінального трансформанта, що включає трансген, вставлений у зазначене положення в геном рослини. Рослина, що включає явище, також може відноситись до потомства оригінального трансформанта, що включає трансген, вставлений у зазначене положення в геном рослини. Таке потомство може бути отримане шляхом запилення або схрещування трансформанта або його потомства з іншою рослиною. Така інша рослина може бути представлена трансгенною рослиною, що містить однаковий або різний трансген, і/або нетрансгенною рослиною, такою як приналежна до іншого виду. Навіть після зворотного схрещування з рекуррентною батьківською рослиною вставлена ДНК і фланкуюча ДНК із трансформованої батьківської рослини присутня в потомстві схрещування в однаковому положенні в геномі.

Трансгенне явище MON 88302 було створено шляхом вставки трансгенної ДНК (представленої тут як SEQ ID NO: 5) у групу зчеплення N4 генома *A* рослини *Brassica napus*. *Brassica napus* є широко відомою рапсовою рослиною, а специфічні культивовані сорти можуть бути відомі під назвою канولا. У контексті даного винаходу термін «канола» або «рослина канола» означає рослину *Brassica*, що може використовуватися для одержання масла канולי (тобто масла, що відповідає специфічним вимогам якості із вмістом ерукової кислоти менше 2%) і включає цілий ряд сортів *Brassica napus*, *Brassica napobrassica*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea* і *Brassica campestris*. Беручи до уваги, що *Brassica napus* є алотетраплоїдом, отриманим у результаті схрещування і ретенції обох геномів *Brassica rapa* (раніше *Brassica campestris*) і *Brassica oleracea*, рослина *Brassica napus*, що включає трансгенне явище MON 88302, може використовуватися у способах схрещування для введення явища MON 88302 і, отже, ознаки толерантності до гліфосату в інші члени роду *Brassica*. Приклади членів роду *Brassica*, які можуть використовуватися у способах згідно винаходу, включають, але не обмежуються цим, *Brassica juncea*, *Brassica napobrassica*, *Brassica oleracea*, *Brassica carinata*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* і *Brassica campestris*, а також інші рослини, що належать до роду *Brassica*, що дозволяє робити схрещування між видами *Brassica*.

Молекула ДНК, що включає явище MON 88302, означає молекулу ДНК, що включає щонайменше фрагмент вставленої трансгенної ДНК (представленої як SEQ ID NO: 5) і щонайменше фрагмент фланкуючої геномної ДНК, що безпосередньо прилягає до вставленої ДНК. Таким чином, молекула ДНК, що включає явище, має нуклеотидну послідовність, що представляє щонайменше фрагмент вставленої трансгенної ДНК і щонайменше фрагмент окремої ділянки генома рослини, у який була вставлена трансгенна ДНК. Розташування вставленої ДНК у явищі MON 88302 відносно навколишнього генома рослини є специфічним та унікальним для явища MON 88302, і, отже, нуклеотидна послідовність такої молекули ДНК є описовою та ідентифікуючою явище MON 88302. Приклади послідовності такої молекули ДНК представлені в тексті даної заявки як SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8. Така молекула ДНК є також невід'ємною частиною хромосоми рослини, що включає явище MON 88302, і може бути передана потомству рослини.

Явище MON 88302 дає рослині толерантність при застосуванні гербіциду гліфосату. Термін «гліфосат» означає N-фосфометил-гліцин і його солі. Гліфосат є гербіцидом, активним щодо широкого спектру видів рослин. При застосуванні на поверхні рослини гліфосат систематично переміщується всередину рослини. Гліфосат є фототоксичним, тому що інгібує метаболізм шикімової кислоти, що є попередником для синтезу ароматичних амінокислот.

У контексті даного винаходу термін «рекомбінантний» означає форму ДНК і/або білка, і/або організму, що у природі не зустрічається і створений за умов втручання людини. Таке втручання людини може привести до утворення рекомбінантної молекули ДНК і/або рекомбінантної рослини. У контексті даного винаходу термін «рекомбінантна молекула ДНК» означає молекулу ДНК, що включає комбінацію молекул ДНК, які не зустрічаються в природі і є результатом втручання людини, наприклад, молекулу ДНК, що складається з комбінації щонайменше двох молекул ДНК, гетерологічних одна одній, і/або молекулу ДНК, що була штучно синтезована і

включає полінуклеотидну послідовність, що відрізняється від полінуклеотидної послідовності, що зустрічається в природі, і/або молекулу ДНК, що включає трансген, який був введений штучно у геномну ДНК клітини-хазяїна, і відповідну фланкуючій ДНК генома клітини-хазяїна. Прикладом рекомбінантної молекули ДНК є молекула ДНК, описана в тексті даної заявки і

5 отримана в результаті вставки трансгена в геном *Brassica napus*, що, в результаті, може привести до експресії рекомбінантної РНК і/або молекули білка в даному організмі. У контексті даного винаходу термін «рекомбінантна рослина» означає рослину, що не зустрічається в природі і є результатом втручання людини, що містить трансген і/або молекулу гетерологічної ДНК, включену в геном рослини. У результаті такої зміни в геномі рекомбінантна рослина по суті

10 відрізняється від відповідної рослини дикого типу. Прикладом рекомбінантної рослини є описана тут рослина, що включає явище MON 88302.

У контексті даного винаходу термін «трансген» означає полінуклеотидну молекулу, що була штучно введена в геном клітини-хазяїна. Такий трансген може бути гетерологічним у клітині-хазяїні. Термін «трансгенна рослина» означає рослину, що включає такий трансген.

15 У контексті даного винаходу термін «гетерологічний» означає першу молекулу, що у природі не зустрічається в комбінації з іншою молекулою. Наприклад, молекула може бути отримана з першого виду і вставлена в геном другого виду. Таким чином, молекула буде гетерологічною хазяїнові і штучно введена в геном клітини-хазяїна.

У контексті даного винаходу термін «химерний» означає окрему молекулу ДНК, отриману шляхом злиття першої молекули ДНК із другою молекулою ДНК, при цьому ні перша, ні друга молекула ДНК не зустрічаються в природі в такій конфігурації, тобто злитими одна з одною. Таким чином, молекула химерної ДНК являє собою нову молекулу ДНК, що не зустрічається в природі.

Даний винахід описує молекули ДНК і їх відповідні нуклеотидні послідовності. У контексті

25 даного винаходу терміни «послідовність ДНК», «нуклеотидна послідовність» і «полінуклеотидна послідовність» означають послідовність нуклеотидів молекули ДНК, звичайно представленої від 5'-(висхідного) кінця до 3'-(низхідного) кінця. Використовувана тут номенклатура відповідає вимогам Статті 37 Зводу федеральних постанов США § 1.822 і приводиться в таблицях WIPO Стандарт ST.25 (1998), Додаток 2, Таблиці 1 і 3. Даний винахід описує тільки один ланцюг

30 нуклеотидної послідовності із трансгенним явищем MON 88302. Таким чином, шляхом імплікації та деривації комплементарні послідовності, також позначені в науці як повний комплемент або зворотні комплементарні послідовності, входять в обсяг даного винаходу і, отже, входять в обсяг заявленої формули винаходу.

Нуклеотидна послідовність, що відповідає повній нуклеотидній послідовності вставленої

35 трансгенної ДНК, і значущі сегменти геномної ДНК *Brassica napus*, що фланкує будь-який кінець вставленої трансгенної ДНК, представлена SEQ ID NO: 6. Субфрагмент даної послідовності представлений вбудованою трансгенною ДНК SEQ ID NO: 5. Нуклеотидна послідовність геномної ДНК, що фланкує 5'-кінець вставленої трансгенної ДНК і ділянку 5'-кінця вставленої ДНК, представлена SEQ ID NO: 3. Нуклеотидна послідовність геномної ДНК, що фланкує 3'-

40 кінець вставленої трансгенної ДНК і ділянку 3'-кінця вставленої ДНК, представлена SEQ ID NO: 4. Ділянка, що охоплює розташування, у якому трансгенна ДНК з'єднана з і приєднана до геномної ДНК, позначається в даному тексті як з'єднуюча. Термін «з'єднуюча послідовність» або «з'єднуюча ділянка» означає послідовність ДНК і/або відповідної молекули ДНК, що охоплює вставлену трансгенну ДНК і прилягаючу фланкуючу геномну ДНК. Приклади з'єднуючої

45 послідовності явища MON 88302 представлені як SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8. Ідентифікація однієї з таких з'єднуючих послідовностей у нуклеотидній молекулі, отриманій із рослини або насіння *Brassica*, указує, що ДНК була отримана з явища MON 88302 і є діагностичною ознакою на предмет присутності у зразку ДНК явища MON 88302. SEQ ID NO: 1 представлена послідовністю із 60 нуклеотидів, що охоплює з'єднання між геномною ДНК і 5'-

50 кінцем вставленої ДНК. SEQ ID NO: 7 представлена послідовністю зі 100 нуклеотидів, що охоплює з'єднання між геномною ДНК і 5'-кінцем вставленої ДНК. SEQ ID NO: 2 представлена послідовністю із 60 нуклеотидів, що охоплює з'єднання між геномною ДНК і 3'-кінцем вставленої ДНК. SEQ ID NO: 8 представлена послідовністю зі 100 нуклеотидів, що охоплює з'єднання між геномною ДНК і 3'-кінцем вставленої ДНК. Будь-який сегмент ДНК, отриманої із трансгенного

55 явища MON 88302, що включає SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 7, входить в обсяг даного винаходу. Будь-який сегмент ДНК, отриманої із трансгенного явища MON 88302, що включає SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 8, входить в обсяг даного винаходу. Крім того, будь-який полінуклеотид, що включає послідовність, комплементарну будь-якій послідовності, описаній в даному параграфі, входить в обсяг даного винаходу. Фігура 1 ілюструє фізичне розташування

60 SEQ ID NO: 1-5 і SEQ ID NO: 7-8 відносно SEQ ID NO: 6, що розташовуються від 5'- до 3'-кінця.

Даний винахід також описує молекулу нуклеїнової кислоти, що включає молекулу ДНК із послідовністю, яка щонайменше на 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентична SEQ ID NO: 6 повної довжини.

Даний винахід описує типові молекули ДНК, які можуть використовуватися в якості праймерів або зондів для діагностики присутності ДНК, отриманої з явища MON 88302 у зразку. Такі праймери або зонди є специфічними для окремої послідовності нуклеїнової кислоти і, отже, можуть використовуватися для ідентифікації послідовності нуклеїнової кислоти з явищем MON 88302 з використанням описаних тут способів згідно винаходу.

«Праймер» звичайно є високоочищеним виділеним полінуклеотидом, що розроблений для використання у специфічних способах ренатурації або гібридизації, що включають термальну ампліфікацію. Пара праймерів може використовуватися із матричної ДНК, такої як зразок геномної ДНК *Brassica napus*, у термальній ампліфікації, такий як полімеразна ланцюгова реакція (ПЦР), для одержання амплікону, при цьому амплікон, отриманий під час такої реакції, буде мати послідовність ДНК, що відповідає послідовності матричної ДНК, розташованої між двома сайтами, у яких праймери гібридизувалися з матрицею. У контексті даного винаходу термін «амплікон» означає частину або фрагмент ДНК, що був синтезований з використанням способів ампліфікації, тобто це продукт реакції ампліфікації. В одному варіанті втілення винаходу амплікон, діагностичний для явища MON 88302, включає послідовність, що не зустрічається в природі для генома *Brassica napus*. Амплікон згідно даного винаходу включає щонайменше приблизно 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 і їхні комплементи. Праймер звичайно розроблений для гібридизації в комплементарний ланцюг-мішень ДНК для утворення гібриду між праймером і ланцюгом-мішенню ДНК, і присутність праймера є точкою розпізнавання для полімерази для початку розширення праймера (тобто полімеризації додаткових полінуклеотидів у подовження молекули полінуклеотидів) з використанням в якості матриці ланцюга-мішені ДНК. Пари праймерів, як це використовується в даному винаході, означають використання двох праймерів, що зв'язують протилежні ланцюги дволанцюгового нуклеотидного сегмента з метою лінійної ампліфікації полінуклеотидного сегмента між положеннями, призначеними для зв'язування окремими членами пари праймерів, звичайно - в ході термальної реакції ампліфікації або інших звичайно використовуваних способів ампліфікації. Типові молекули ДНК, використовувані в якості праймерів, представлені SEQ ID NO: 9-10. Пара праймерів, представлена як SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 10, може використовуватися як перша молекула ДНК і друга молекула ДНК, що відрізняється від першої молекули ДНК, і обидві молекули мають достатню довжину суміжних нуклеотидів з послідовностями SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 6, або їхніми комплементами для функціонування в якості праймерів ДНК, таким чином, при їх спільному використанні в реакції термальної ампліфікації із матричної ДНК, отриманої з явища MON 88302, буде отриманий амплікон, специфічний і унікальний відносно 3'-фрагмента трансгенного явища MON 88302. Така типова пара праймерів може використовуватися для ампліфікації 3'-фрагмента з'єднання, діагностичного для явища MON 88302. Подібним чином винахід описує пару праймерів, що може використовуватися для ампліфікації 5'-фрагмента з'єднання, діагностичного для явища MON 88302. Такі праймери можуть включати першу молекулу ДНК і другу молекулу ДНК, що відрізняється від першої молекули ДНК, і обидві молекули мають достатню довжину суміжних нуклеотидів з послідовностями SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 або SEQ ID NO: 6, або їхніми комплементами для функціонування в якості праймерів ДНК, таким чином, при їхньому спільному використанні в реакції термальної ампліфікації із матричної ДНК, отриманої з явища MON 88302, буде отриманий амплікон, специфічний та унікальний відносно 5'-фрагмента трансгенного явища MON 88302.

«Зонд» є виділеною молекулою нуклеїнової кислоти, яка є комплементарною ланцюгу молекули-мішені нуклеїнової кислоти. Зонди згідно даного винаходу включають не тільки дезоксирибонуклеїнові та рибонуклеїнові кислоти, але також поліаміди та інші матеріали для зондів, які зв'язуються специфічно з послідовністю-мішенню ДНК, і визначення такого зв'язування може використовуватися в діагностиці, дискримінації, визначенні або підтвердженні присутності зазначеної послідовності ДНК в окремому зразку. Зонд може бути приєднаний до звичайної визначеної мітки або молекули-репортера, наприклад, радіоактивного ізотопу, ліганда, хемілюмінесцентного агента або фермента. В одному варіанті втілення винаходу зонд, діагностичний для явища MON 88302, включає послідовність, що не зустрічається в природі для генома *Brassica napus*. Типова молекула ДНК, використовувана як зонд, представлена SEQ ID NO: 11.

Зонди і праймери згідно даного винаходу можуть бути послідовністю, що повністю ідентична зазначеній послідовності, однак, з використанням стандартних способів можуть бути розроблені



праймери і зонди, що відрізняються від зазначеної послідовності і зберігають здатність гібридизувати переважно в послідовності-мішені. Для того, щоб молекула нуклеїнової кислоти служила в якості праймера або зонда, вона повинна бути досить комплементарною послідовності для можливості утворювати стабільну дволанцюгову структуру при окремих використовуваних концентраціях розчинника і солі. Для ідентифікації присутності трансгенної ДНК із явища MON 88302 у зразку може використовуватися будь-який стандартний спосіб гібридизації нуклеїнової кислоти або спосіб ампліфікації. Зонди і праймери мають у довжину щонайменше приблизно 11 нуклеотидів, щонайменше приблизно 18 нуклеотидів, щонайменше приблизно 24 нуклеотида або щонайменше приблизно 30 нуклеотидів, або більше. Такі зонди і праймери гібридизують специфічно у послідовність-мішень ДНК за суворих умов гібридизації. Звичайні суворі умови гібридизації описані в Sambrook et al., 1989, and by Haymes et al., In: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). У контексті даного винаходу говорять, що дві молекули нуклеїнової кислоти здатні специфічно гібридизувати одна в іншу, якщо дві молекули здатні утворювати антипаралельну дволанцюгову структуру нуклеїнової кислоти. Говорять, що молекула нуклеїнової кислоти є «комплементарною» іншій молекулі нуклеїнової кислоти, якщо вони володіють повною комплементарністю. У контексті даного винаходу говорять, що молекула володіє «повною комплементарністю», якщо кожен нуклеотид в одній молекулі є комплементарним нуклеотиду в іншій. Говорять, що дві молекули «мінімально комплементарні», якщо вони можуть гібридизувати одна в іншу з достатньою стабільністю для забезпечення знаходження в спареному вигляді відносно одна одної за щонайменше стандартних «малосуворих» умов. Подібним чином вважають, що дві молекули є «комплементарними», якщо вони можуть гібридизувати одна в іншу з достатньою стабільністю для забезпечення знаходження у спареному вигляді відносно одна одної за щонайменше стандартних «дуже суворох» умов. Отже, припустимими є відхилення від повної комплементарності, оскільки такі відхилення неповністю забезпечують здатність молекул утворювати дволанцюгову структуру.

У контексті даного винаходу термін «виділений» означає щонайменше частково відділену молекулу від інших молекул, які у звичайному вигляді пов'язані з нею в природній формі або стані. В одному варіанті втілення винаходу термін «виділений» означає молекулу ДНК, яка щонайменше частково відділена від нуклеїнових кислот, які звичайно фланкують молекулу ДНК у своїй природній формі або стані. Таким чином, молекули ДНК, злиті з регуляторними або кодуючими послідовностями, з якими вони в природному вигляді не асоційовані, наприклад, як результат способів рекомбінації, вважаються виділеними. Такі молекули вважають виділеними, навіть якщо вони інтегровані в хромосому клітини-хазяїна або присутні в розчині нуклеїнової кислоти з іншими молекулами ДНК.

Для виділення або маніпуляцій з молекулою ДНК або її фрагментом, описаними в даному винаході, може використовуватися будь-яке число способів, добре відомих фахівцеві в даній галузі техніки. Наприклад, для ампліфікації окремої початкової молекули ДНК і/або одержання варіантів оригінальної молекули може використовуватися спосіб ПЦР (полімеразної ланцюгової реакції). Молекули ДНК або їхні фрагменти також можуть бути отримані з використанням інших способів, таких як прямий синтез фрагмента хімічним способом, як це звичайно використовується із застосуванням автоматизованого олігонуклеотидного синтезатора.

Молекули ДНК і відповідні нуклеотидні послідовності, описані в тексті даної заявки, використовують, крім усього іншого, для ідентифікації явища MON 88302, вибору варіантів рослини або гібридів, що включають явище MON 88302, визначення присутності ДНК, отриманої з явища MON 88302 у зразку, і моніторингу зразків на предмет присутності і/або відсутності явища MON 88302, або рослини і частин рослин, що включають явище MON 88302.

Даний винахід описує рослини, потомство, насіння, клітини рослин, частини рослин (такі як пилкок, яйцеклітина, стручок, квітка, тканина кореня або стовбура, волокна і листки) і продукти сільськогосподарства. Такі рослини, потомство, насіння, клітини рослин, частини рослин і продукти сільськогосподарства містять визначену кількість полінуклеотиду згідно даного винаходу, тобто такий полінуклеотид, який має щонайменше одну з наступних послідовностей: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 8. Рослини, потомство, насіння, клітини рослин і частини рослин згідно даного винаходу можуть також містити один або більше додаткових трансгенів. Такий трансген може бути представлений будь-якою нуклеотидною послідовністю, що кодує білок або молекулу РНК, що несе необхідну ознаку, включаючи, але не обмежуючись цим, підвищену стійкість до комах, підвищену ефективність використання води, підвищену врожайність, підвищену стійкість до посухи, підвищену якість насіння, резистентність до захворювань, підвищення якості живлення і/або підвищену толерантність до гербіцидів, при цьому бажану ознаку вимірюють відносно порівняльної рослини з відсутністю такого

додаткового трансгена.

Даний винахід описує рослини, потомство, насіння, клітини рослин і частини рослин, такі як пилок, яйцеклітина, стручок, квітка, тканина кореня або стовбура, волокна і листки, отримані із трансгенної рослини, що включає явище MON 88302. Репрезентативний зразок насіння, що

включає явище MON 88302, був збережений, відповідно до Будапештської угоди, з метою виконання даного винаходу. Сховище, обране для зберігання зразка, представлене Американською колекцією типових культур (ATCC) і знаходиться за адресою: 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. У сховищі ATCC був призначений номер доступу PTA-10955 для насіння із явищем MON 88302.

Даний винахід описує мікроорганізм, що включає молекулу ДНК із SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 8, присутніми в його геномі. Прикладом такого мікроорганізму є клітина трансгенної рослини. Мікроорганізми, такі як клітина рослини згідно даного винаходу, використовуються в множинних промислових процесах, включаючи, але не обмежуючись цим, наступні: (i) використання як інструмент досліджень для наукового або промислового дослідження; (ii) використання в культурі для одержання ендогенного або рекомбінантного вуглеводу, ліпиду, нуклеїнової кислоти або білкового продукту, або невеликих молекул, які можуть використовуватися для наступного наукового дослідження як промислові продукти; і (iii) використання в способах культивування тканини рослини для одержання трансгенних рослин або культур тканини рослини, які потім можуть використовуватися в сільськогосподарському дослідженні або виробництві. Виробництво та використання мікроорганізмів, таких як клітини трансгенної рослини, передбачає використання сучасних способів мікробіології і втручання людини для одержання унікального і отриманого людиною мікроорганізму. У цьому процесі рекомбінантна ДНК вставлена в геном клітини рослини для створення клітини трансгенної рослини, що є відмінною і унікальною у порівнянні з рослинними клітинами, які зустрічаються в природі. Така клітина трансгенної рослини потім може бути культивована як клітина бактерій і дріжджів з використанням сучасних способів мікробіології і може існувати в недиференційованому одноклітинному стані. Генетична композиція нової рослинної клітини і фенотип представлені технічним ефектом, створеним шляхом інтеграції гетерологічної ДНК у геном клітини. Іншим аспектом даного винаходу є спосіб використання мікроорганізму згідно даного винаходу. Способи використання мікроорганізмів згідно даного винаходу, таких як клітини трансгенних рослин, включають (i) способи одержання трансгенних клітин шляхом інтеграції рекомбінантної ДНК у геном клітини з наступним використанням цієї клітини для одержання додаткових клітин, що несуть ту саму гетерологічну ДНК; (ii) способи культивування клітин, що містять рекомбінантну ДНК, з використанням сучасних способів мікробіології; (iii) способи одержання та очищення ендогенного або рекомбінантного вуглеводу, ліпиду, нуклеїнової кислоти або білкових продуктів з культивованих клітин; і (iv) способи використання сучасних способів культивування тканин рослин із клітинами трансгенних рослин для одержання трансгенних рослин або культур тканин трансгенних рослин.

У контексті даного винаходу термін «потомство» включає будь-яку рослину, насіння, клітину рослини і/або здатну до регенерації частину рослини, що включає явище ДНК, отриманої з батьківської особини рослини і/або полінуклеотида, що включає щонайменше одну з наступних послідовностей: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 8. Рослини, потомство і насіння можуть бути гомозиготними або гетерозиготними відносно трансгена. Потомство може бути вирощене з насіння, отриманого від рослини, що включає явище MON 88302, і/або з насіння, отриманого від рослини, запиленої пилом рослини, що включає явище MON 88302.

Потомство рослини може бути самозапилене (також відоме як «самозапилення») для одержання дійсної селекційної лінії рослин, тобто рослин, гомозиготних відносно трансгена. Самозапилення відповідного потомства може привести до одержання рослин, що є гомозиготними відносно доданих екзогенних генів.

З іншого боку, потомство рослин може бути піддане аутокросингу, наприклад, схрещуванню з іншою рослиною, для одержання сортового різновиду або гібридного насіння або рослини. Інша рослина може бути трансгенною або нетрансгенною. Сортовий різновид або гібридне насіння, або рослина згідно даного винаходу можуть бути отримані шляхом схрещування першої батьківської форми з відсутністю специфічної та унікальної ДНК явища MON 88302 із другою батьківською формою, яка містить явище MON 88302, що приводить до утворення гібрида, що включає специфічну та унікальну ДНК із явищем MON 88302. Кожна батьківська особина може бути гібридом або інбредним/варіативним сортом, таким чином, схрещування приводить до утворення рослини або насіння згідно даного винаходу, тобто насіння, що має щонайменше один алель, що містить специфічну та унікальну ДНК явища MON 88302 і/або SEQ

ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2. Таким чином, можуть використовуватися дві різних трансгенних рослини для одержання гібридного потомства, що містить два незалежно сегрегованих, доданих, екзогенних гена. Наприклад, рослина, толерантна до гліфосату, що включає явище MON 88302, може бути схрещена з іншою трансгенною рослиною для одержання рослини з характеристиками обох трансгенних рослин. Прикладом цього може бути схрещування рослини Brassica, толерантної до гліфосату і включаючої явище MON 88302, з рослиною Brassica, такою як гірчиця або канола, що містить один або більше додаткових ознак, що приведе до одержання потомства рослини або насіння, толерантних до гліфосату і таких, що мають одну або більше додаткових ознак. Рослини Brassica, що мають необхідні трансгенні ознаки, відомі в науці, включаючи, але не обмежуючись цим, рослини Brassica з ознакою толерантності до гербіцидів (наприклад, явище RT200, явище RT73, явище MS1, явище RF1, явище RF2, Topas 19/2, MS8, RF3, T45), систему схрещування гібридів або систему фертильності (наприклад, явище MS1, явище MS8, явище RF1, явище RF2, явище RF3), контроль комах, підвищену врожайність, резистентність до захворювань (наприклад, резистентність до склеротинії, резистентність до чорної ніжки, резистентність до кили хрестоцвітих, резистентність до фузаріозного вілта), змінений або підвищений вміст жирів (наприклад, явище pCGN3828-212/86-18, явище pCGN3828-212/23), всі описані явища, наприклад, у літературі, наданій Міністерством сільського господарства США (USDA), Службою інспекції здоров'я рослин і тварин (APHIS) або петицій неурегульованих статусів. Рослини Brassica з необхідними нетрансгенними ознаками відомі в науці, включаючи, але не обмежуючись цим, ознаки стійкості до гербіцидів (наприклад, 1471 для толерантності до імідазолу, CLB-1 для толерантності до імідазолінону, ТТС для толерантності до триазину), резистентність до патогенів, контроль комах, підвищену врожайність, резистентність до захворювань (наприклад, резистентність до склеротинії, резистентність до чорної ніжки, резистентність до кили хрестоцвітих, резистентність до фузаріозного вілта), змінений або підвищений вміст жирів (включаючи низький вміст ліноленової кислоти і/або високий вміст жирів), змінену хімічну і/або живильну схему, змінену композицію білків, толерантність до холоду, толерантність до посухи, зміну зрілості і/або цвітіння, та інші змінні або поліпшені агрономічні властивості.

Зворотне схрещування з батьківською особою та ауткросинг із нетрансгенною рослиною також передбачені, так само як і вегетативне розмноження. Опис інших способів рослинництва, які часто використовують для різних ознак і культур, описані в одному з наступних посилань, наприклад, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Даний винахід описує частину рослини, отриману з рослин, що включають явище MON 88302. У контексті даного винаходу термін «частина рослини» означає будь-яку частину рослини, що складається з матеріалу, отриманого з рослини, що включає явище MON 88302. Частини рослини включають, але не обмежуються цим, пилок, яйцеклітини, стручок, квітку, корінь або тканину стовбура, волокна і листки. Частини рослини можуть бути життєздатними, нежиттєздатними, здатними до регенерації і/або не здатними до регенерації.

Даний винахід описує продукти сільського господарства, отримані з рослини, що включає явище MON 88302. У контексті даного винаходу термін «продукт сільського господарства» означає будь-яку композицію або продукт, що складається з матеріалу, отриманого з рослини, насіння, клітини рослини або частини рослини, що включає явище MON 88302. Продукти сільського господарства можуть бути виставлені на продаж для споживачів і можуть бути життєздатними і нежиттєздатними. Нежиттєздатні продукти сільського господарства включають, без обмеження, нежиттєздатне насіння і зерно; оброблене насіння, частини насіння і частини рослин; дегідровану тканину рослин, заморожену тканину рослин і оброблену тканину рослин; насіння та частини рослин, оброблені для використання в кормах наземних і/або водних тварин, одержанні масел, їжі, борошна, пластівців, висівок, волокон і будь-якої іншої їжі для споживання людиною; біомасу та паливні продукти. Життєздатні продукти сільського господарства включають, без обмеження, насіння та клітини рослин. Рослина, що включає явище MON 88302, може використовуватися для виробництва будь-якого продукту сільського господарства, звичайно одержуваного з рослини Brassica. Будь-який такий продукт сільського господарства, отриманий з рослин, що включають явище MON 88302, може містити щонайменше визначену кількість специфічної та унікальної ДНК, що відповідає явищу MON 88302, і специфічно може містити визначену кількість полінуклеотида, що включає щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2. Може використовуватися будь-який стандартний спосіб визначення молекул полінуклеотидів, включаючи описані тут способи. Продукт сільського господарства входить в обсяг даного винаходу за умови присутності будь-якої визначеної кількості SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 у продукті сільського господарства.

Рослини, потомство, насіння, клітини рослин, частини рослин (такі як пилок, яйцеклітина, стручок, квітка, тканина кореня або стовбура і листки) і продукти сільського господарства, згідно даного винаходу, можуть використовуватися, крім усього іншого, для вирощування рослини з метою одержання насіння і/або частин рослини, що включають явище MON 88302, з метою сільськогосподарського використання, з метою одержання потомства, що включає явище MON 88302, для розведення рослин і з дослідницькою метою, використання зі способами мікробіології для промислового та дослідницького застосування, а також продажу споживачеві.

Даний винахід описує способи контролю бур'янів у полі. Спосіб контролю насіння у полі складається з розведення рослин, що включають явище MON 88302, у полі та застосування щонайменше однієї ефективної дози гербіциду гліфосату в полі з метою контролю бур'янів у полі без ураження рослин, що включають MON 88302. Інший спосіб контролю бур'янів у полі також описаний і складається із застосування щонайменше однієї ефективної дози гербіциду гліфосату в полі з метою контролю бур'янів у полі та вирощування культур, що включають явище MON 88302, у полі. Способи згідно винаходу можуть використовуватися поодиночі або в комбінації. Застосування гліфосату може бути перед вирощуванням (тобто в будь-який час до висівання насіння, що включає явище MON 88302, включаючи, але не обмежуючись цим, приблизно від 14 днів до висівання до приблизно 1 дня до висівання або одночасно з висіванням насіння, що включає явище MON 88302), перед проростанням (тобто в будь-який час після висівання насіння, що включає явище MON 88302, і перед проростанням насіння, що включає явище MON 88302), і/або після проростання (тобто в будь-який час після проростання насіння, що включає явище MON 88302). При використанні способів згідно винаходу може використовуватися кілька застосувань гліфосату протягом вегетативного сезону, наприклад, дворазово (наприклад, до висівання і після проростання або перед проростанням і після проростання) або трикратно (наприклад, перед висіванням, перед проростанням і після проростання). Загальна доза гліфосату, використана протягом такого періоду, може включати одне або більше застосувань за сезон, при цьому сума множинних сезонних застосувань додається до одержаної загальної дози використаного гліфосату. У контексті даного винаходу кількість гліфосату, ефективна для контролю росту бур'янів, тобто гербіцидно-ефективна доза гліфосату для використання в полі у розрахунку застосування на культуру для контролю росту бур'янів у полі повинна складатися з діапазону від приблизно 0,125 фунтів гліфосату на акр до приблизно 6,4 фунтів гліфосату на акр протягом сезону вегетації. Наприклад, гербіцидно-ефективна доза гліфосату для використання в полі на культури може становити щонайменше приблизно 0,125, приблизно 0,5, приблизно 1,0, приблизно 1,6, приблизно 2,0, приблизно 2,5, приблизно 3,0, приблизно 3,5, приблизно 4,0, приблизно 4,5, приблизно 5,0, приблизно 5,5, приблизно 6,0 або приблизно 6,4 фунтів на акр протягом сезону вегетації.

Описано способи одержання рослини, толерантної до гербіцидів і такої, що включає трансгенне явище MON 88302. Трансгенні рослини, використовувані в таких способах, можуть бути гомозиготними або гетерозиготними відносно трансгена. Потомство рослин, отриманих такими способами, може бути варіативними сортами або гібридними рослинами; може бути вирощене з насіння, вирощеного рослиною, і/або насіння, що включає явище MON 88302 і отримане від рослини, запиленої пилом рослини, що включає явище MON 88302; і може бути гомозиготним або гетерозиготним відносно трансгена. Рослини потомства можуть згодом бути самозапилені для одержання дійсної лінії при розведенні рослин, тобто рослин, гомозиготних на трансген, або, з іншого боку, підданих ауткросингу, наприклад, схрещених з іншою неспорідненою рослиною для одержання варіативного сорту або гібридного насіння або рослин.

Рослина з толерантністю до застосування гербіциду гліфосату може бути отримана шляхом статевого схрещування рослини, що включає явище MON 88302, і молекули полінуклеотида, що включає послідовність SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, з іншою рослиною з одержанням насіння, яке потім виростає у потомство рослин. Такі рослини потомства можуть бути оброблені гербіцидом гліфосатом для відбору тих рослин, які толерантні до гербіциду гліфосату. З іншого боку, такі рослини з потомства можуть бути проаналізовані з використанням діагностичних способів для відбору рослин потомства, що містять ДНК явища MON 88302. Інша рослина, використовувана в схрещуванні, може бути толерантною або нетолерантною до гербіциду гліфосату і може бути або не бути трансгенною. Отримана рослина потомства і/або насіння можуть бути варіативним сортом або гібридним насінням. У разі практичного використання даного способу етап статевого схрещування однієї рослини з іншою рослиною, тобто перехресного запилення, може супроводжуватися або полегшуватися втручанням людини, наприклад: збором пилку однієї рослини вручну людиною та контактом цього пилку з маточкою або рильцем другої рослини; видаленням, знищенням або вкриттям тичинок або пиляків рослини вручну людиною і/або діями людини (наприклад, втручанням вручну або шляхом

застосування хімічного гаметоциду), таким чином, запобігається природне запилення, і перехресне запилення здійснюється для запліднення; розміщенням людиною комах, що запилюють, у положення для «прямого запилення» (наприклад, розміщенням бджіл у садах або полях або шляхом вмісту рослин у клітинах комахами-запильниками); відкриттям або закриттям  
 5 людиною частин квітки для розміщення або контакту стороннього пилку з маточкою або рильцем; вибіркового розміщення рослин (наприклад, навмисне розведення рослин на відстані запилення); і/або застосуванням хімічних матеріалів для погашення цвітіння або посилення чутливості (маточки до пилка).

Рослина з толерантністю до застосування гербіциду гліфосату може бути отримана шляхом  
 10 схрещування рослини, що включає явище MON 88302, і молекули полінуклеотида, що включає послідовність SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, з одержанням насіння, яке потім виростає у потомство рослин. Такі рослини потомства можуть бути оброблені гербіцидом гліфосатом для відбору тих рослин, які толерантні до гербіциду гліфосату. З іншого боку, такі рослини з потомства можуть бути проаналізовані з використанням діагностичних способів для відбору  
 15 рослин потомства, що містять ДНК явища MON 88302. У разі практичного використання даного способу етап статевого схрещування однієї рослини із самою собою, тобто самозапилення, може супроводжуватися або полегшуватися втручанням людини, наприклад: збором пилку рослини вручну людиною та контактом цього пилку з маточкою або рильцем цієї ж рослини; видаленням, знищенням або вкриттям тичинок або пиляків інших прилеглих рослин вручну  
 20 людиною і/або діями людини (наприклад, втручанням вручну або шляхом застосування хімічного гаметоциду), таким чином, запобігається природне запилення, і самозапилення здійснюється для запліднення; розміщенням людиною комах, що запилюють, у положення для «прямого запилення» (наприклад, розміщенням бджіл у садах або полях або шляхом вмісту рослин у клітинах комахами-запильниками); маніпуляцією людини із квіткою або його частинами  
 25 для забезпечення самозапилення; вибіркового розміщення рослин (наприклад, навмисне розведення рослин на відстані запилення); і/або застосуванням хімічних матеріалів для погашення цвітіння або посилення чутливості (маточки до пилка).

Рослини потомства і насіння, охоплювані такими способами та отримані такими способами, будуть відрізнятися від інших рослин, наприклад, тому що рослини потомства та насіння: є  
 30 рекомбінантними і, таким чином, створені за втручання людини; толерантні до гербіциду гліфосату; містять щонайменше один алель, що складається із ДНК трансгена згідно з даним винаходом; і/або містять визначену кількість полінуклеотидної послідовності, вибраної із групи, що складається з SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2. Насіння може бути селектоване від окремої рослини потомства і, за наявності в насінні SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2, таке насіння буде  
 35 входити в обсяг даного винаходу.

У разі практичного використання даного способу можуть бути схрещені дві різних трансгенних рослини для одержання гібридного потомства, що містить два незалежних сегрегаційних гетерологічних гена. Самозапилення відповідного потомства може привести до  
 40 одержання рослин, що є гомозиготними відносно обох генів. Зворотне схрещування з батьківською особиною та ауткросинг із нетрансгенною рослиною також передбачене, так само як і вегетативне розмноження. Опис інших способів, які часто використовують для різних ознак і культур, описані в одному з наступних посилань, наприклад, Fehr, in Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Рослини і насіння, використовувані в описаних тут способах, також можуть містити один або  
 45 більше додаткових трансгенів. Такий трансген може бути представлений будь-якою нуклеотидною послідовністю, що кодує білок або молекулу РНК, що несе необхідну ознаку, включаючи, але не обмежуючись цим, підвищену стійкість до комах, підвищену ефективність використання води, підвищену врожайність, підвищену стійкість до посухи, підвищену якість насіння, підвищення якості живлення і/або підвищену толерантність до гербіцидів, при цьому  
 50 бажану ознаку вимірюють відносно рослини з відсутністю такого додаткового трансгена.

Способи, описані в даному винаході, можуть використовуватися, крім усього іншого, для контролю бур'янів у полі при вирощуванні рослини з метою одержання насіння і/або частин  
 55 рослин, що включають явище MON 88302, для сільськогосподарських або наукових цілей, селекції потомства, що включає явище MON 88302, для розведення рослини або для наукових цілей, і одержання рослин, потомства та насіння, що включають явище MON 88302.

Рослини, потомство, насіння, клітини рослин, частини рослин (такі як пилок, яйцеклітина, стручок, квітка, тканина кореня або стовбура і листки) і продукти сільського господарства згідно з даним винаходом можуть бути оцінені на предмет композиції ДНК, генної експресії і/або  
 60 білкової експресії. Така оцінка може бути проведена з використанням таких стандартних способів як ПЦР, нозерн-блоттінг, саузерн-блоттінг, вестерн-блоттінг, імунопреципітація та ІФА

або з використанням способів визначення і/або описаних тут наборів для визначення.

Описано способи визначення присутності матеріалів, специфічних для явища MON 88302 у зразку. Один спосіб складається з визначення присутності ДНК, специфічної відносно та отриманої із клітини, тканини або рослини, що включає явище MON 88302. Спосіб описує матричну ДНК у зразку, яка повинна контактувати з парою праймерів з одержанням амплікона із ДНК явища MON 88302 під впливом умов, що відповідають термальній ампліфікації, зокрема, амплікона, який містить щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 або їхніх комплементів. Амплікон одержують із молекули матричної ДНК, отриманої з явища MON 88302, таким чином, молекула матричної ДНК включає специфічні та унікальні нуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 2. Амплікон може бути представлений одно- або дволанцюговою ДНК або РНК, залежно від полімерази, обраної для використання у виробництві амплікона. Спосіб використовують для визначення молекули амплікона, отриманої в кожній з таких реакцій термальної ампліфікації, і підтвердження того, що в послідовності амплікона присутні нуклеотиди, що відповідають SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, або їхнім комплементом. Визначення нуклеотидів, що відповідають SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, або їхнім комплементом, в ампліконі є детермінуючим і/або діагностичним на предмет присутності специфічної для явища MON 88302 ДНК і, отже, біологічного матеріалу, що включає явище MON 88302, у зразку.

Описано інший спосіб для визначення присутності молекули ДНК, що відповідає SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 4, у зразку, що складається з матеріалу, отриманого від рослини або тканини рослини. Спосіб складається з (i) екстрагування ДНК зразка з рослини або із групи різних рослин, (ii) контакту ДНК зразка з молекулою ДНК зонда, яка містить щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, (iii) забезпечення гібридизації зонда і ДНК зразка за суворих умов гібридизації, і потім (iv) визначення явища гібридизації між зондом і зазначеною ДНК зразка. Визначення гібридної композиції як діагностичної на предмет присутності SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4, як це може бути, у ДНК зразка. Відсутність гібридизації є альтернативною ознакою відсутності трансгенного явища в зразку. З іншого боку, визначення того, що окрема рослина містить будь-яку або обидві послідовності, що відповідають SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, або їхні компоненти, є детермінуючою ознакою того, що рослина містить щонайменше один алель, що відповідає явищу MON 88302.

Можливо визначити присутність молекули нуклеїнової кислоти, згідно з даним винаходом, шляхом будь-якого добре відомого способу визначення нуклеїнової кислоти, такого як полімеразна ланцюгова реакція (ПЦР) або гібридизація ДНК із використанням зондів нуклеїнової кислоти. Специфічний для явища аналіз ПЦР обговорюється, наприклад, в Taverniers et al. (J. Agric. Food Chem., 53: 3041-3052, 2005), де показана система відстеження, специфічна для явища, для трансгенних ліній маїсу Bt11, Bt176 і GA21 і трансгенного явища RT73. У цьому дослідженні були розроблені специфічні для явища праймери і зонди на основі послідовностей генома/трансгенних з'єднань для кожного явища. Способи визначення трансгенної рослини із ДНК специфічного явища також були описані в патентах США під номерами 6893826, 6825400, 6740488, 6733974, 6689880, 6900014 і 6818807.

Описано набори для визначення ДНК. Один тип наборів включає щонайменше одну молекулу ДНК достатньої довжини із суміжними нуклеотидами SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 для SEQ ID NO: 6 для функціонування в якості зонда або праймера ДНК, специфічних для визначення присутності ДНК, отриманої із трансгенного явища MON 88302 у зразку. Молекула ДНК, що була визначена з використанням набору, містить щонайменше 40 суміжних нуклеотидів послідовності SEQ ID NO: 1. З іншого боку, набір може включати щонайменше одну молекулу ДНК достатньої довжини із суміжними нуклеотидами SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 для SEQ ID NO: 6 для функціонування в якості зонда або праймера ДНК, специфічних для визначення присутності ДНК, отриманої із трансгенного явища MON 88302 у зразку. Молекула ДНК, що була визначена з використанням набору, містить щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 2.

Альтернативний набір використовує спосіб, у якому ДНК зразка контактує з парою праймерів, як це описано вище, потім виробляється реакція ампліфікації нуклеїнової кислоти, достатня для одержання амплікона, що включає щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2. Визначення амплікона та визначення присутності не менше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 або їхніх комплементів у послідовності амплікона є ознакою присутності ДНК явища MON 88302 у ДНК зразка.

Приводиться молекула ДНК, достатня для використання в якості зонда ДНК, і така молекула може використовуватися для визначення, розпізнавання або діагностики присутності або навіть відсутності ДНК, специфічної та унікальної для явища MON 88302, у ДНК зразка. Молекула ДНК

містить щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або її комплементу або щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 2 або її комплементу.

Ампліфікація нуклеїнової кислоти може супроводжуватися використанням будь-якого із цілого ряду способів ампліфікації нуклеїнової кислоти, відомих у науці, включаючи способи термальної ампліфікації. Послідовність гетерологічної вставки ДНК, що з'єднує послідовності або фланкує послідовності з явища MON 88302 (з репрезентативними зразками насіння, що включає явище MON 88302, включене в ATCC PTA-10955), може бути верифікована (і, при необхідності, скоректована) шляхом ампліфікації таких послідовностей з явища з використанням праймерів, отриманих з описаних тут послідовностей, з наступним стандартним секвенуванням ДНК амплікона або клонованої ДНК.

Амплікон, отриманий такими способами, може бути визначений з використанням безлічі способів. Один такий спосіб представлений генетичним бітовим аналізом (Nikiforov, et al. *Nucleic Acid Res.* 22:4167-4175, 1994), у якому олігонуклеотид ДНК розроблений таким чином, що він перекриває прилягаючу фланкуючу геномну послідовність ДНК і вставлену послідовність ДНК. Олігонуклеотид іміобілізований у лунках мікропланшета. Після термальної ампліфікації ділянки, що цікавить (з використанням одного праймера у вставленій послідовності та одного праймера у прилягаючій фланкуючій геномній послідовності), одноланцюговий амплікон може бути гібридизований з іміобілізованим олігонуклеотидом і служити як матриця для реакції з однією основою з використанням ДНК-полімерази та мічених ddNTP, специфічних для подальшої основи. Зчитування показників може ґрунтуватися на флуоресценції або ІФА. Визначення флуоресціюючого або іншого сигналів вказує на присутність вставленої/фланкуючої послідовності в результаті успішної ампліфікації, гібридизації та розширення однієї основи.

Інший спосіб представлений методом піросеквенування, описаного Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). У цьому способі олігонуклеотид розроблений таким чином, щоб перекривати прилягаючу геномну ДНК і вставлену ДНК з'єднання. Олігонуклеотид гібридизований в одноланцюговий амплікон з ділянки, що цікавить (один праймер у вставленій послідовності та один праймер у фланкуючій геномній послідовності), та інкубований у присутності ДНК-полімерази, АТФ, сульфурілази, люциферази, апірази, аденозин-5'-фосфосульфату та люциферину. ddNTP були додані індивідуально, і включення привело до світлового сигналу, що був виміряний. Світловий сигнал вказує на присутність вставленої/фланкуючої послідовності в результаті успішної ампліфікації, гібридизації та розширення однієї або декількох основ.

Спосіб флуоресціюючої поляризації описаний Chen, et al., (*Genome Res.* 9:492-498, 1999) і може використовуватися для визначення амплікона. З використанням цього способу олігонуклеотид розроблений таким чином, щоб перекривати прилягаючу геномну фланкуючу ДНК і вставлену ДНК з'єднання. Олігонуклеотид гібридизований в одноланцюговий амплікон з ділянки, що цікавить (один праймер у вставленій ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності ДНК), та інкубований у присутності ДНК-полімерази із флуоресціюючою міткою ddNTP. Розширення однієї основи привело до включення ddNTP. Включення може бути виміряне як зміна в поляризації з використанням флуорометра. Зміна в поляризації вказує на присутність вставленої/фланкуючої послідовності в результаті успішної ампліфікації, гібридизації та розширення однієї основи.

TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) також може використовуватися для визначення і/або кількісної оцінки присутності послідовності ДНК із використанням представлених виробником інструкцій. Короткий опис: олігонуклеотидний зонд FRET розроблений таким чином, щоб перекривати прилягаючу геномну фланкуючу ДНК і вставлену ДНК з'єднання. Зонд FRET і праймери ампліфікації (один праймер у вставленій послідовності ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності) включені в цикл у присутності термостабільної полімерази і dNTP. Гібридизація зонда FRET приведе до розщеплення та вивільнення флуоресціюючої молекули, на відміну від гасячої молекули зонда FRET. Флуоресціюючий сигнал вказує на присутність фланкуючої/трансгенної вставної послідовності в результаті успішної гібридизації та ампліфікації.

Для використання у визначенні послідовності були описані молекулярні маяки, наприклад, в Tyangi, et al. (*Nature Biotech.* 14:303-308, 1996). Короткий опис: олігонуклеотидний зонд FRET розроблений таким чином, щоб перекривати прилягаючу геномну фланкуючу ДНК і вставлену ДНК з'єднання. Унікальна структура зонда FRET включає вторинну структуру, що містить флуоресціюючу та гасячу молекули у безпосередній близькості. Зонд FRET і праймери ампліфікації (один праймер у вставленій послідовності ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності) включені в цикл у присутності термостабільної полімерази та dNTP. Після успішної ампліфікації гібридизація зонда FRET із зазначеною послідовністю приводить до

видалення вторинної структури зонда та просторового поділу флуоресціюючої і гасячої молекул, що приводить до флуоресціюючого сигналу. Флуоресціюючий сигнал указує на присутність фланкуючої/трансгенної вставної послідовності в результаті успішної гібридизації та ампліфікації.

Інші описані способи, такі як використання мікрогідродинаміки (публікація патенту США № 2006068398, патент США № 6544734), представляють способи і пристрої для поділу та ампліфікації зразків ДНК. Оптичні барвники використовували для визначення та виміру специфічних молекул ДНК (WO/05017181). Пристрої нанотрубок (WO/06024023) включають електронний сенсор для визначення молекул ДНК або наногранул, які зв'язуються зі специфічними молекулами ДНК, які можна визначити.

Набори для визначення ДНК можуть бути розроблені з використанням описаних тут композицій і способів, широко відомих у науці для визначення ДНК. Набори використовують для ідентифікації явища MON 88302 у зразку і можуть використовуватися у способах для розведення рослин, що містять відповідне явище ДНК. Набори можуть містити праймери ДНК або зонди, подібні або комплементарні SEQ ID NO: 1-6 або їхнім фрагментам, або комплементарам.

Набори і способи визначення, згідно з даним винаходом, використовують, крім усього іншого, для ідентифікації явища MON 88302, вибору варіантів рослини або гібридів, що включають явище MON 88302, визначення присутності ДНК, отриманої з явища MON 88302 у зразку, і моніторингу зразків на предмет присутності і/або відсутності явища MON 88302, або рослини і частин рослин, або продуктів сільського господарства, що включають явище MON 88302.

Представлені нижче приклади включені для демонстрації прикладів певних варіантів втілення винаходу. Фахівцеві в даній галузі техніки стане очевидно, що описані в прикладах способи, що представляють способи винахідників, широко використовуються на практиці і, отже, можуть розглядатися як невід'ємні приклади переважних варіантів втілення винаходу на практиці. Однак, фахівцеві в даній галузі, у світлі даного винаходу, повинна бути очевидною можливість внесення багаточисельних змін у специфічні описані варіанти втілення винаходу, а також одержання подібних або схожих результатів без відхилення від галузі та обсягу винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1: Трансформація *Brassica napus* і вибір явища MON 88302

Даний приклад описує створення трансгенних явищ і вибір явища MON 88302. Трансгенне явище MON 88302 було отримано шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації клітин *Brassica napus* із трансгенної ДНК, як це показано на Фігурі 1, з послідовністю, представленою SEQ ID NO: 5. Трансгенна вставка, представлена SEQ ID NO: 5, є касетою експресії, що включає химерний промотор, що складається з: молекули енхансера, отриманої з енхансера 35S з вірусу мозаїки ранникових (E-FMV.35S), що функціонально пов'язана з молекулою промотора, отриманого з гена *Arabidopsis thaliana* Tsf1 (P-At.Tsf1), що функціонально пов'язаний з молекулою лідируючої послідовності гена *Arabidopsis thaliana* Tsf1 (L-At.Tsf1); ці молекули функціонально пов'язані з послідовністю інтрона гена *Arabidopsis thaliana* Tsf1 (I-At.Tsf1); функціонально пов'язані з молекулою ДНК, що кодує транзитний пептид хлоропласта (CTP2, *Arabidopsis thaliana* EPSPS); функціонально пов'язані з молекулою ДНК, що кодує гліфосат-резистентний EPSPS (CP4-syn); функціонально пов'язані з 3' UTR молекули ДНК, отриманої з гена *Pisum sativum* (T-RbcS2, E9).

Експлантати з *Brassica napus* спочатку були трансформовані однією з п'яти касет експресії з використанням *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Трансформовані клітини потім були селектовані на середовищі, що містить гліфосат, а клітини, що вижили, були регенеровані в рослини. Було отримано понад 23000 експлантів, з них було отримано 224 окремих явищ R0, використовуваних для наступного скринінгу (Таблиця 1).



Таблиця 1

Трансформація *Brassica napus* і вибір явища MON 88302

Вектор	Трансформація	Окрема копія	ГН ефективність	ГН молекулярність	ФТ Перший рік	ФТ Другий рік	Провідне явище
1	97 явищ із 8325 експлантів	37	24	16	16	13 покращених 8 тестовано	3
2	69 явищ із 4625 експлантів	32	5	3	3	0	---
3	43 явищ із 10245 експлантів	11	0	---	---	---	---
4	~30 явищ	14	6	НП	3	0	---
5	~25 явищ	10	6	НП	3	0	---

Зразки тканин з явищем були піддані скринінгу з використанням ПЦР аналізу TAQMAN® для елімінації множинної копії і/або явищ молекулярності комплексу. З початкових 224 явищ 104 були поліпшеними на основі присутності єдиної копії трансгена та відсутності основних послідовностей вектора, як це визначено в ході ПЦР-аналізу TAQMAN®. Зокрема, з вектора 1 (з початковими 97 явищами) 37 R1-явищ були поліпшеними; з вектора 2 (з початковими 69 явищами) 32 R1-явищ були поліпшеними; з вектора 3 (з початковими 43 явищами) 11 R1-явищ були поліпшеними; з вектора 4 (приблизно з 30 явищами) 14 R1-явищ були поліпшеними, і з вектора 5 (приблизно з 25 явищами) 10 R1-явищ були поліпшеними.

104 явища, що містять одну копію трансгена, були поліпшені та використані для тестування в умовах теплиці (ГН), включаючи додатковий молекулярний аналіз і тестування ефективності. Молекулярний аналіз R1 з використанням умов теплиці включав: первинний саузерн-блоттінг для підтвердження присутності однієї копії трансгена та відсутності основних послідовностей вектора; рівні експресії білка CP4 вимірювали на стадії 3-4 листків, розетковій стадії та у насінні; а також проведення процесінгу CP4 з використанням вестерн-блоттінгу (явища з векторів 4 і 5 не включали в даний аналіз). Тестування ефективності R1 з використанням умов теплиці включало: сегрегацію, хлороз/некроз, вегетативну толерантність, першу квітку, зниження росту, чоловічу репродуктивну толерантність, вимірю по життєздатності пилку, і кількість насіння. З аналізу тестування молекулярності та ефективності в тепличних умовах для 104 явищ 25 явищ були поліпшеними в ході польових досліджень першого року. Зокрема, для вектора 1 було 16 R2-явищ із 37 удосконалених явищ R1; для вектора 2 було 3 R2-явища із 32 удосконалених явищ R1; для вектора 3 з 11 R1 удосконаленими явищами для дослідження в тепличних умовах 0 явищ R2 було удосконалено; для вектора 4 було 3 R2-явища із 14 удосконалених явищ R1; для вектора 5 було 3 R2-явища із 10 удосконалених явищ R1 у польових умовах.

Під час польового тестування першого року було проаналізовано 25 R2-явищ на предмет агрономічної оцінки в спарених дослідчених ділянках у тих самих положеннях. Агрономічні польові дослідження були розпочаті для оцінки впливу генної вставки на ріст і розвиток рослини. 16 R2-явищ із вектора 1 були оцінені в 5 положеннях. 3 R2-явища з вектора 2, 3 R2-явища з вектора 4 і 3 R2-явища із вектора 5 були оцінені в 4 положеннях. Кожне дослідження містило позитивну та негативну пару ізолінії кожного явища, а також батьківської зародкової трансформованої плазми та комерційних варіацій. Для агрономічної оцінки і для оцінки розвитку рослини відзначалися міць рослини, ранній ріст, дата першої квітки і висота рослини. Дані врожаю також оцінювалися як індикатор ефекту вставки гена на ріст і розвиток рослини. Для явища використовували спосіб спареної дробової ділянки з 3 реплікаціями як частини усієї ділянки та ізолінії - як субділянки. Позитивні та негативні ізолінії кожного явища були спарені, у той час як комерційна варіація і трансформаційний варіант були спарені і включені як контроль. Ділянки втримувалися вільними від бур'янів протягом сезону з використанням стандартних програм застосування гербіцидів з додатковим ручним виполуванням бур'янів, при необхідності. У даному польовому протоколі використання обробки гліфосатом не передбачено.

Через 7-10 днів після посадки підраховувалася густина стояння для кожної ділянки. Сім'ядолі, які повністю пройшли через ґрунт, вважалися «такими, що з'явилися». Міць рослини

була визначена на стадії 2-3 листка (перед першим використанням гербіциду на спареній ділянці для тестування ефективності) з використанням шкали, що варіює від 1 (відмінна міць) із середнім значенням 5 і до 9 (погана міць). Була записана дата першої квітки, після чого всі ділянки почали цвісти, і було визначено процентний показник відкритих квіток на рослину у розрахунку на ділянку. Висота 5 рослин була виміряна від поверхні ґрунту до верхівки найвищого суцвіття на стадії середнього/пізнього цвітіння та виражена в см. Однорідність і стійкість до полягання була оцінена з використанням шкали, що варіює від 1 (відмінно) із середнім значенням 5 до 9 (погано). Потім був зроблений збір рослин, після того, як на більшості ділянок рослини досягли зрілості. Деякі ділянки були прямо скомбіновані, у той час як інші ділянки були переміщені після досягнення зрілості, і валки були скомбіновані приблизно через 10 днів. Була записана вологість і вага окремого зерна (фунт/А), і зразки насіння були зібрані для аналізу вмісту жирів і білків. Кожне розташування було проаналізовано окремо, і середні показники положень були проаналізовані з використанням статистичного програмного забезпечення. Дані були піддані скринінгу на предмет значень, що випадають, з використанням стандартної двопараметричної процедури на основі вилучених студентизованих залишків з виправленням Бонферроні для експериментальної погрішності першого роду 5% для кожного положення. Перед аналізом значення, що випадають, були вилучені. Був проведений стандартний дисперсійний аналіз для схеми розщеплених ділянок з обмеженою оцінкою способом максимальної правдоподібності. Межі середнього були розраховані для кожної ізоляції кожного явища, і для визначення значимості генної вставки на характеристики росту канолі використовували критерій Стюдента з коефіцієнтом помилки при порівнянні 5%. Ознаки явища позитивних ізоляцій були зіставлені з ознаками відповідних негативних ізоляцій. Через розходження в зрілості між явищами порівняння між позитивними ізоляціями і об'єднаними негативними ізоляціями, а також порівняння з комерційним стандартом і трансформованими зразками було виключено.

Результати польових агрономічних досліджень першого року показали, що обидва вектори привели до виникнення багаточисельних явищ, у яких генна вставка не здійснювала негативного впливу на агрономічні характеристики та урожайність. Ґрунтуючись на агрономічній оцінці, 15 явищ стали кандидатами для вдосконалення в польових дослідженнях другого року. Зокрема, 14 явищ їхнього вектора 1 (16 R2-явищ у польових дослідженнях) і 1 явище з вектора 2 (3 R2-явища в польових дослідженнях) були кандидатами на вдосконалення в польових дослідженнях другого року.

25 явищ також були оцінені у польовому дослідженні першого року на ефективність, і такі явища мали таке ж розташування, що й для агрономічних польових досліджень. Польові дослідження ефективності були розпочаті для оцінки вегетативної та репродуктивної толерантності явищ із наступним застосуванням гліфосату з різним режимом і частотою. 16 R2-явищ із вектора 1 були оцінені в 5 положеннях. 3 R2-явища з вектора 2, 3 R2-явища з вектора 4 і 3 R2-явища із вектора 5 були оцінені в 4 положеннях. Кожне дослідження містило позитивну ізоляцію кожного явища та дві комерційних варіації. Для явища використовували спосіб спареної дробової ділянки з 3 реплікаціями з обробкою гербіцидом як частини усієї ділянки та ізоляції - як субділянок. Для порівняння використовували обробку, що не передбачає розпилення.

Явища були проаналізовані на предмет вегетативної та репродуктивної толерантності при одноразовому застосуванні 1,6 фунт АЕ/А або двох наступних застосуваннях 0,8 фунт АЕ/А - при проростанні рослин до стадії першої квітки. Використання навколишнього WeatherMAX® здійснювали з трьома різними частотами, які були еквівалентні 2х, 4х і 8х однієї частоти застосування (Таблиця 2). Первинне застосування було зроблено на стадії 4 листків, а друге застосування було зроблено на стадії перед цвітінням. Для мінімізації потенційного ушкодження рослини під впливом сурфактантів та інших компонентів у композиціях були приготовлені розчини для розпилення для доставки 3,2 і 6,4 фунтів АЕ/А (4х і 8х) з використанням 1,6 фунтів АЕ/А WeatherMAX® як початкової частоти з додаванням технічного матеріалу (гліфосату без сурфактанту) для досягнення необхідної частоти. Всі застосування проводилися з використанням розпилювача з монтованої на тракторі стрілі, оснащеної пласкою віяловою насадкою з форсунками, відкаліброваної для доставки 10-20 ГПа.

Збір даних проводився так, як це зазначено вище. Ураження гліфосатом визначали в такий спосіб. Перед кожним застосуванням гліфосату були записані ріст рослини і число листків для 5 рослин на ділянку в ділянках, що піддавалися і не піддавалися обробці. Для визначення того, чи наносить гліфосат шкоду явищам, через 7-10 днів після кожного застосування гліфосату проводилася візуальна оцінка процентного показника хлорозу та некрозу. Вегетативне ураження оцінювали після першого застосування гліфосату, у той час як відсоток хлорозу/некрозу на репродуктивній стадії оцінювали після другого застосування з

використанням шкали, що варіює від 0% (немає ураження) до 100% (загибель рослини). Зниження росту оцінювали через 14-21 день після кожного застосування з використанням шкали, що варіює від 0 до 100%. Зниження вегетативного росту оцінювали після першого застосування, у той час як зниження репродуктивного росту визначали після наступного застосування. Межі середнього розраховували для кожної комбінації рівня гліфосату і явища, а критерій Стюдента використовували для визначення ступеня значущості впливу гліфосату на толерантність явища. Отримані дані для явищ після обробки гліфосатом були зіставлені з такими даними для контролю, не підданого обробці, а також з комерційним стандартом RT73 для кожної швидкості застосування гербіциду, і для кожного явища були проведені порівняння для всіх швидкостей застосування гербіциду.

Результати польових досліджень ефективності першого року показують, що вектор 1 приводить до утворення явищ із відмінною вегетативною та репродуктивною толерантністю до гліфосату. Вегетативне ураження відзначалося при використанні продукту із частотою 2х, було вкрай незначним і було оцінене як комерційно незначне. Відзначалася виняткова репродуктивна толерантність для явищ вектора 1. Гліфосат не здійснював негативного впливу на всі явища вектора 1, незалежно від частоти застосування, за винятком одного явища зі значним зниженням урожайності при максимальній частоті застосування (6,4 фунтів АЕ/А, потім 6,4 фунтів АЕ/А). Явища, отримані з вектора 2, не мали значної вегетативної толерантності до гліфосату. При всіх використовуваних частотах застосування гліфосату відзначалися неприйнятні рівні ураження. Гліфосат по суті знижував урожайність всіх явищ вектора 2 незалежно від частоти застосування. Явища, отримані з вектора 4 і 5, а також явища з вектора 1 не використовували, і, отже, вони не були поліпшені для польового випробування другого року. Грунтуючись на польовому випробуванні першого року, 13 явищ із вектора 1 були вдосконалені для польового випробування другого року.

#### Приклад 2: Порівняння RT73 і MON 88302

Польові дослідження були розроблені для оцінки MON 88302 у порівнянні з використовуваною у даний момент і представленою на ринку канолою Genuity™ Roundup Ready® (RT73 явище). Порівняння MON 88302 з RT73 показало, що MON 88302 забезпечило кращу толерантність рослин щодо більш високої частоти застосування гліфосату, що дозволило забезпечити поліпшений контроль бур'янів при підвищеній частоті застосування гліфосату для таких важкоконтрольованих бур'янів як кульбаба, осот польовий, ячмінь гривастий, горець виткий, звичайна лобода біла і верболіз. Порівняння MON 88302 з RT73 також показали, що MON 88302 забезпечило кращу толерантність рослин щодо широкого діапазону частоти застосування гліфосату, що забезпечило розширене застосування гліфосату від проростання насіння до першої квітки, а також контроль бур'янів навіть на пізніх стадіях росту рослини, ніж як це було можливо для RT73. Комбінація MON 88302 підвищеної толерантності до більш високих частот застосування гліфосату і толерантності до застосування гліфосату на пізніх стадіях розвитку рослини забезпечує перевагу у порівнянні з RT73, тобто застосування гліфосату на більш пізніх стадіях розвитку рослини за обмежених умов навколишнього середовища і/або поліпшеного контролю пізньої появи бур'янів, що може знизити врожайність культури.

Зареєстрована в цей час частота застосування гліфосату для системи канולי Genuity™ Roundup Ready® (явище RT73) представлена однократним застосуванням 675 г ае/га або два рази по 450 г ае/га до стадії шести листків для культури канола. RT73 було зіставлено з явищем MON 88302 щодо багаторазового застосування гліфосату. Обробку проводили після проростання насіння до стадії першої квітки культури канולי. Система Genuity™ Roundup Ready® (RT73 явище) була представлена присутніми на ринку різними запильниками 34-65, і явище MON88302 було трансформовано у зародкову плазму чорного дерева.

Було проведено вісім досліджень, з них для шести був зібраний урожай (одна ділянка була втрачена через посуху і одна ділянка була втрачена через град, і дані з однієї ділянки не використовували через перевищення коефіцієнта варіації (KB) попередньо встановленого значення відсікання). Протягом сезону для оптимізації росту рослини використовували стандартні способи вирощування канולי. Для зведення до мінімуму впливу паразитів застосовували стандартні гербіциди та обробку насіння фунгіцидами та інсектицидами до і після проростання насіння. Дослідження проводили з використанням спарених роздільних ділянок із системами Genuity™ Roundup Ready® (RT73 явище) або MON 88302, при цьому використання гербіцидів у системі було рандомізовано. Ділянки мали розміри два на шість метрів; реплікація складала 3 рази. На ділянки вручну розпорошували гербіциди при швидкості 100-110 л/га на відповідній стадії росту рослин. В якості продукту гліфосату використовували канадську композицію Roundup WeatherMAX® (540 г/л). Стадія розвитку 4-6 листків була визначена як 4-6 справжніх листків на головному стовбурі, і перша квітка з'явилася на 50%

рослинах, які мали щонайменше одну квітку. Через 7-10 днів після застосування гербіциду (DAT або днів після обробки) був записаний відсоток хлорозу (% CHLR). Відсоток хлорозу є візуальною оцінкою кількості пожовтілих листків на рослині як результат обробки гербіцидом у порівнянні з не підданим обробці контролем зі шкалою від 1 до 100. Через 14-21 день після обробки гербіцидом (DAT) записували відсоток зниження росту (% GR). Відсоток зниження росту є візуальною оцінкою, використовуваною для опису зниження росту рослини, що складається, без обмеження, зі зниження висоти і/або якості листя на обробленій площі. Оцінка виконується тільки для наземної частини рослини. Відсоток зниження росту зіставляється з не підданим обробці контролем і оцінюється по шкалі від 1 до 100. Зрілість була відзначена як дні після висівання насіння, коли 30% насіння на головному суцвітті стало коричневого/чорного кольору. Відсоток вологості в насінинах був записаний електронно під час збору врожаю. Всі ділянки були завалковані, потім їм дали висохнути доти, доки вологість насіння не була досить низькою для полегшення збору. Вага та вологість насіння була записана електронно під час збору врожаю і конвертована в одиницю бушель/акр при вологості насіння 10%. Кожне розташування було проаналізоване окремо, і середні показники положень були проаналізовані з використанням статистичного програмного забезпечення. Дані були піддані скринінгу на предмет значень, що випадають, з використанням стандартної двопараметричної процедури на основі вилучених студентизованих залишків з виправленням рівня хибнопозитивних результатів (FDR) для експериментальної погрішності першого роду 5% для кожного положення. Перед аналізом значення, що випадають, були вилучені. Стандартний дисперсійний аналіз для схеми спарених розділених ділянок був проведений з використанням змішаної моделі з обмеженою максимальною правдоподібністю - варіація і обробка гербіцидом розглядалися як фіксовані ефекти, реплікації та положення - як випадкові ефекти. Межі середнього були розраховані для кожної варіації і кожної обробки, і для визначення значущості між варіацією і контролем, при кожному рівні обробки гербіцидом з урахуванням впливу на характеристики росту канолі, використовували критерій Стюдента з коефіцієнтом помилки при порівнянні 5%. Для оцінки переваг вимірювали ураження, зрілість і врожайність культури.

Дані по толерантності до гліфосату канолі, що включає явище RT73, у порівнянні з канолою, що включає явище MON 88302, представлені в Таблиці 2. Короткий опис: толерантність до гліфосату MON 88302 була вищою, ніж толерантність до гліфосату RT73 відносно підвищених показників застосування гліфосату (г ае/га) і діапазону стадії культури з толерантністю до застосування гліфосату. Наприклад, RT73 характеризувався 4,7% хлорозом при частоті застосування 1800 г ае/га до стадії 4-6 листків, у той час як MON 88302 характеризувався тільки 1,7% хлорозом при подібній частоті і зазначеній стадії без підвищення хлорозу при подвоєнні частоти (3600 г ае/га). Крім того, явище MON 88302 характеризувався відсутністю процентного показника зниження росту при частоті застосування 1800 г ае/га на стадії 4-6 листків, у той час як RT73 характеризувався зниженням росту 5,3%. При частоті застосування гліфосату 3600 г ае/га на стадії 4-6 листків і першої квітці RT73 характеризувався 10% хлорозом, у той час як показник хлорозу для MON 88302 склав тільки 1,7% і 4,7%, відповідно. При частоті застосування гліфосату 3600 г ае/га на стадії 4-6 листків і першої квітці RT73 характеризувався зниженням росту 20,8% і 8,1%, відповідно, у той час як цей показник для MON 88302 склав тільки 0,3% і 1,1%, відповідно.

Таблиця 2

Толерантність до гліфосату для явища RT73 у порівнянні з явищем MON 88302

Явище	Частота застосування гліфосату (г ае/га)	Стадія розвитку рослини	7-10 DAT % CHLR	14-21 DAT % GR
			Середнє	Середнє
RT73	0	4-6 листків	0,0	0,0
RT73	450	4-6 листків	0,3	0,9
RT73	900	4-6 листків	2,2	1,3
RT73	1800	4-6 листків	4,7	5,3
RT73	3600	4-6 листків	10,0	20,8
RT73	450	1 <sup>а</sup> квітка	0,6	0,8
RT73	900	1 <sup>а</sup> квітка	1,8	0,3
RT73	1800	1 <sup>а</sup> квітка	6,7	3,3
RT73	3600	1 <sup>а</sup> квітка	10,0	8,1
MON88302	0	4-6 листків	0,0	0,0
MON88302	450	4-6 листків	0,0	0,3
MON88302	900	4-6 листків	0,7	0,7
MON88302	1800	4-6 листків	1,7	0,0
MON88302	3600	4-6 листків	1,7	0,3
MON88302	450	1 <sup>а</sup> квітка	0,0	0,0
MON88302	900	1 <sup>а</sup> квітка	0,3	0,8
MON88302	1800	1 <sup>а</sup> квітка	0,9	0,0
MON88302	3600	1 <sup>а</sup> квітка	4,7	1,1

- 5 Дані по днях після висівання до валкування канолі, що включає явище RT73, у порівнянні з канолою, що включає явище MON 88302, представлені в Таблиці 3. Короткий опис: зрілість була уповільнена по суті в системі Genuity™ Roundup Ready® (RT73 явище) при частоті застосування 3600 г ае/га на стадії 4-6 листків і першої квітки, що, імовірно, є наслідком ураження рослини. Затримки в зрілості не відзначалося для рослин MON 88302, за винятком, по суті, вкорочення зрілості при частоті застосування 1800 г ае/га на стадії 4-6 листків.

Таблиця 3

Дні після висівання рослин до валкування: порівняння явищ RT73 і MON 88302

Варіація	Застосування	Частота г/на ае	Середнє	Контроль	Дельта днів	Значення Р
RT73	4-6 листків	450	103,6	103,8	-0,20	0,45
RT73	4-6 листків	900	103,6	103,8	-0,25	0,36
RT73	4-6 листків	1800	104,3	103,8	0,43	0,12
RT73	4-6 листків	3600	104,7	103,8	0,83	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	450	103,8	103,8	0,00	1,00
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	900	104,2	103,8	0,33	0,21
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	1800	104,3	103,8	0,50	0,06
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	3600	104,7	103,8	0,83	<0,05
MON88302	4-6 листків	450	104,7	105,2	-0,46	0,10
MON88302	4-6 листків	900	105,2	105,2	0,04	0,90
MON88302	4-6 листків	1800	104,5	105,2	-0,67	<0,05
MON88302	4-6 листків	3600	105,2	105,2	0,00	1,00
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	450	105,1	105,2	-0,08	0,75
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	900	104,7	105,2	-0,42	0,12
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	1800	104,9	105,2	-0,25	0,34
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	3600	105,0	105,2	-0,17	0,53

10 Дані по вмісту води у насінні канолі, що включає явище RT73, у порівнянні з канолою, що

- 5 включає явище MON 88302, представлені в Таблиці 4. Вологість у насінні визначали електронно при зборі врожаю з певних ділянок. Вологість насіння у кожній системі була зіставлена відносно частоти обробки гліфосатом і відсутності обробки. Вологість насіння у системі каноли Genuity™ Roundup Ready® була вищою при частотах застосування 1800 г ае/га і 3600 г ае/га на стадіях 4-6 листків і першої квітці. Підвищений вміст води у насінні при таких двох видах обробки відображає уповільнення зрілості, що є результатом раніше описаного ураження рослини. Для рослин MON 88302 значного впливу на рівень води в насінні не відзначалося.

Таблиця 4

Вміст води у насінні для явища RT73 у порівнянні з явищем MON 88302

Варіація	Застосування	Частота г/на ае	Середнє число для оброблених рослин	Конт-роль	Дельта %	Значення Р
RT73	4-6 листків	450	7,6	7,3	0,4	0,41
RT73	4-6 листків	900	7,7	7,3	0,4	0,35
RT73	4-6 листків	1800	8,4	7,3	1,1	<0,05
RT73	4-6 листків	3600	9,8	7,3	2,5	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	450	7,7	7,3	0,4	0,39
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	900	8,0	7,3	0,7	0,09
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	1800	8,3	7,3	1,0	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	3600	9,3	7,3	2,0	<0,05
MON88302	4-6 листків	450	8,0	8,1	-0,1	0,86
MON88302	4-6 листків	900	8,0	8,1	0,0	0,96
MON88302	4-6 листків	1800	8,0	8,1	-0,1	0,87
MON88302	4-6 листків	3600	7,9	8,1	-0,2	0,69
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	450	8,2	8,1	0,2	0,72
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	900	8,3	8,1	0,2	0,60
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	1800	8,1	8,1	0,1	0,87
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	3600	8,4	8,1	0,3	0,44

- 10 Дані по врожайності каноли, що включає явище RT73, у порівнянні з канолю, що включає явище MON 88302, представлені в Таблиці 5 і на Фігурах 2 і 3. Порівняння врожайності було проведено для різних частот застосування гліфосату та відсутності обробки гліфосатом для каноли, що включає кожне явище. У системі Genuity™ Roundup Ready® відзначалося, по суті, зниження врожайності при частоті застосування 1800 і 3600 г ае/га на стадії 4-6 листків і першої квітці та 900 г/га на стадії першої квітці. Для рослин MON 88302 значних розходжень у врожайності при будь-якій частоті застосування не відзначалося.
- 15

Таблиця 5

Урожайність для явища RT73 у порівнянні з явищем MON 88302

Варіація	Застосування	Частота г/на ае	Середнє число для оброблених рослин	Контроль	Дельта бу/акр	Значення Р
RT73	4-6 листків	450	56,0	58,0	-2,0	0,45
RT73	4-6 листків	900	55,6	58,0	-2,4	0,36
RT73	4-6 листків	1800	51,4	58,0	-6,6	<0,05
RT73	4-6 листків	3600	40,6	58,0	-17,4	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	450	56,1	58,0	-1,9	0,46
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	900	51,2	58,0	-6,8	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	1800	48,2	58,0	-9,8	<0,05
RT73	1 <sup>а</sup> квітка	3600	41,5	58,0	-16,5	<0,05
MON88302	4-6 листків	450	53,7	52,2	1,5	0,57
MON88302	4-6 листків	900	54,4	52,2	2,2	0,40
MON88302	4-6 листків	1800	51,6	52,2	-0,6	0,82
MON88302	4-6 листків	3600	50,9	52,2	-1,3	0,61
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	450	52,3	52,2	0,1	0,98
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	900	50,4	52,2	-1,7	0,49
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	1800	52,5	52,2	0,3	0,91
MON88302	1 <sup>а</sup> квітка	3600	48,4	52,2	-3,8	0,14

Зареєстрована в цей час частота застосування гліфосату для системи Genuity™ Roundup Ready® становить 675 г ае/га однократно або 450 г ае/га дворазово. Застосовувати можна до стадії 6 листків. Частота для MON88302 може становити до 1800 г ае/га і до стадії першої квітки.

Система Genuity™ Roundup Ready® приводить до 11,4% зниження врожайності при запропонованій для MON 88302 частоті застосування 1800 г ае/га та 30% зниженню врожайності при запропонованій 2X частоті (Фігура 2). Таке зниження врожайності відзначалося при використанні в даний час частоти застосування Genuity™ Roundup Ready® на стадії 4-6 листків. Для рослин MON 88302 значного зниження врожайності не відзначалося. Фігура 3 відображає врожайність при частоті застосування гліфосату і стадії розвитку рослини (перша квітка). Відзначалося, по суті, зниження врожайності при всіх зазначених частотах для системи Genuity™ Roundup Ready® на даній пізній стадії. Для рослин MON 88302 значного зниження врожайності не відзначалося.

#### Приклад 3: Характеристика послідовностей ДНК явища MON 88302

ДНК, вставлена в геном рослини MON 88302, і геномна послідовність, що фланкує вставку, були охарактеризовані детальним молекулярним аналізом. Такий аналіз включав: секвенування послідовності вставки, визначення номера вставки (номера сайтів інтеграції в геномі), визначення числа копій (числа копій трансгенної ДНК в одному локусі), оцінку цілісності вставленої генної касети та характеристику фланкуючих послідовностей.

Послідовності геномної ДНК, що фланкують трансгенну вставку ДНК у явищі MON 88302, були визначені з використанням інвертної термальної ампліфікації, як це описано в Ochman et al., 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.). Геномна ДНК рослини була виділена з нетрансгенної ДНК чорного дерева, і різні трансгенні явища, що виникли під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *Brassica napus*, описані в Прикладі 1. Тканина, використовувана для виділення ДНК, була отримана за стандартних умов вирощування. Приблизно 1 грам тканини молодого листка було скомбіновано з рідким азотом і здрібнено в тонкодисперсний порошок з використанням ступки та маточки. ДНК була екстрагована з використанням набору для екстракції геномної ДНК Nucleon™ PhytoPure™ (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) відповідно до протоколу виробника. Після фінального етапу преципітації ДНК із окремих зразків була ресуспендована в 0,5 мл TE (10 мм Тріс-НСІ рН 8,0, 1 мм ЕДТА). Цей спосіб може бути модифікований фахівцем у даній галузі техніки для екстрагування ДНК із будь-якої тканини, включаючи, але не обмежуючись цим, насіння.

Аліквота ДНК із кожного зразка була розщеплена рестрикційними ендонуклеазами, вибраними на основі рестрикційного аналізу трансгенної ДНК. Після самолігування рестрикційних фрагментів була проведена термальна ампліфікація з використанням праймерів, отриманих з послідовності трансгенної ДНК, які можуть ампліфікувати послідовності з використанням системи ампліфікації ELONGASE® (№ у каталозі 10481-018, Invitrogen, Carlsbad, CA) або ПЦР системи Expand Long Template (№ у каталозі 1681842, Roche Applied Science, Indianapolis, IN), відступаючи від 5'- і 3'-кінця трансгенної ДНК. Амплікони, отримані під час реакцій, були розділені гел-електрофорезом з агарозою і очищені з використанням гелевого набору для очищення QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Очищені гелем амплікони були клоновані у вектор pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA) з дотриманням протоколу виробника. Отримані плазміди, що містять явище MON 88302 із фланкуючими геномними послідовностями, були секвеновані з використанням стандартних протоколів секвенування ДНК. Геномна ДНК, що прилягає до або фланкує 5'-кінець трансгенної ДНК, вставленої в геном, представлена як SEQ ID NO: 3 ([C], див. Фігуру 1). Геномна ДНК, що прилягає до 3'-кінця трансгенної ДНК, вставленої в геном, представлена як SEQ ID NO: 4 2 ([D], див. Фігуру 1). Сегмент касети експресії ДНК, що був повністю інтегрований у геномну ДНК, представлений як SEQ ID NO: 5 ([E], див. Фігуру 1).

Послідовності виділеної молекули ДНК були зіставлені з послідовністю трансгенної ДНК для ідентифікації фланкуючої послідовності і співзольованого фрагмента трансгенної ДНК. Підтвердження присутності касети експресії було досягнуто шляхом термальної ампліфікації із праймерами, розробленими на основі віднятих даних фланкуючої послідовності і відомої послідовності трансгенної ДНК. Послідовність дикого типу, що відповідає цій же самій ділянці, у якій була інтегрована трансгенна ДНК у трансформованій лінії, була виділена з використанням праймерів, отриманих із фланкуючих послідовностей у явищі MON 88302. Реакції термальної ампліфікації проводили з використанням системи ампліфікації ELONGASE® (№ у каталозі 10481-018, Invitrogen, Carlsbad, CA). Фланкуючі послідовності у явищі MON 88302 і послідовність дикого типу чорного дерева були проаналізовані щодо баз даних множинних нуклеотидів і білків. Дана інформація використовувалася для вивчення взаємодії трансгена з геномом рослини і для оцінки цілісності сайту вставки. Фланкуюча послідовність і послідовності дикого

типу використовували для розробки праймерів для аналізу кінцевих точок TAQMAN для ідентифікації явищ.

Приклад 4: Кінцеві точки в аналізі TAQMAN®, специфічні для явища

Даний приклад описує специфічні для явища кінцеві точки, отримані способом термальної ампліфікації TAQMAN® для ідентифікації явища MON 88302 у зразку. Приклади умов, що підходять для способу TAQMAN® для визначення специфічних для явища MON 88302 кінцевих точок, наступні. Етап 1: 18 МОм води було наведено до фінального обсягу 10 мкл. Етап 2: 5,0 мкл 2X універсальної майстер-суміші (dNTP, фермент, буфер) було наведено до 1X фінальної концентрації. Етап 3: 0,5 мкл суміші Праймер-1 і Праймер-2 (ресуспендованої в 18 МОм води до концентрації 20 мкМ для кожного праймера) доведено до фінальної концентрації 1,0 мкМ (наприклад, у пробірку для мікроцентрифугування варто додати наступне для досягнення 500 мкл при фінальній концентрації 20 мкМ: 100 мкл Праймера SQ20901 (SEQ ID NO: 9) у концентрації 100 мкМ; 100 мкл Праймера SQ23770 (SEQ ID NO: 10) у концентрації 100 мкМ; 300 мкл 18 МОм води). Етап 4: 0,2 мкл явища 6-FAM™ MGB Probe PB10164 (SEQ ID NO: 11) довести до фінальної концентрації 0,2 мкМ. Етап 5: 0,5 мкл внутрішнього контрольного праймера SQ2563 (SEQ ID NO: 17) і внутрішнього контрольного праймера SQ2564 (SEQ ID NO: 18) змішати до фінальної концентрації кожного праймера 1,0 мкМ. Етап 6: 0,2 мкл внутрішній контролю VIC™ Probe PB0751 (SEQ ID NO: 19) довести до фінальної концентрації 0,2 мкМ. Етап 7: 3,0 мкл екстрагованої ДНК (матриця) для кожного зразка, що містить наступне: 1. зразки листків для аналізу; 2. негативний контроль (нетрансгенна ДНК); 3. негативний контроль водою (не матриця); 4. позитивний контроль ДНК MON 88302. Етап 8: умови термоциклера наступні: один цикл при 50°C протягом 2 хвилин; один цикл при 95°C протягом 10 хвилин; десять циклів при 95°C протягом 15 секунд, потім при 64°C протягом 1 хвилини з -1°C/цикл; сорок циклів при 95°C протягом 15 секунд, потім при 54°C протягом 1 хвилини; фінальний цикл при 10°C.

Молекули ДНК, використовувані у способі, представлені, наприклад, праймерами SQ20901 (SEQ ID NO: 9) і SQ23770 (SEQ ID NO: 10) і олігонуклеотидним зондом, міченим 6FAM™ PB10164 (SEQ ID NO: 11). Інші зонди і праймери можуть бути розроблені з використанням послідовностей трансгенної вкладки і/або описаних тут фланкуючих послідовностей. Для одержання амплікона для діагностики явища ДНК MON 88302 у таких способах реакції використовували SQ20901 (SEQ ID NO: 9) і SQ23770 (SEQ ID NO: 10) з PB10164 (SEQ ID NO: 11). Кінцева точка способу ампліфікації TAQMAN також підтверджує цілісність матриці ДНК шляхом ампліфікації FatA, однієї копії ендегенного гена в *Brassica napus*. Молекули ДНК, використовувані у способі, представлені, наприклад, праймерами SQ2563 (SEQ ID NO: 17) і SQ2564 (SEQ ID NO: 18) і олігонуклеотидним зондом, міченим VIC™ PB0751 (SEQ ID NO: 19). Контроль для даного аналізу включає позитивний контроль із ДНК *Brassica napus* з явищем MON 88302, негативний контроль із нетрансгенної *Brassica napus* і негативний контроль, який не містить матричної ДНК.

Кінцева точка способу термальної ампліфікації TAQMAN® також використовувалася для розробки аналізів зиготності для явища MON 88302. Аналіз зиготності може використовуватися для визначення того, чи є рослина, що включає явище, гомозиготною відносно ДНК явища; тобто, чи включає вона екзогенну ДНК у тому самому положенні в кожній хромосомі пари хромосом; або вона є гетерозиготною відносно ДНК явища, тобто включає екзогенну ДНК тільки в одній хромосомі пари хромосом; або є нульовою щодо явища ДНК, тобто належить до дикого типу. Даний приклад описує специфічні для явища кінцеві точки, отримані способом термальної ампліфікації TAQMAN® для визначення зиготності на предмет явища MON 88302 у зразку. Для даного аналізу використовували три праймера, при цьому праймер SQ21948 (SEQ ID NO: 12) гібридизується і поширюється специфічно із вставленої екзогенної ДНК, праймер SQ22176 (SEQ ID NO: 13) гібридизується і поширюється специфічно від 5' фланкуючого кінця вставленої екзогенної ДНК, і праймер SQ24635 (SEQ ID NO: 14) гібридизується і поширюється специфічно від 3' фланкуючого кінця вставленої екзогенної ДНК. Три праймера є діагностичними для явища. У даному прикладі праймер SQ22176 (SEQ ID NO: 13), праймер SQ21948 (SEQ ID NO: 12) і олігонуклеотидний зонд PB4213, мічений 6FAM™ (SEQ ID NO: 15), є діагностичними за присутності копії вставленої екзогенної ДНК. У даному прикладі праймер SQ22176 (SEQ ID NO: 13), праймер SQ24635 (SEQ ID NO: 14) і олігонуклеотидний зонд PB10787, мічений VIC™ (SEQ ID NO: 16), є діагностичними за відсутності копії вставленої екзогенної ДНК, що присутня у геномній ДНК, оскільки відноситься до дикого типу. При змішуванні всіх трьох праймерів і двох зондів разом у реакції ПЦР із ДНК, екстрагованої з рослини, гомозиготної на явище MON 88302, утвориться флуоресціюючий сигнал тільки з олігонуклеотидного зонда PB4213, міченого 6FAM™ (SEQ ID NO: 15), що є індикатором і діагностичною ознакою рослини, гомозиготної на явище MON 88302. При змішуванні всіх трьох праймерів і двох зондів разом у реакції ПЦР із



ДНК, екстрагованої з рослини, гетерозиготної на явище MON 88302, утвориться флуоресціюючий сигнал з олігонуклеотидного зонда PB4213, міченого 6FAM™ (SEQ ID NO: 15), і олігонуклеотидного зонда PB10787, міченого VIC™ (SEQ ID NO: 16), що є індикатором і діагностичною ознакою рослини, гетерозиготної на явище MON 88302. При змішуванні всіх трьох праймерів і двох зондів разом у реакції ПЦР із ДНК, екстрагованої з рослини, нульової на явище MON 88302 (тобто дикого типу), утвориться флуоресціюючий сигнал тільки з олігонуклеотидного зонда PB10787, міченого VIC™ (SEQ ID NO: 16), що є індикатором і діагностичною ознакою рослини, нульової на явище MON 88302, тобто дикого типу. Приклади умов, використовуваних у даному способі, є наступними. Етап 1: 18 МОм води було наведено до фінального обсягу 10 мкл. Етап 2: 5,0 мкл 2X універсальної майстер-суміші (dNTP, фермент, буфер) було наведено до 1X фінальної концентрації. Етап 3: 0,5 мкл праймерів зиготності SQ21948, SQ22176, SQ24635 (ресуспендованих в 18 МОм води до концентрації 20 мкМ для кожного праймера) доведено до фінальної концентрації 1,0 мкМ (наприклад, у пробірці для мікроцентрифугування варто додати наступне для досягнення 500 мкл при фінальній концентрації 20 мкМ: 100 мкл Праймера 1 у концентрації 100 мкМ; 100 мкл Праймера 2 у концентрації 100 мкМ; 300 мкл 18 МОм води). Етап 4: 0,2 мкл зонди для визначення зиготності 6-FAM™ MGB PB4213 (SEQ ID NO: 15) (ресуспендованого у 18 МОм води до концентрації 10 мкМ) до фінальної концентрації 0,2 мкМ. Етап 5: 0,5 мкл суміші внутрішнього контрольного праймера SQ22176 (SEQ ID NO: 13) і внутрішнього контрольного праймера SQ24635 (SEQ ID NO: 14) (ресуспендованої у воді 18 МОм до концентрації 20 мкМ для кожного праймера) до фінальної концентрації 1,0 мкМ для кожного праймера. Етап 6: 0,2 мкл зонди для внутрішнього контролю VIC™ PB10787 (SEQ ID NO: 16) (ресуспендованого у 18 МОм води до концентрації 10 мкМ) до фінальної концентрації 0,2 мкМ. Етап 7: 3,0 мкл екстрагованої ДНК (матриця) для кожного зразка, що містить наступне: 1. зразки листків для аналізу; 2. негативний контроль (нетрансгенна ДНК); 3. негативний контроль водою (не матриця); 4. позитивний контроль ДНК MON 88302. Етап 8: умови термоциклера наступні: один цикл при 50°C протягом 2 хвилин; один цикл при 95°C протягом 10 хвилин; десять циклів при 95°C протягом 15 секунд, потім при 64°C протягом 1 хвилини з -1°C/цикл; тридцять циклів при 95°C протягом 15 секунд, потім при 54°C протягом 1 хвилини; фінальний цикл при 10°C. Може використовуватися система 9700 або Stratagene Robocycler, MJ Engine DNA Engine PTC-225. Для одержання ампліконів для ідентифікації ДНК із явищем MON 88302 у біологічному зразку можуть використовуватися інші способи і апарати, відомі фахівцям в даній галузі. При проведенні термальної ампліфікації в апараті Eppendorf Mastercycler Gradient або MJ Engine, термоциклер повинен бути запущений в окремому переліченому режимі. При проведенні термальної ампліфікації в апараті Perkin-Elmer 9700 термоциклер повинен бути встановлений на максимальну швидкість.

Приклад 5: Ідентифікація явища MON 88302 при селекції MON 88302

Даний приклад описує спосіб ідентифікації явища MON 88302 у потомстві будь-якої селекції з використанням рослин, що включають MON 88302. Пари праймерів для явища ДНК використовували для одержання амплікона, що є діагностичною ознакою для явища MON 88302. Амплікон, діагностичний для явища MON 88302, включає щонайменше одну з'єднуючу послідовність, зазначену тут як SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 ([A] і [B], відповідно, як це зазначено на Фігурі 1). SEQ ID NO: 1 ([A] на Фігурі 1) представлена нуклеотидною послідовністю, що відповідає з'єднанню фланкуючої послідовності з 5'-кінцем трансгенної вставки (положення 762-821 SEQ ID NO: 3 [C], див. Фігуру 1). SEQ ID NO: 2 ([B] на Фігурі 1) представлена нуклеотидною послідовністю, що відповідає з'єднанню фланкуючої послідовності з 3'-кінцем трансгенної вставки (положення 313-372 SEQ ID NO: 4 [D], див. Фігуру 1).

Пара праймерів для явища дозволить одержувати діагностичний для явища MON 88302 амплікон і включає пари праймерів, розроблені з використанням фланкуючих послідовностей (SEQ ID NO: 3 і 4) і вставленої трансгенної послідовності ДНК (SEQ ID NO: 5). Для одержання діагностичного амплікона, у якому перебуває щонайменше 40 нуклеотидів SEQ ID NO: 1, варто розробити молекулу прямого праймера на основі SEQ ID NO: 3 з основ 1-791 і молекулу зворотного праймера на основі послідовності вставленої касети експресії ДНК SEQ ID NO: 5 з положень 1-4427, при цьому молекули праймера мають достатню довжину із суміжних нуклеотидів для специфічної гібридизації із SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 5. Для одержання діагностичного амплікона, у якому перебуває щонайменше 40 нуклеотидів SEQ ID NO: 2, варто розробити молекулу прямого праймера на основі послідовності вставленої касети експресії SEQ ID NO: 5 з основ 1-4427 і молекулу зворотного праймера на основі 3'-фланкуючої послідовності SEQ ID NO: 4 з положень 343-1250, при цьому молекули праймера мають достатню довжину із суміжних нуклеотидів для специфічної гібридизації із SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 5. Для практичних цілей розроблені праймери для одержання ампліконів повинні мати обмежений

діапазон розмірів, наприклад, від 100 до 1000 основ. Менші (полінуклеотиди з більш короткою довжиною) амплікони в цілому можуть бути отримані під час ПЦР-реакцій з більшою надійністю, забезпечуючи більш короткий час циклів, легкий поділ і візуалізацію на гелях агарози, або можуть бути адаптовані для використання в аналізах з кінцевою точкою, на зразок TAQMAN®.

Менші амплікони можуть бути отримані і визначені з використанням відомих у науці способів для визначення амплікона. Крім того, амплікони, отримані з використанням пар праймерів, можуть бути клоновані у вектори, розмножені, виділені та секвеновані або можуть бути безпосередньо секвеновані з використанням добре відомих у науці способів. Будь-яка пара праймерів, отримана з комбінації SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 5 або комбінації SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 5, що підходять для використання у способі ампліфікації ДНК для одержання амплікона, діагностичного для явища MON 88302 або його потомства, є аспектом даного винаходу. Будь-яка окрема виділена молекула полінуклеотидного праймера ДНК, що включає щонайменше 11 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 3 або її комплемента, що може використовуватися у способі ампліфікації ДНК для одержання амплікона, діагностичного для рослин, що включають явище MON 88302, або їхнього потомства, є аспектом даного винаходу. Будь-яка окрема виділена молекула полінуклеотидного праймера ДНК, що включає щонайменше 11 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 4 або її комплемента, що може використовуватися у способі ампліфікації ДНК для одержання амплікона, діагностичного для рослин, що включають явище MON 88302, або їхнього потомства, є аспектом даного винаходу. Будь-яка окрема виділена молекула полінуклеотидного праймера ДНК, що включає щонайменше 11 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 5 або її комплемента, що може використовуватися у способі ампліфікації ДНК для одержання амплікона, діагностичного для рослин, що включають явище MON 88302, або їхнього потомства, є аспектом даного винаходу.

Приклад умов ампліфікації для даного аналізу описаний у Прикладі 4 вище. Однак, будь-яка модифікація таких способів або використання праймерів ДНК, гомологічних або комплементарних SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 4, або послідовностям ДНК трансгенної вставки (SEQ ID NO: 5) явища MON 88302, за допомогою якої можна одержати амплікон, діагностичний для явища MON 88302, включена в обсяг даного винаходу. Діагностичний амплікон включає молекулу ДНК, гомологічну або комплементарну щонайменше одній трансгенній/сполучній геномній ДНК (SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, або SEQ ID NO: 7, або SEQ ID NO: 8), або її значний фрагмент.

Аналіз явища MON 88302 у зразку може включати позитивний контроль із явища MON 88302, негативний контроль порівняльної рослини без явища MON 88302 (наприклад, але не обмежуючись цим, *Brassica napus*) і/або негативний контроль, що містить геномну ДНК. Пара праймерів, що буде ампліфікувати молекулу ендогенної ДНК, може служити як внутрішній контроль умов ампліфікації ДНК. Будь-який фрагмент послідовності, вибраної із послідовностей SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 5, може використовуватися в якості праймера ампліфікації ДНК для одержання амплікона з використанням описаних у Прикладі 4 способів, і такий амплікон може бути діагностичним для явища MON 88302 при використанні явища MON 88302 як матриці для подібної діагностичної реакції ампліфікації. Використання таких послідовностей ДНК праймерів з модифікаціями у способах, описаних у Прикладі 4, входить в обсяг даного винаходу. Амплікон, отриманий за допомогою щонайменше однієї послідовності праймера ДНК, отриманої із SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 5 для діагностики явища MON 88302, є аспектом винаходу.

Набори для визначення ДНК, що містять щонайменше один праймер ДНК із достатньою довжиною із суміжних нуклеотидів, отриманих із SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 5, при використанні у способі ампліфікації ДНК, можуть приводити до одержання діагностичного амплікона для рослини, що включає явище MON 88302, або її потомства, що може бути позначене як аспект винаходу. Частина рослини або насіння, або продукти сільського господарства, за допомогою яких буде отриманий амплікон для діагностики явища MON 88302 у способі ампліфікації ДНК, є аспектом винаходу. Аналіз амплікона для явища MON 88302 може проводитися з використанням будь-якої системи термоциклера або ампліфікації нуклеїнової кислоти, що може використовуватися для одержання амплікона, діагностичного для явища MON 88302, як це описано в тексті даної заявки.

Депозит репрезентативного зразка насіння із явищем MON 88302, описаним вище і зазначеним у формулі винаходу, був викладений згідно Будапештської угоди і внесений в Американську колекцію типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. Код доступу в ATCC для даного депозиту становить PTA-10955. Депозит буде утримуватися у сховищі протягом періоду 30 років або через 5 років після останнього звертання до нього, або протягом періоду дії патенту, залежно від того, який період довший, і замінений,

при необхідності, протягом зазначеного періоду.

Після опису та ілюстрації принципів даного винаходу фахівцеві в даній галузі повинно бути очевидно, що винахід може бути модифікований в організації та деталях без відхилення від таких принципів. Всі модифікації, що входять в галузь і обсяг даного винаходу, зазначені в доданій формулі винаходу.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рекомбінантна молекула ДНК, яка включає:

а) полінуклеотидну молекулу з послідовністю, вибраною із групи, що складається із SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8;

б) полінуклеотидну молекулу з нуклеотидною послідовністю, яка щонайменше на 95 % ідентична повнорозмірній послідовності SEQ ID NO: 6; або

в) полінуклеотидну молекулу з послідовністю, комплементарною (а) або (б), де вказана рекомбінантна молекула ДНК вказує на присутність явища MON 87427, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6.

2. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана молекула ДНК одержана з явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, де репрезентативний зразок насіння, що включає явище MON 88302, депонований в ATCC під номером доступу № PTA-10955.

3. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана молекула ДНК міститься в рослині *Brassica*, клітині рослини, насінні, потомстві рослини, частині рослини або продукції сільського господарства.

4. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана молекула ДНК представлена ампліконом, одержаним із матричної молекули, що містить ДНК явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6.

5. Рекомбінантна молекула ДНК за п. 1, яка **відрізняється** тим, що вказана молекула ДНК є діагностичною на предмет присутності явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6.

6. Полінуклеотидний зонд для діагностики присутності явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, що має достатню довжину для зв'язування з молекулою нуклеїнової кислоти, що включає SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, і який гібридується за суворих умов гібридизації з молекулою ДНК, що включає SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2, і не гібридується за суворих умов гібридизації з молекулою ДНК, що не включає SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2.

7. Спосіб визначення присутності молекули ДНК, одержаної з явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, у зразку ДНК, що включає:

а) контакт ДНК-зразка з полінуклеотидним зондом за п. 6;

б) піддавання вказаного зразка і вказаного полінуклеотидного зонда суворим умовам гібридизації;

в) визначення гібридизації вказаного полінуклеотидного зонда з вказаною молекулою ДНК; при цьому визначення вказаної гібридизації є діагностичною ознакою присутності вказаної молекули ДНК, одержаної з явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, у вказаному зразку ДНК.

8. Пара молекул ДНК, що складається з першої молекули ДНК і другої молекули ДНК, що відрізняється від першої молекули ДНК, при цьому вказані молекули ДНК включають полінуклеотидну молекулу з нуклеотидною послідовністю достатньої довжини із суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 6 або її комплементу, для функціонування як праймерів ДНК при використанні разом у реакції ампліфікації із матрицею, що містить явище MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, для одержання амплікону, що є діагностичною ознакою для явища MON 88302 у зразку ДНК, де вказаний амплікон включає нуклеотидну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 1 та SEQ ID NO: 2.

9. Спосіб визначення присутності молекули ДНК, одержаної з явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, у зразку ДНК, що включає:

а) контакт ДНК-зразка з парою молекул ДНК за п. 8;

б) проведення реакції ампліфікації, достатньої для одержання амплікону, що включає молекулу полінуклеотида, яка має щонайменше 40 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2; і

в) визначення вказаного амплікону;

5 при цьому визначення вказаного амплікону є діагностичною ознакою присутності вказаної молекули ДНК, одержаної з явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, у вказаному зразку ДНК.

10. Набір для визначення ДНК, який включає (а) полінуклеотидний зонд за п. 6 або (б) пару молекул ДНК за п. 8.

10 11. Рослина, насінина, клітина або частина рослини, що включає полінуклеотидну молекулу, яка містить послідовність нуклеотидів, що кодує CP4-EPSPS і містить послідовність нуклеотидів, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8.

15 12. Рослина, насінина, клітина або частина рослини за п. 11, яка **відрізняється** тим, що вказана рослина, насінина, клітина або частина рослини толерантні до обробки гербіцидом гліфосатом.

13. Рослина, насінина, клітина або частина рослини за п. 11, яка **відрізняється** тим, що їхній геном виробляє амплікон, що є діагностичною ознакою явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, при тестуванні у способі ампліфікації ДНК, де вказаний амплікон включає молекулу ДНК, що має послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 та SEQ ID NO: 8.

14. Частина рослини за п. 11, яка **відрізняється** тим, що вказану частину рослини вибирають із групи, яка складається з пилку, яйцеклітини, стручка, квітки, тканини кореня, тканини стовбура або тканини листка.

25 15. Рослина, насінина, клітина або частина рослини, що включає явище MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, де репрезентативний зразок насіння, що включає явище MON 88302, депонований в ATCC під номером доступу № PTA-10955.

16. Рослина, насінина, клітина або частина рослини за п. 15, яка **відрізняється** тим, що вказана рослина, насінина, клітина або частина рослини толерантні до обробки гербіцидом гліфосатом.

30 17. Рослина або насінина за п. 15, яка **відрізняється** тим, що вказана рослина або насінина є гібридом, який має щонайменше одного батька, що містить явище MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6.

35 18. Насінина, рослина або її частина, здатна виробляти амплікон, що є діагностичною ознакою явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, при тестуванні у способі ампліфікації ДНК, і який включає молекулу ДНК, що має послідовність, вибрану із групи, яка складається із SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8.

40 19. Спосіб вирощування рослин, що містять явище MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, який включає обробку поля кількістю гліфосату, ефективною для боротьби з ростом бур'янів у вказаному полі без ураження вказаних рослин, що включають явище MON 88302.

20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що вказана кількість гліфосату, ефективна для контролю росту бур'янів, становить від приблизно 0,125 фунта до приблизно 6,4 фунта на акр.

45 21. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що вказана кількість гліфосату, ефективна для контролю росту бур'янів, становить приблизно 1,6 фунта на акр.

22. Спосіб за п. 21, який **відрізняється** тим, що вказана обробка в полі проводиться до стадії 6 листків вказаних рослин, що включають явище MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6.

50 23. Спосіб визначення зиготності явища MON 88302, що характеризується полінуклеотидною молекулою, що має послідовність SEQ ID NO: 6, в рослині або насініні, що включає:

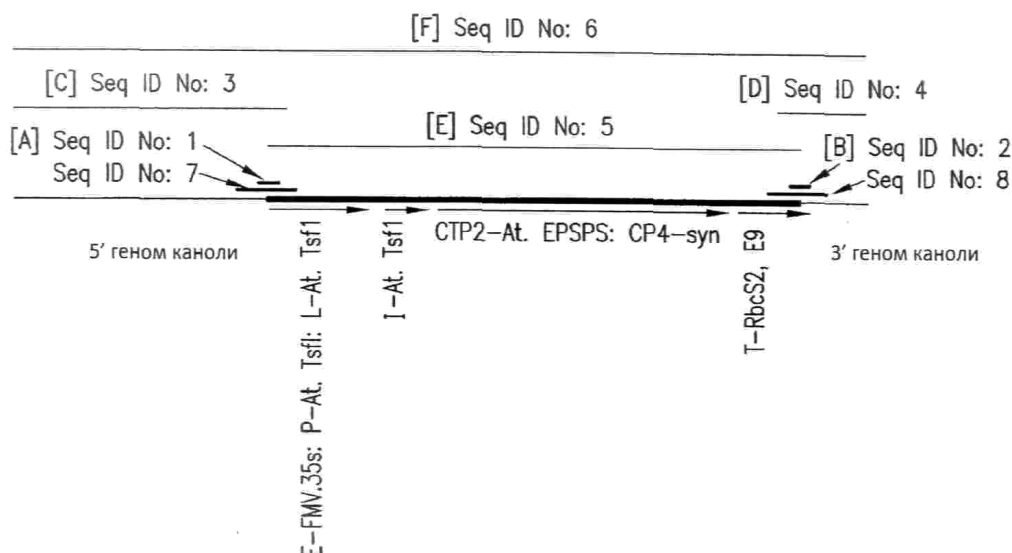
а) контакт зразка, що включає ДНК, із набором праймерів, що включає SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 і SEQ ID NO: 14, що, при використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК із явища MON 88302, приводить до утворення першого амплікону, який є діагностичною ознакою явища MON 88302;

б) проведення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з одержанням вказаного першого амплікону;

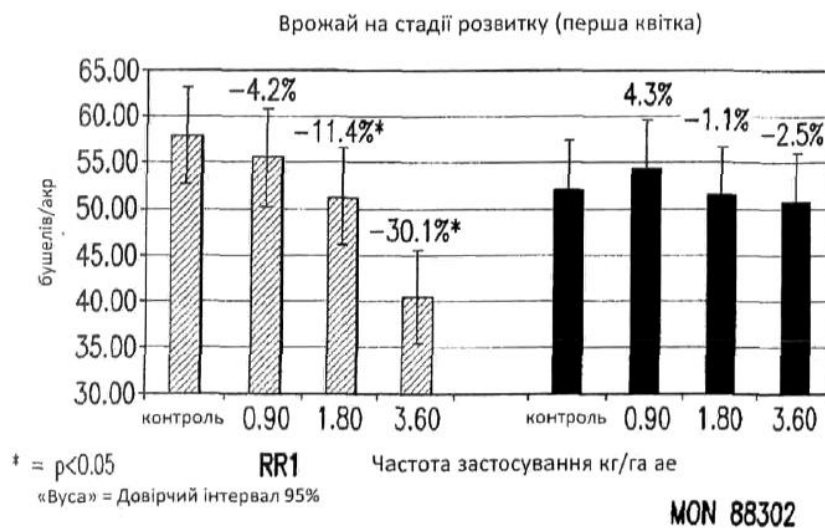
в) визначення вказаного першого амплікону;

60 г) контакт вказаного зразка, що включає ДНК, із вказаним набором праймерів, який, при використанні під час реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з геномною ДНК із рослин,

- приводить до утворення другого амплікону, що включає нативну геномну ДНК, гомологічну геномній ділянці трансгенної вставки, ідентифікованої як явище MON 88302;
- д) проведення реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з одержанням вказаного другого амплікону;
- 5 е) визначення вказаного другого амплікону; і
- ж) порівняння вказаних першого та другого ампліконів у зразку, при цьому присутність обох ампліконів указує, що даний зразок гетерозиготний відносно трансгенної вставки.



Фіг. 1



Фіг. 2

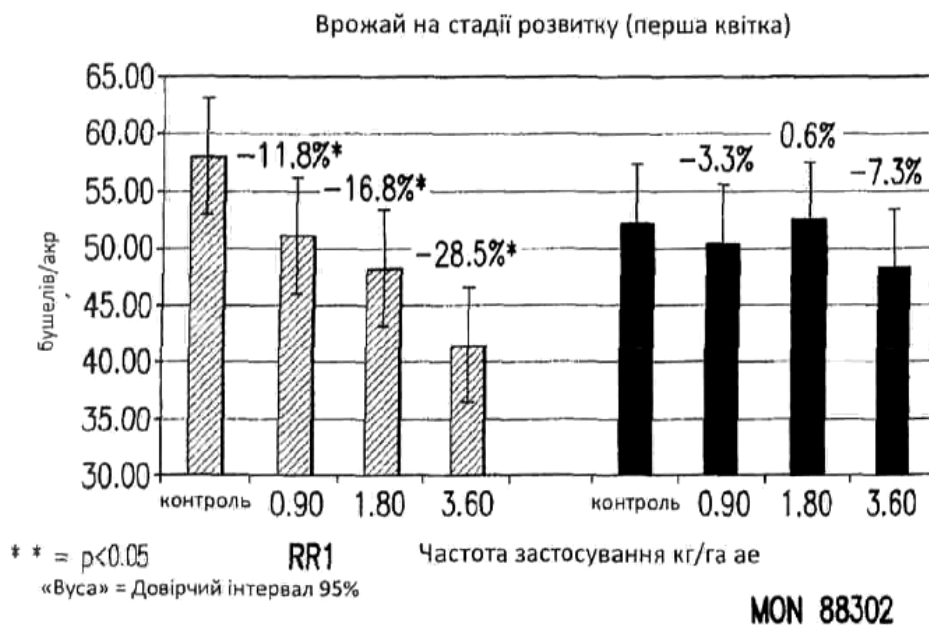


Fig. 3

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601